

Aus der Klinik für Innere Medizin m. S. Nephrologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**„Untersuchung zu Mechanismen und Therapie der
humoralen Rejektion an Patienten
nach Nierentransplantation“**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Luisa Klaus
aus Bernau bei Berlin

Datum der Promotion: 07.12.2018

I Inhaltsverzeichnis

<u>I INHALTSVERZEICHNIS</u>	3
<u>II ABSTRAKT</u>	6
<u>III ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	8
<u>IV TABELLENVERZEICHNIS</u>	10
<u>V ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	11
1 EINLEITUNG	13
1.1 Die Nierentransplantation	13
1.1.1Fakten und Zahlen	13
1.1.2Die allogene Transplantation	14
1.1.3Die Humanen Leukozytenantigene (HLA) und Diagnostik	15
1.2 Die zelluläre und humorale Immunantwort nach Nierentransplantation	16
1.2.1Die T-Zell-abhängige Antikörperproduktion	16
1.2.2Die B-Lymphozyten und ihre Differenzierung	18
1.2.3Phänotypisierung der B-Zell-Populationen im peripheren Blut	20
1.2.4Der B-Zell-aktivierende Faktor (BAFF)	21
1.2.5Die Immunglobuline	22
1.3 Immunsuppression nach Nierentransplantation	23
1.3.1Standardimmunsuppressiva	23
1.3.1.1 Kortikosteroide	23
1.3.1.2 Proliferationshemmer /Hemmer der IMPDH	24
1.3.1.3 Calcineurininhibitoren (Cyclosporin A, Tacrolimus).....	25
1.3.1.4 mTOR-Inhibitoren.....	26
1.3.2Antikörper im Kontext der Induktionstherapie	26
1.3.3Belatacept	27
1.4 Transplantat-Rejektion	27
1.4.1Humorale Rejektion	28
1.5 Therapiemöglichkeiten der humoralen Rejektion	29
1.5.1Rituximab	31
1.5.2Bortezomib	32
1.6 Fragestellung	35

2	METHODIK	36
2.1	Versuchsteilnehmer und Blutentnahmen	36
2.2	AMR-Diagnose und –Definitionen	37
2.2.1	Klinische Parameter	37
2.2.2	Histologischer Nachweis: Biopsie	38
2.2.3	Serologischer Nachweis von Spender-spezifischen Antikörpern	39
2.3	AMR-Therapie.....	40
2.4	Durchflusszytometrie	41
2.4.1	Phänotypisierung der B-Zell-Populationen im peripheren Blut	41
2.4.2	Vorbereitung und Verdünnung der Blutproben	42
2.4.3	Zählverfahren	43
2.4.4	Färbung	44
2.4.5	FMO-Kontrollen	45
2.4.6	Messung	46
2.4.7	Gating-Strategie	48
2.5	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	49
2.5.1	Der B-Zell aktivierende Faktor (BAFF)	49
2.5.2	Mumps/Masern/Röteln (MMR)	51
2.6	Datenverwaltung und statistische Analysen.....	51
2.7	Materialien.....	53
3	ERGEBNISSE.....	55
3.1	Charakterisierung der Versuchsteilnehmer	55
3.2	Immunsuppression	56
3.3	Transplantat- und Patienten-Überlebensraten.....	58
3.4	Biopsie-Ergebnisse	59
3.5	Nierenfunktion.....	61
3.5.1	Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)	61
3.5.2	Proteinurie	63
3.6	Nebenwirkungen der AMR-Therapie.....	64
3.7	Die Spender-spezifischen HLA- Antikörper (DSA).....	68
3.8	Durchflusszytometrie	71
3.8.1	CD19 ⁺ B-Zellen	71
3.8.2	Unreife B-Zellen (CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺ CD38 ⁻)	72

3.8.3 Naive B-Zellen (CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺ CD38 ⁻)	74
3.8.4 Doppelt negative (DN) B-Zellen (CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD27 ⁻ IgD ⁻ CD38 ⁻)	75
3.8.5 Gedächtnis-B-Zellen (CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD27 ⁺)	76
3.8.6 Verhältnis naive B-Zellen zu Gedächtnis-B-Zellen	79
3.8.7 Plasmazellen (CD19 ⁺ CD20 ⁻ CD27 ⁺ IgD ⁻ CD38 ⁺)	80
3.9 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	84
3.9.1 Der B-Zell aktivierende Faktor (BAFF)	84
3.9.2 Mumps/Masern/Röteln (MMR)	86
4 DISKUSSION	88
4.1 Klinisches Ergebnis	88
4.2 Einfluss der AMR-Therapie auf die B-Zellpopulationen und den B-Zell aktivierenden Faktor	91
4.3 Kurzfristige Reduktion der Spender-spezifischen Antikörper.....	102
4.4 Keine Änderung der protektiven Antikörper gegen Mumps, Masern und Röteln	104
4.5 Grenzen der vorliegenden Studie	106
4.6 Zusammenfassung.....	108
5 LITERATURVERZEICHNIS	110
<u>VI EIDESSTAATLICHE VERSICHERUNG</u>	120
<u>VII LEBENSLAUF</u>	121
<u>VIII DANKSAGUNG</u>	122

II Abstrakt

Einleitung: Die Antikörper-vermittelte Rejektion (AMR) gehört zu den größten Risikofaktoren für ein terminales Transplantatversagen nach Nierentransplantation (NTx). Die bislang verwendeten Therapiekonzepte mit intravenösen Immunglobulinen (IVIg), Plasmapheresen (PPH) und Rituximab erzielten keine zufrieden stellenden Langzeitergebnisse. Da das Auftreten von Spender-spezifischen Antikörpern (DSA) eine grundlegende Rolle in der Pathogenese einer AMR spielt, sollen durch den Einsatz des Proteasomen-Inhibitors Bortezomib DSA produzierende Plasmazellen (PZ) depletiert werden. In Kombination mit Rituximab, welches reife und unreife B-Zell-Populationen spezifisch verringert, wird der Einsatz von Bortezomib hinsichtlich Effektivität, Sicherheit und Transplantatüberleben überprüft.

Methodik: Es wurden zehn AMR-Patienten in die Studie eingeschlossen. Der AMR-Gruppe wurden zwei Kontrollgruppen mit stabiler NTx-Funktion mit (n=12) und ohne (n=10) DSA-Nachweis gegenübergestellt. Die AMR-Therapie umfasste eine Methylprednisolon-Stoßtherapie, PPH (6x), Bortezomib (4x1,3mg/m²), Rituximab (1x500mg) und IVIg (3x2g/kg). Es wurden die Biopsie-Ergebnisse und die Sicherheit der Studienpatienten im Kontext der AMR-Therapie ausgewertet. Über 24 Monate (M) erfolgte die Verlaufskontrolle der Nierenfunktionswerte sowie die Analyse des peripheren Blutes mittels Durchflusszytometrie auf CD19, CD3, CD20, CD27, CD38, CD138, IgD und HLA-DR. Die regelmäßige Bestimmung der Serum-BAFF (B-Zell-aktivierender Faktor)-Konzentrationen, der DSA und der Antikörper gegen Mumps, Masern und Röteln (MMR) erfolgte über 12 M.

Ergebnisse: Über den Beobachtungszeitraum von drei Jahren betrug die Überlebensrate bei allen drei Gruppen 100 %, während 40 % der AMR-Patienten ein terminales NTx-Versagen erlitten. 9/10 unserer AMR-Patienten hatten eine späte chronische AMR mit ausgeprägten histologischen Transplantatschäden. Im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen wurden bei der AMR-Gruppe signifikant mehr stationäre Aufenthalte sowie schwerwiegende unerwünschte Ereignisse festgestellt. Die Nierenfunktionswerte konnten nicht über zwei Jahre verbessert werden. Die CD19⁺ B-Zellen und die naiven B-Zellen wurden nach der AMR-Therapie über zwei Jahre signifikant reduziert. Der prozentuale Anteil der PZ, Gedächtnis-B-Zellen und DN-Zellen konnte bereits nach einem Jahr repopulieren. Die BAFF-Werte waren nach AMR-Therapie über 12 M signifikant erhöht. Die DSAsum-Werte der AMR-Gruppe sind verglichen zum BL-Zeitpunkt nach 3 M reduziert. Die Antikörper gegen MMR wurden nicht durch die AMR-Therapie beeinflusst.

Schlussfolgerung: In der vorliegenden Studie wurde die starke und langanhaltende Reduktion der zirkulierenden CD19⁺ B-Zellen nach AMR-Therapie nachgewiesen, welche mit erhöhten BAFF-Werten einhergeht. Weder PZ und Gedächtnis-B-Zellen noch die Antikörperwerte gegen MMR und die DSA-Werte wurden langfristig durch die Therapie beeinflusst. Die Kombination von Rituximab und Bortezomib konnte in dieser Studie nur einen kurzzeitigen synergistischen Effekt aufzeigen. Eine Transplantat-Überlebensrate von 60 % nach drei Jahren ist nicht als

zufrieden stellend zu bewerten und sollte Anlass zu weiteren Untersuchungen bezüglich effektiverer Therapiemethoden geben.

Introduction: Antibody-mediated rejection (AMR) in renal transplant patients is one of the main risk factors for graft failure. Despite combined therapy with intravenous immunoglobulins (IVIg), plasmapheresis (PPH) and Rituximab the long-term outcomes remain poor. The proteasome inhibitor Bortezomib targets plasma cells (PZ) thus it influences the production of donor specific HLA antibodies (DSA) which are a crucial factor for AMR pathogenesis. Rituximab depletes mature and immature B cell populations therefore the combination of these two agents will be examined concerning efficacy, safety and graft survival.

Methods: 10 AMR patients as well as two control groups with stable graft function with (n=12) and without (n=10) DSA were included. AMR therapy included steroid pulse, PPH (6x), Bortezomib (4x1.3 mg/ m² per body surface), Rituximab (1x500mg) and IVIg (3x2g/kg). Biopsy results and the safety of the patients was evaluated concerning AMR therapy. Renal function was observed, and peripheral blood was analyzed by flow cytometry for anti-CD19, -3, -20, -27, -38, -138, -IgD and -HLA-DR for 24 months (M). Serum titers of B-cell activating factor (BAFF), DSA and protective antibodies specific for mumps, measles and rubella (MMR) were measured by ELISA for 12 M.

Results: During a follow-up of three years the survival rate is 100 % in all three groups, but graft loss was observed in 40 % of AMR patients. 9/10 AMR patients had a late chronic type of AMR with marked histological transplant damage. In comparison to the control groups AMR patients had significant more hospitalisations and severe adverse events. Renal function did not improve in AMR patients after therapy.

CD19 B-cells and naïve B cells were significantly reduced after AMR treatment over a period of 24 M. In contrast, the percentage of PZ, memory B cells and DN B cells recovers after 12 M. After AMR therapy BAFF titers significantly increased whereas DSAs only diminished 3 M after therapy. We did not observe any changes in MMR titers due to AMR therapy.

Conclusion: A potent and sustained reduction in circulating CD19 B-cells after AMR therapy was observed which correlates with an increase in BAFF levels. A long-term effect did not occur on PZ, memory B cells, antibody titers against MMR or DSA values. Combining Rituximab and Bortezomib shows a short-term synergistic effect. Overall renal graft survival rate of 60 % after three years is not satisfying and should give occasion to further investigations concerning more effective AMR therapy methods.

III Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: AMR-Therapie-Regime für die AMR-Patienten.....	40
Abbildung 2: B-Zell-Populationen des Knochenmarks (KM), des peripheren Blutes (PB) sowie der sekundären Lymphgewebe (SLG) mit Angabe des jeweils charakteristischen Phänotyps.....	42
Abbildung 3: 1) Seitwärtstreulicht (Sideward Scatter = SSC) und Vorwärtstreulicht (Forward Scatter = FSC); 2) Abgrenzung der CD19 ⁺ B-Zellen (B) aus der CD3 ⁺ /CD19 ⁺ Lymphozytenpopulation (A) am Beispiel eines repräsentativen AMR-Patienten.....	48
Abbildung 4: Schematische Darstellung zur Abgrenzung der B-Zell-Populationen.....	49
Abbildung 5: Standardkurve mit Gleichung zur Berechnung der BAFF-Konzentrationen.....	50
Abbildung 6: Box-Plot-Grafik am Beispiel des relativen Anteils der B-Zellen.....	52
Abbildung 7: Kaplan-Meier-Analyse.....	58
Abbildung 8: GFR der AMR-Gruppe und der beiden Kontrollgruppen zum BL-Zeitpunkt, 1 Jahr nach BL und 2 Jahre nach BL.....	62
Abbildung 9: Verlauf der GFR der AMR-Patienten vor Therapiebeginn, zum Therapiebeginn (BL), ein Jahr nach BL und zwei Jahre nach BL.....	62
Abbildung 10: Proteinurie der AMR-Gruppe und der beiden Kontrollgruppen zum BL-Zeitpunkt, 1 Jahr nach BL und 2 Jahre nach BL.....	63
Abbildung 11: Verlauf der Proteinurie der AMR-Patienten vor Therapiebeginn, zum Therapiebeginn (BL), ein Jahr nach BL und zwei Jahre nach BL.....	64
Abbildung 12: DSAm _{ax} -Werte (links) und DSAs _{um} -Werte (rechts) der AMR-Gruppe über eine Beobachtungszeit von einem Jahr.....	69
Abbildung 13: DSA-Werte der AMR-Patienten Nr. 3-10 über eine Beobachtungszeit von jeweils einem Jahr bzw. über 22 Monate (AMR-Pat. Nr. 8)	70
Abbildung 14: CD19 ⁺ B-Zellen vor und nach AMR-Therapie am Beispiel eines repräsentativen AMR-Patienten.....	71
Abbildung 15: Absolute Anzahl (oben) und prozentualer Anteil (unten) CD19 ⁺ CD3 ⁻ B-Zellen von PBMC's.....	72
Abbildung 16: Naive (CD20 ⁺ CD27-IgD ⁺ CD38 ⁻ ; 1), unreife (CD20 ⁺ CD27-IgD ⁺ CD38 ⁺ ; 2) und Doppelt negative (CD20 ⁺ CD27-IgD ⁻ CD38 ⁻ ; 3) B-Zellen vor und nach AMR-Therapie am Beispiel eines repräsentativen AMR-Patienten.....	72

Abbildung 17: Absolute Anzahl (oben) und prozentualer Anteil (unten) CD20 ⁺ CD27 ⁻ IgD ⁺ CD38 ⁺ unreife B-Zellen von B-Zellen.....	73
Abbildung 18: Absolute Anzahl (oben) und prozentualer Anteil (unten) CD20 ⁺ CD27 ⁻ IgD ⁺ CD38 ⁻ naive B-Zellen von B-Zellen.....	74
Abbildung 19: Absolute Anzahl (oben) und prozentualer Anteil (unten) CD20 ⁺ CD27 ⁻ IgD ⁻ CD38 ⁻ DN B-Zellen von B-Zellen.....	76
Abbildung 20: Gedächtnis-B-Zellen (CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD27 ⁺) vor und nach AMR-Therapie am Beispiel eines repräsentativen AMR-Patienten.....	76
Abbildung 21: Absolute Anzahl (oben) und prozentualer Anteil (unten) CD20 ⁺ CD27 ⁺ Gedächtnis-B-Zellen von B-Zellen.....	77
Abbildung 22: IgD ⁺ non class-switched (1) und IgD ⁻ class-switched (2) Gedächtnis-B-Zellen vor und nach AMR-Therapie am Beispiel eines repräsentativen AMR-Patienten.....	78
Abbildung 23: Absolute Anzahl (oben) und prozentualer Anteil (unten) von CD20 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺ non class-switched und CD20 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁻ class-switched Gedächtnis-B-Zellen von B-Zellen.....	79
Abbildung 24: Verhältnis naive B-Zellen zu Gedächtnis-B-Zellen.....	80
Abbildung 25: Plasmazellen (CD20 ⁻ CD27 ⁺ IgD ⁻ CD38 ⁺) vor und nach AMR-Therapie am Beispiel eines repräsentativen AMR-Patienten.....	80
Abbildung 26: Absolute Anzahl (oben) und prozentualer Anteil (unten) CD20 ⁻ CD27 ⁺ CD38 ⁺ IgD ⁻ Plasmazellen von B-Zellen.....	81
Abbildung 27: HLA-DR ⁻ (1) und HLA-DR ⁺ (2) Plasmazellen (CD20 ⁻ CD27 ⁺ CD38 ⁺ IgD ⁻) vor und nach AMR-Therapie am Beispiel eines repräsentativen AMR-Patienten.....	82
Abbildung 28: Absolute Anzahl (oben) und prozentualer Anteil (unten) HLA-DR ⁺ und HLA-DR ⁻ Plasmazellen von B-Zellen.....	83
Abbildung 29: Absolute Anzahl CD20 ⁻ CD27 ⁺ CD38 ⁺ CD138 ⁻ Plasmazellen.....	84
Abbildung 30: Serum-BAFF-Konzentrationen.....	85
Abbildung 31: BAFF-Konzentrationen und B-Zellen mit gebrochener y-Achse.....	86
Abbildung 32: Mumps-Ak-Titer der AMR-Gruppe über eine Beobachtungszeit von einem Jahr.....	87
Abbildung 33: Masern-Ak-Titer der AMR-Gruppe über eine Beobachtungszeit von einem Jahr.....	87
Abbildung 34: Röteln-Ak-Titer der AMR-Gruppe über eine Beobachtungszeit von einem Jahr.....	87

IV Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Banff-Klassifikation der Rejektionen nach NTx.....	27
Tabelle 2: B-Zell-Populationen und deren spezifische Phänotypisierung.....	41
Tabelle 3: Zusammenstellung der markierten Aks für die B-Zell-Färbung.....	44
Tabelle 4: Zusammenstellung der markierten Aks für die B-Zell-FMO-Kontrollen.....	46
Tabelle 5: Laborgeräte/Software.....	53
Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien.....	54
Tabelle 7: Chemikalien und Medien.....	54
Tabelle 8: Anti-Human-Antikörper.....	54
Tabelle 9: Demografie zum Baseline-Zeitpunkt (AMR-Diagnose).....	55
Tabelle 10: Besondere klinische Charakteristika der AMR-Gruppe zum Baseline-Zeitpunkt.....	56
Tabelle 11: Immunsuppression zum BL-Zeitpunkt.....	56
Tabelle 12: Angaben zur AMR-Medikation.....	57
Tabelle 13: Pathohistologische Charakteristika der Baseline-Biopsie (Banff 2013).....	58
Tabelle 14: Nebenwirkungsprofil der AMR-Gruppe nach AMR-Therapie sowie der beiden stabilen Kontrollgruppen über eine Beobachtungszeit von einem Jahr.....	66
Tabelle 15: Hämatologische Nebenwirkungen der AMR-Gruppe über eine Beobachtungszeit von einem Jahr.....	67
Tabelle 16: Spender-spezifische Antikörper der AMR-Gruppe zum BL-Zeitpunkt.....	68

V Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
ACR	Akute zelluläre Rejektion
AE	Adverse events (unerwünschte Nebenwirkungen)
AMR	Antikörper-vermittelte Rejektion
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ATG	Anti-Thymozyten-Globuline
BAFF	B-Zell aktivierender Faktor
BCR	B-Zell-Rezeptor
BL	Baseline (Ausgangspunkt/Zeitpunkt vor Behandlungsbeginn)
bzw.	Beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation (Bezeichnung von Differentiationsantigenen)
CNI	Calcineurin-Inhibitor
CyA	Cyclosporin A
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DN-Zellen	Doppelt negative Zellen
DSA	spenderspezifische Antikörper
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FMO	Fluorescence-Minus-One
FSC	Forward light scatter (Vorwärtsstreulicht)
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GIT	Gastrointestinaltrakt
HLA	humanes Leukozytenantigen
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMPDH	Inosinmonophosphat-Dehydrogenase
IVIg	Intravenöse Immunglobulingabe
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes
LCT	Lymphozytotoxizitätstest
MALT	Mukosa assoziiertes Lymphgewebe
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex)
MFI	mittlere Fluoreszenz-Intensität
Min	Minute
MM	Mismatch
MMF	Mycophenolatmofetil
MMR	Mumps, Masern und Röteln

M	Monat
max.	maximal
Mio.	Million
MPA	Mycophenolsäure
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
MW	Mittelwert
NFAT	Nuclear factor of activated T cells
Nf-κB	Nuklearfaktor-kappaB
Nr.	Nummer
NTx	Nierentransplantation
NW	Nebenwirkung
o. g.	oben genannt
Pat.	Patient
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphat buffered saline (Waschpuffer)
PPH	Plasmapherese
PRA	Panel Reaktive Antikörper
PRES	Posteriores reversibles Enzephalopathie-Syndroms
PTC	Peritubuläre Kapillaren
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
sBAFF	lösliches BAFF
SAE	Severe adverse events (schwerwiegende unerwünschte Nebenwirkungen)
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SSC	Sideward light scatter (Seitwärtsstreulicht)
s. o.	siehe oben
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TTP	Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura
U/Min	Umdrehungen pro Minute
UPR	Antwort auf ungefaltete Proteine
z. B.	zum Beispiel

1 EINLEITUNG

Die Nierentransplantation (NTx) ist die Therapie der ersten Wahl bei Patienten mit einer terminalen Niereninsuffizienz. Nach erfolgter NTx profitieren Patienten hinsichtlich geringerer Mortalität und höherer Lebensqualität im Vergleich zu Dialysepatienten. Ferner ist eine langjährige Dialyse mit höherem finanziellem Aufwand verbunden im Vergleich zur NTx [1]–[4]. Aufgrund der weiter wachsenden Kenntnisse über die immunologischen Zusammenhänge im Kontext der Organtransplantation sowie der Entwicklung verschiedener immunsuppressiver Therapiestrategien wird heute ein hervorragendes 1-Jahres-Nierentransplantatüberleben von >95 % erzielt [2][5]. Im Gegensatz dazu zeigt sich im Langzeitverlauf nach drei, fünf und zehn Jahren eine Transplantatüberlebensrate von 86 %, 78 % bzw. 46,7 % [5][6]. Der Transplantatverlust aufgrund von Antikörper-vermittelten Rejektionen (AMR) ist immer noch ein zentrales Problem, welches Kliniker vor große Herausforderungen stellt. Die Entstehung von Spender-spezifischen Antikörpern (DSA) spielt in diesem Kontext eine wesentliche Rolle. Die Erkennung und Behandlung einer AMR lässt noch viele Fragen offen, da die zugrundeliegenden immunologischen Prozesse sehr komplex und die Therapiemöglichkeiten bislang nicht zufrieden stellend sind.

1.1 Die Nierentransplantation

1.1.1 Fakten und Zahlen

Die erste erfolgreiche NTx erfolgte bereits 1954 durch den amerikanischen Chirurgen Joseph E. Murray in Boston zwischen monozygotischen Zwillingen [7][8]. Heutzutage ist die Niere das Organ, welches am häufigsten transplantiert wird – so gab es 2014 allein in den USA über 17000 Nierentransplantationen [9]. Dies ist auf drei wesentliche medizinische Fortschritte zurückzuführen: Erstens haben sich die chirurgischen Fähigkeiten und Techniken der Operateure in den letzten Jahrzehnten verbessert. Zweitens wurde ein funktionierendes Netzwerk aus kooperierenden immunologischen Laboren entwickelt, sodass eine Bestimmung der humanen Leukozytenantigene (HLA-Typisierung) des Spenders schnellstmöglich erfolgen und der HLA-passende Empfänger ausgewählt werden kann. Drittens hat die Entwicklung und der optimierte

Einsatz verschiedener Immunsuppressiva zu einem großen Anteil an den hohen Erfolgsraten im ersten Jahr nach NTx beigetragen [10].

Die Stiftung Eurotransplant ist für die Registrierung und Verteilung von Spenderorganen in den europäischen Ländern Deutschland, Belgien, Luxemburg, Niederlande, Österreich, Ungarn, Kroatien und Slowenien zuständig [11]. Nach den Angaben von Eurotransplant wurden 2014 nur 3384 Nieren von verstorbenen Spendern und 1384 Nieren von lebenden Spendern transplantiert, während am Ende des Jahres noch 10689 Patienten auf der Warteliste zur NTx standen [12]. Lange Wartezeiten führen nicht nur zu einer höheren Morbidität und Mortalität, sondern können auch zu einem schlechteren Transplantatüberleben führen [13]. Somit zeigt sich das aktuelle Problem, dass es zurzeit nur ein geringes Angebot an zur Verfügung stehenden Spendern bei gleichzeitig hoher Nachfrage gibt. Die Spenderbereitschaft in Deutschland ist mit 10,6 pro 1 Mio. Einwohner sehr gering [12].

1.1.2 Die allogene Transplantation

Die allogene Transplantation bezeichnet eine Transplantation von Gewebe oder ganzen Organen zwischen verschiedenen Individuen derselben Spezies. Bei der Bluttransfusion ist die Übereinstimmung von AB0- und Rhesus-Blutgruppenantigenen zwischen Spender und Empfänger von höchster Bedeutung, damit es nicht zur Zerstörung der körperfremden zellkernlosen Erythrozyten durch Antikörper (Ak) des Empfängers kommt [10]. Eine zentrale Bedeutung nehmen hierbei die präformierten Isohämagglutinine ein, die körperfremde Blutgruppenantigene erkennen. Bei der Transplantation ganzer Organe werden hingegen auch kernhaltige Zellen übertragen. Es genügt in diesen Fällen nicht, dass Spender und Empfänger AB0-kompatibel sind. Hierbei ist zu beachten, dass es bei der Transplantation von Organen, die nicht mit der sog. HLA-Ausstattung des Empfängers übereinstimmen – sog. HLA-Mismatch (MM) – zu einer heftigen Abstoßungsreaktion kommen kann [10]. Vor diesem Hintergrund ist vor einer NTx auf eine möglichst große Übereinstimmung der MHC-Typen von Spender und Empfänger zu achten.

1.1.3 Die Humanen Leukozytenantigene (HLA) und Diagnostik

Bei dem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) handelt es sich um mehrere eng gekoppelte, stark polymorphe Gene – auch HLA-Gene genannt, welche auf dem Chromosom 6 lokalisiert sind [10][14][15]. Die Genprodukte des MHC sind membrangebundene HLA-Klasse-I- und –II-Proteine, auch Alloantigene genannt [15]. Die HLA-Klasse-I-Antigene (HLA-A, HLA-B und HLA-C) werden auf allen kernhaltigen Zellen sowie auf Blutplättchen exprimiert, wohingegen die HLA-Klasse-II-Proteine (HLA-DP, HLA-DQ und HLA-DR) nur auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC) wie B-Zellen, aktivierten T-Zellen, Makrophagen, Dendritischen Zellen und Endothelzellen exprimiert werden [15][16]. HLA-Antigene sind dafür verantwortlich, dass das Immunsystem die körpereigenen Zellen als solche erkennt. Sobald Zellen des Immunsystems auf Zellen treffen, die keine identischen MHC-Moleküle tragen, werden diese als fremd erkannt. Dies ermöglicht eine effiziente Erkennung fremder Eindringlinge, hat jedoch auch eine grundlegende Bedeutung bei der NTx. Mit der Erkennung der Zusammenhänge zwischen HLA-Ak und Abstoßungsreaktionen wurde zunehmend versucht, vor einer Transplantation die Empfänger und Spender mithilfe der HLA-Typisierung auf ihre MHC-Typen abzustimmen. Dies hatte eine signifikant höhere klinischen Erfolgsrate mit weniger akuten Rejektionen zur Folge [10][14]. Zurzeit werden für die NTx vor allem die HLA-A- und HLA-B-Genloci sowie HLA-DR bestimmt. Diese drei HLA-Genloci haben jeweils zwei mögliche Antigene, sodass zwischen Spender und Empfänger null bis sechs Mismatches möglich sind. Ein MM von null bedeutet, dass Spender und Empfänger diesbezüglich optimal immunologisch übereinstimmen [15].

In der HLA-Diagnostik vor NTx werden bereits verschiedene Techniken routinemäßig durchgeführt. Hierzu gehört zum einen die Messung lymphozytotoxischer HLA-Ak gegen HLA-Antigene aus dem Blut ausgewählter Spender (Lymphozytotoxizitätstest: LCT), was auch als LCT-Crossmatch bezeichnet wird [15][17][18]. Ein negatives LCT-Crossmatch bei der Auswahl eines geeigneten Spenders ist vor der NTx obligat. Zur Bewertung der Immunisierung eines Empfänger Kandidaten können lymphozytotoxische HLA-Ak gegen ein Panel von ca. 50 HLA-typisierten Blutspendern – sog. Panel Reaktiver Antikörper (PRA) – gemessen werden. Das Ausmaß der bereits entstandenen Ak gegen HLA-Antigene im Serum des Empfängers kann durch diese Panelreaktivität bestimmt werden und wird in Prozenten angegeben. Somit gibt dieser Wert an, mit wie viel Prozent der Bevölkerung der getestete Empfänger theoretisch ein positives Crossmatch aufweisen müsste [15][18]. Immunisierte Patienten haben einen PRA > 5 % [15]. Die ELISA-Technik (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest) wurde in den 90er Jahren als erste Festphase-Technik etabliert [18]. Es ist ein serologisches

Nachweisverfahren, welches zur Messung von Antigen- oder Ak-Konzentrationen verwendet wird. Der Nachweis erfolgt mittels eines gekoppelten Enzyms, welches eine farblose Substanz in ein farbiges Produkt umwandelt.

Schließlich wurde die HLA-Diagnostik durch die Einführung der hochsensitiven Luminex-Technologie revolutioniert, die sich ebenfalls der Festphase-Technik bedient, jedoch mittels Durchflusszytometrie erfolgt. Mit dieser Methode ist die einfache Erkennung von bereits sehr geringen Konzentrationen an DSA möglich geworden [17][18].

1.2 Die zelluläre und humorale Immunantwort nach Nierentransplantation

Das menschliche Immunsystem kann in die humorale und zelluläre Immunantwort unterteilt werden. Während an der zellulär vermittelten Immunantwort verschiedene Immunzellen wie z. B. Granulozyten, Makrophagen, Natürliche Killerzellen und Lymphozyten beteiligt sind, basiert die humoral vermittelte Immunantwort auf Plasmaproteinen, v. a. den Antikörpern (Ak). Die humorale Immunantwort schützt – im Gegensatz zur zellulär vermittelten Immunität – die Extrazellulärräume des Organismus [10]. Viele infektiöse Bakterien vermehren sich außerhalb von menschlichen Zellen und auch intrazelluläre Krankheitserreger wandern durch extrazelluläre Flüssigkeiten von Zelle zu Zelle [10]. Die B-Lymphozyten spielen hierbei eine entscheidende Rolle, da diese solche Antigene erkennen können. Infolgedessen vermehren und differenzieren sie sich nach einigen Proliferationszyklen zu Plasmazellen, welche spezifische Ak sezernieren können. Die produzierten Ak wiederum binden hochspezifisch an die entsprechenden Antigene und lösen daraufhin immunologische Effektorfunktionen gegen diese aus [19].

1.2.1 Die T-Zell-abhängige Antikörperproduktion

Der Großteil aller B-Zellen wird erst dann zur Ak-Produktion aktiviert, wenn dieser neben dem passenden Antigen zusätzlich mit einer T-Helferzelle in Kontakt tritt [10][19]. Diese folliculären T-Helferzellen sind sog. aktivierte CD4-T-Zellen mit der Th1, Th2- oder Th17-Untergruppe [10]. Der Cluster of Differentiation (CD) dient der Erkennung spezifischer Oberflächenmerkmale von Zellen, die sich nach biochemischen und funktionellen Kriterien ordnen lassen. Meist handelt es sich hierbei um membrangebundene Glykoproteine. Damit eine T-Helferzelle eine B-Zelle aktivieren kann, muss sie zunächst ihren spezifischen Peptid-MHC-Komplex erkennen. Dies

wird erst dann ermöglicht, wenn eine B-Zelle das Antigen ins Zellinnere schleust, prozessiert und die spezifischen Peptidbruchstücke, gebunden an MHC II, an der B-Zell-Oberfläche den T-Helferzellen präsentiert [10][19]. Diese sog. gekoppelte Erkennung setzt voraus, dass B-Zelle und T-Helferzelle aufeinandertreffen und dass diese durch dasselbe Antigen aktiviert werden, indem sie ihre spezifischen Epitope erkennen [10][19].

Angesichts der großen Bedeutung, dass sowohl B- als auch T-Helferzelle am identischen Antigen zusammenstoßen, stellt sich die Frage, wie dieses Zusammentreffen erleichtert werden kann. Es wird in etwa geschätzt, dass unter 10000 naiven Lymphozyten maximal eine einzige Zelle für ein bestimmtes Antigen spezifisch ist [10]. Zudem müssen diese Zellen im menschlichen Organismus relativ weite Entfernungen zurücklegen, zumal sich B- und T-Lymphozyten vorwiegend im peripheren Lymphgewebe sehr unterschiedlicher Regionen befinden. Alle T- und B-Zellen wandern durch sog. hochendotheliale Venolen ins Lymphgewebe ein und passieren zunächst die T-Zell-Areale [10]. Sobald eine T-Zelle im T-Zell-Bereich eines Lymphfollikels auf das für sie spezifische Antigen trifft, das von einer APC in Form eines MHC-Peptid-Komplexes präsentiert wird, werden Adhäsionsmoleküle und Chemokine aktiviert. Diese wiederum sorgen dafür, dass die entsprechende T-Zelle in der T-Zell-Zone festgehalten wird. Durch einen ähnlichen Prozess werden auch antigenspezifische B-Zellen, die ihr passendes Epitop gefunden haben, in den T-Zell-Bereichen des Lymphgewebes durch Adhäsionsmoleküle eingefangen. Somit ist die Wahrscheinlichkeit, dass die B-Zelle dort auf ihre spezifische T-Helferzelle trifft, stark erhöht. Die Bindung von CD40L (CD154) an CD40 ist essentiell, um eine T-Zell-abhängige B-Zell-Aktivierung hervorzurufen. Die CD40-CD40L-Ligation ist an dem Eintritt der B-Zellen in den Zellzyklus beteiligt, sodass diese zur Proliferation und Differenzierung zu antigensezernierenden Plasmazellen angeregt werden [10][20]–[22].

Neben der oben beschriebenen T-Zell-abhängigen Ak-Produktion können B-Zellen auch ohne T-Zell-Hilfe durch Kontakt mit dem passenden Antigen zur Ak-Produktion angeregt werden. Zu diesen Antigenen gehören Moleküle mit vielen repetitiven Epitopen wie z. B. komplexe Kohlenhydratstrukturen auf Bakterienzellwänden [10][19]. Durch eine Kreuzvernetzung der B-Zell-Rezeptoren (BCR) auf der B-Zell-Oberfläche wird ein starkes Aktivierungssignal hervorgerufen, wodurch es zur Sekretion von Immunglobulin M (IgM) kommt [19]. Auf diese Weise kann das Immunsystem bereits in einer frühen Infektionsphase sehr schnell auf viele bakterielle Erreger reagieren.

1.2.2 Die B-Lymphozyten und ihre Differenzierung

Von der Entwicklung einer unreifen B-Zelle bis hin zur ausdifferenzierten langlebigen Plasmazelle gibt es viele Zwischenstufen. Die Differenzierungen der verschiedenen B-Zell-Subpopulationen erfolgen in unterschiedlichen primären und sekundären Lymphorganen, die zum Teil weit voneinander entfernt liegen. Um diese Gewebe zu erreichen, müssen die B-Zellen die Blutgefäße passieren und werden dabei von unterschiedlichen gewebsspezifischen Chemokinen und Adhäsionsmolekülen angelockt [23][24]. Aus diesem Grund sind unterschiedliche B-Zell-Stufen auch im peripheren Blut nachweisbar. Es können in aufsteigendem Reifungsgrad fünf verschiedene B-Zell-Subpopulationen im peripheren Blut unterschieden werden: unreife B-Zellen, naive reife B-Zellen, Gedächtnis-B-Zellen, Plasmablasten und Plasmazellen. Dabei wirken unterschiedliche Signale verschiedener Zelltypen, insbesondere der Stromazellen des Knochenmarks (Retikuläre Zellen, Endotheliale Zellen und Makrophagen), auf die B-Zellen ein, um deren Proliferation, Differenzierung und Überleben zu ermöglichen [23][25].

Im Knochenmark entstehen die ersten Entwicklungsstufen der B-Zelle aus hämatopoetischen Stammzellen [23][25]–[27], welche sich über unreife B-Zellen zu naiven, reifen B-Lymphozyten differenzieren [25]. Diese naiven, reifen B-Zellen werden wir im Folgenden als naive B-Zellen bezeichnen. Sie besitzen einen B-Zell-Rezeptor, den sie zur Erkennung ihres spezifischen Antigens benötigen [25][27]. Über Blutgefäße verlassen sie das Knochenmark und zirkulieren im peripheren Blut, um zu sekundären Lymphorganen – Lymphknoten, Milz oder Mukosa assoziiertem Lymphgewebe (MALT) – zu gelangen [25]. Wenn es nicht zum Antigenkontakt kommt, sterben die naiven B-Zellen innerhalb von einigen Tagen ab [25]. Wenn naive B-Zellen jedoch ihr spezifisches Antigen im Lymphgewebe erkennen, können sie zwei verschiedene Wege einschlagen: Sie können sich zum einen in extrafollikuläre Gebiete begeben, proliferieren und schließlich zu kurzlebigen Ak produzierenden Plasmazellen ausdifferenzieren, sodass eine schnelle Abwehrreaktion gegen das spezifische Antigen erreicht wird [28]–[30]. Zum anderen können die aktivierten naiven B-Zellen in B-Zell-Follikel der sekundären lymphatischen Organe wandern, sodass ein Keimzentrum entsteht [28]–[30]. Hierbei spielt die Kostimulation durch Antigen-spezifische CD4-T-Helferzellen an der Grenze zwischen der B- und T-Zell-Zone des Lymphgewebes eine wichtige Rolle [10][19][25][28]. Durch die B-Zell-T-Helferzell-Interaktion und CD40-CD40L-Ligation wird der komplexe Prozess der follikulären Keimzentrumsreaktion ausgelöst, welcher durch eine starke Proliferation, somatische Hypermutation, Antigen-Affinitätsreifung und Isotypenwechsel charakterisiert ist [10][24][27]–[29]. Bei einem

Isotypwechsel kommt es infolge einer irreversiblen Desoxyribonukleinsäure-Rekombination (DNS-Rekombination) zur Veränderung der Ak-Klasse, wodurch eine funktionelle Vielfalt unter den Aks gewährleistet ist. Die somatische Hypermutation wird durch zufällige Punktmutationen der Ak-Gene hervorgerufen, wodurch sich zunehmend B-Zellen mit einer erhöhten Affinität für spezifische als fremd erkannte Antigene anreichern [10][19].

Nach der Keimzentrumsreaktion kann die naive B-Zelle zwei verschiedene Differenzierungswege einschlagen: Sie kann sich entweder über Plasmablasten zu Plasmazellen oder aber zur B-Gedächtnis-Zelle differenzieren [24][25][27]–[30].

Die Plasmablasten können in den sekundären Lymphorganen bleiben oder sie wandern zum Knochenmark oder in chronisch entzündetes Gewebe, um sich schließlich zu Plasmazellen auszudifferenzieren [25][26]. Im Gegensatz zu Plasmazellen sind die Plasmablasten nur ungefähr eine Woche überlebensfähig [26]. Nach der vollständigen Ausdifferenzierung zu Plasmazellen sind eine Zellteilung, Isotypwechsel und Affinitätsreifung nicht mehr möglich [26]. Plasmazellen können kontinuierlich – sogar in der Abwesenheit von spezifischen Antigenen – Ak sezernieren [22][29][31][32] und sind über mehrere Monate überlebensfähig [22][26][31]. Ob eine Plasmazelle zu den langlebigen Plasmazellen gehört, hängt davon ab, ob sie sich in einer sog. Überlebensnische aufhält, die sich meist im Knochenmark, aber auch in sekundären Lymphorganen oder in entzündeten Geweben befinden kann [22][26][31]–[33]. Dort erhalten die Plasmazellen verschiedene Überlebenssignale, welche deren Eintritt in die Apoptose verzögern. So spielen verschiedene anti-apoptotische Moleküle wie z. B. CXCL12, BAFF, APRIL, Bcl2 und IL (Interleukin)-6 eine wichtige Rolle in der Langlebigkeit der Plasmazellen [22][26][31]. Da die Anzahl der Überlebensnischen begrenzt ist, müssen die Plasmazellen um diese Nischen konkurrieren [22][26][32][34]. Aufgrund dieser ständigen Konkurrenz können ältere Plasmazellen durch neu differenzierte Plasmablasten oder Plasmazellen verdrängt werden, die wiederum andere Antigenespezifitäten zeigen und so zur Plastizität des humoralen Gedächtnisses beitragen [26][32][34][35]. Die Bedeutung dieser Überlebensnischen wird deutlich, wenn man sich die Halbwertszeiten der Immunglobuline vergegenwärtigt: Diese beträgt für Ak gegen IgD, IgE, IgM und IgA nur einige Tage und für Ak gegen IgG bis zu drei Wochen [36]. Durch die kontinuierliche Ak-Produktion in den Überlebensnischen hingegen wird ein humorales Gedächtnis aufrechterhalten, welches nach Impfungen (z. B. gegen Mumps, Masern und Röteln) oder Infektionen sogar Jahre bis Jahrzehnte überdauern kann [25][26][37].

Die Differenzierung zu einer Gedächtnis-B-Zelle ist der zweite Weg, den eine aktivierte naive B-Zelle einschlagen kann. Diese Zellen sind langlebig [10][26]. Die Gedächtnis-B-Zellen halten sich in der Milz, in der Mukosa der Tonsillen sowie auch im Knochenmark auf oder zirkulieren im peripheren Blut [29][30]. Die Gedächtnis-B-Zellen können bei erneutem Antigenkontakt proliferieren und zu Plasmablasten und schließlich zu Ak sezernierenden Plasmazellen differenzieren [29][32]. Gedächtnis-B-Zellen sind nach Antigenkontakt aufgrund ihrer starken Proliferationsfähigkeit in der Lage, sich zu weitaus mehr Ak-produzierenden Plasmazellen zu differenzieren als die naiven Zellen in der primären Immunantwort [30]. Zurückzuführen ist dies auf eine unterschiedliche Ansprechbarkeit von Gedächtnis-B-Zellen und naiven B-Zellen auf die entsprechenden Antigene, Zytokine, T-Zellen sowie dendritischen Zellen in den sekundären Lymphorganen [30].

Eine lang anhaltende humorale Immunität kann somit durch die kontinuierliche Synthese von kurzlebigen Plasmazellen und/oder durch die langlebigen Plasmazellen in den Überlebensnischen aufrecht erhalten werden [22][37].

1.2.3 Phänotypisierung der B-Zell-Populationen im peripheren Blut

Die Phänotypisierung der verschiedenen Stadien der menschlichen B-Zell-Reifung im Knochenmark und in den Lymphknoten konnte bereits sehr differenziert beschrieben werden. Die verschiedenen B-Zell-Subpopulationen im peripheren Blut hingegen erschweren aufgrund ihrer komplexen Phänotypen deren Analyse. Nachfolgend sind die Erkenntnisse zu den wichtigsten Oberflächenmolekülen zur Untersuchung der B-Zellen des peripheren Blutes dargestellt.

Das Oberflächenmolekül CD19 ist spezifisch für die B-Zellen und erlaubt somit die Identifizierung aller B-Zell-Subpopulationen im peripheren Blut [25][27]. Das membranständige Protein CD20 ist auf unreifen und naiven B-Zellen lokalisiert, befindet sich jedoch nicht oder nur in geringem Ausmaße auf zirkulierenden Plasmazellen [25][32][38]–[42]. Die naiven B-Zellen tragen den B-Zell-Rezeptor in Form von IgM⁺ und IgD⁺ auf ihrer Zelloberfläche [10][25][26][29][43]. Sie zirkulieren im peripheren Blut und haben noch keinen Antigenkontakt erfahren [27][43]. Die unreifen B-Zellen sind die Vorläuferzellen der naiven B-Zellen, können jedoch auch das Knochenmark verlassen und somit im peripheren Blut detektiert werden [23][27]. Sie sind im Gegensatz zu den naiven B-Zellen CD38 positiv [25][39]. Das

Oberflächenantigen CD27 erlaubt die Identifizierung menschlicher zirkulierender Gedächtnis-B-Zellen [30][43][44] sowie Plasmablasten und Plasmazellen [25][27][39]. Dieses Molekül wird am Ende der Keimzentrumsreaktion hochreguliert [25]. Die CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen können sowohl IgD⁺ (ohne Klassenwechsel = unswitched/non class-switched) als auch IgD⁻ (mit Klassenwechsel = class-switched) sein [43][45][46]. Es wurden zudem IgD⁻ Gedächtnis-B-Zellen beschrieben, die kein CD27 exprimieren und sich im peripheren Blut gesunder Menschen aufhalten, die sog. Doppelt negativen B-Zellen (DN-Zellen) [45][46]. Die Plasmablasten und Plasmazellen des peripheren Blutes können durch das Oberflächenmolekül CD38 von den Gedächtnis-B-Zellen unterschieden werden [25][35][44]. Da Plasmablasten und Plasmazellen nicht mehr auf eine Antigen-Stimulation angewiesen sind, sind der BCR und alle BCR-assoziierten Moleküle herunterreguliert [25]. So sind diese u. a. nur CD19^{low}, exprimieren kein bis wenig CD20 [32][35][44] und sind IgD⁻ [25]. Zirkulierende Plasmazellen zeigen eine heterogene Expression von CD138. So können sie CD138⁺ sowie auch CD138⁻ sein, wobei letztere unreifer zu sein scheinen und daher den Plasmablasten zugeordnet werden können, da diese im Gegensatz zu den CD138⁺ Plasmazellen lösliche Immunglobuline sowie CD38 weniger stark exprimieren [25][39].

1.2.4 Der B-Zell-aktivierende Faktor (BAFF)

Der B-Zell aktivierende Faktor, u. a. auch bekannt als BAFF, BLyS und CD257, ist ein Homotrimer und gehört zur Tumornekrosefaktor-Superfamilie (TNF-Superfamilie) [47][48]. Er wird von dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten exprimiert und kann in der Milz, den Lymphknoten, dem Knochenmark sowie im peripheren Blut nachgewiesen werden [21][48]–[51]. Er kann in membrangebundener Form als Transmembran-Protein existieren oder durch proteolytische Spaltung in löslicher Form (sBAFF) freigesetzt werden [21][49][52]. Der Ligand BAFF bindet an mindestens drei verschiedene Rezeptoren der TNF-Superfamilie, welche vorwiegend von B-Zellen exprimiert werden. BAFF-R, auch bekannt als BR3, ist ein spezifischer und hochaffiner Rezeptor für BAFF [52], wohingegen BCMA und TACI sowohl BAFF als auch das Protein APRIL binden [47][48][53].

Das Zytokin BAFF und seine Rezeptoren spielen eine entscheidende Rolle im Überleben, der Reifung und der Aktivierung von B-Zellen [21][47][49]–[52]. Unreife B-Zellen, die in den B-Zell-Follikeln der Milz ankommen, benötigen Zytokine und positive Signale wie BAFF, um

heranreifen und langfristig überleben zu können. BAFF kann zudem die Apoptose von Gedächtnis-B-Zellen verhindern und somit die Differenzierung von Gedächtnis-B-Zellen zu Ak-produzierenden Zellen induzieren [54]. So exprimieren Gedächtnis-B-Zellen die beiden BAFF-Rezeptoren BAFF-R und TACI [29]. Transgene Mäuse, welche BAFF im Übermaß exprimieren, weisen eine hohe B-Zell-Anzahl in der Peripherie und einen hohen Grad an Autoantikörpern auf [55]. So ist lösliches BAFF auch überdurchschnittlich stark in Seren von Patienten mit Autoimmunerkrankungen wie Systemischer Lupus Erythematoses (SLE) und Sjögren-Syndrom nachweisbar [48][55][56].

1.2.5 Die Immunglobuline

Bei den Antigenrezeptoren der B-Lymphozyten – den BCRs – handelt es sich um membrangebundene Immunglobuline [10][19]. Wenn sich eine B-Zelle zur Plasmazelle differenziert, wird auf der Ebene der Ak-RNS (Ribonukleinsäure) die Transmembrandomäne, die ein Immunglobulin in der Zellmembran einer B-Zelle verankert, durch „splicing“ entfernt. Daraufhin sezerniert die Plasmazelle lösliche Ak derselben Klasse und Spezifität wie die BCR ihrer Vorläuferzelle [10][57].

Jedes Immunglobulin besteht aus jeweils zwei identischen schweren und leichten Ketten [10]. Die Antigenbindungsstelle des BCR besteht aus der sog. variablen Region, welche einen Teil der leichten und schweren Ketten beinhaltet [10]. Je nach Art und Zusammensetzung der variablen Region ergibt sich die Antigenpezifität des BCR, wodurch sich eine enorme Vielfalt anbietet [10]. Die fünf Hauptisotypen der löslichen Ak werden durch die Struktur ihrer sog. konstanten Region in der schweren Kette unterschieden: IgM, IgD, IgG, IgE und IgA [10][36]. Zudem können die IgG-Ak in die vier Unterklassen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 und die IgA-Ak in IgA1 und IgA2 eingeteilt werden [10]. Die unterschiedlichen Hauptisotypen sowie deren Untertypen vermitteln verschiedene Effektorfunktionen. Es gibt drei verschiedene Arten der Ak-Reaktion. Zum einen können Ak Pathogene wie Viren, Bakterien oder bakterielle Toxine neutralisieren, indem sie sich an diese anheften. Dadurch sind die genannten Erreger nicht mehr in der Lage, an die spezifischen Oberflächenmoleküle von Körperzellen zu binden und in die Zellen einzudringen. Desweiteren können Ak die Aufnahme von Pathogenen in phagozytierende Zellen erleichtern (Opsonierung). Als dritte Effektorfunktion können Ak den klassischen Weg der Komplementaktivierung induzieren. Durch die Bindung von Proteinen des Komplementsystems an die Oberfläche von Pathogenen können Phagozyten dieses Pathogen mithilfe ihrer

Komplementrezeptoren erkennen und an den Infektionsherd gelockt werden oder aber das betroffene Pathogen durch Membranporen-Bildung direkt lysiert werden [10]. Neben Pathogenen können im Kontext der NTx jedoch auch körperfremde Antigene das Angriffsziel der Ak sein.

1.3 Immunsuppression nach Nierentransplantation

Um eine erfolgreiche NTx zu gewährleisten, müssen zelluläre und humorale Abwehrmechanismen des menschlichen Immunsystems überwunden werden, was angesichts der Komplexität eine enorme Herausforderung darstellt. Die zur Verfügung stehenden Immunsuppressiva hemmen nicht nur die Immunantwort auf das körperfremde NTx, sondern unterdrücken auch die allgemeine Infektabwehr [57]. Aus diesem Grunde muss ein angemessenes Gleichgewicht zwischen schädigenden und schützenden Funktionen des Immunsystems angestrebt werden.

1.3.1 Standardimmunsuppressiva

Die derzeitige Standardtherapie nach NTx besteht aus einer Induktionstherapie mit Anti-CD25-Ak, sowie einer Dreifachtherapie mit Calcineurininhibitoren (CNI), Mycophenolsäure und Kortikosteroiden [8][15][58][59]. Die sog. SYMPHONY-Studie nimmt hierbei eine Schlüsselrolle in der Untersuchung der Kombinationstherapien ein [60]. Das o. g. Therapieschema hat sich – vor allem mit niedrig dosiertem Tacrolimus – als besonders vorteilhaft hinsichtlich Transplantatüberleben, Nierenfunktion und Abstoßungsraten erwiesen. Alternativ bzw. als Reserve-Immunsuppressiva kommen außerdem Inhibitoren des mammalian target of Rapamycin (mTOR), Belatacept und verschiedene Antikörper zum Einsatz.

1.3.1.1 Kortikosteroide

Die Kortikosteroide wie Prednisolon (Decortin H®) und Methylprednisolon (Urbason®) leiten sich pharmakologisch von Steroidhormonen der Glukokortikoidfamilie ab [10]. Die Glukokortikoide gehören heutzutage zur Standardtherapie zur Reduktion von Entzündungsreaktionen und der Autoimmunaktivierung bei verschiedensten Krankheiten wie

z. B. Asthma, Allergien sowie rheumatischen, vaskulären und dermatologischen Erkrankungen [61]. Sie wirken stark entzündungshemmend, indem sie über die Bindung an zytoplasmatische Glukokortikoidrezeptoren die Synthese von Entzündungsmediatoren wie Zytokine, Prostaglandine, Leukotriene, Sauerstoffradikale und Stickoxide verringern [10][57]. Weiterhin unterbinden sie die Expression von Adhäsionsmolekülen, sodass die Einwanderung von Leukozyten aus Blutgefäßen in den Entzündungsherd vermindert wird. Außerdem induzieren die Kortikosteroide durch eine erhöhte Endonukleaseaktivität die Apoptose bei Lymphozyten und Eosinophilen. Aufgrund ihrer antiinflammatorischen und immunsuppressiven Wirkung werden die Kortikosteroide bereits seit den ersten Nierentransplantationen in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts zur Verhinderung von nachfolgenden Abstoßungsreaktionen eingesetzt [62][63].

Da Kortikosteroide die Expression vieler verschiedener Gene in unterschiedlichen Geweben regulieren, sind die Auswirkungen einer Steroidtherapie sehr komplex und nicht nur auf eine Entzündungshemmung beschränkt. So sind endokrine, gastrointestinale, muskuloskeletale, kardiovaskuläre, dermatologische, okkuläre, immunologische Veränderungen bis hin zu neuropsychiatrischen Nebenwirkungen nach Kortikoidgabe bekannt [61]. Um die Konzentration an Kortikosteroiden und deren Nebenwirkungen (NW) zu verringern, werden nach NTx zusätzlich andere Immunsuppressiva verabreicht [10].

1.3.1.2 Proliferationshemmer /Hemmer der IMPDH

Mycophenolatmofetil (MMF, CellCept®) und Mycophenolsäure (MPA, Mofetil®) üben ihre Wirkung über den aktiven Metaboliten MPA aus, welcher ein starker und reversibler Inhibitor der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) ist [10][15][64]. IMPDH ist das zentrale Enzym der de-novo-Synthese von Guanosintriphosphat bzw. von Purinen, welche letztlich eine wichtige Rolle in der Proliferation der T- und B-Lymphozyten einnimmt. Auf diese Weise beeinflusst MPA u. a. die Leukozytenadhäsionsmoleküle und führt zur Apoptose von Lymphozyten, Unterdrückung der Zytokinsynthese und verringerten Expression von Lymphozyten-Oberflächenmolekülen. Aufgrund dieser vielfältigen Auswirkungen auf das Immunsystem und weil es weder kardiovaskulären Nebenwirkungen verursacht noch nephrotoxisch ist, gehört MPA zu den wichtigsten Immunsuppressiva nach NTx [64]. Dennoch kann es bei hohen Konzentrationen gehäuft gastrointestinale Störungen hervorrufen. Mycophenolat-Natrium (Myfortic®) ist eine magensaftresistente Form von MPA, welche entwickelt wurde, um diese gastrointestinalen Komplikationen zu minimieren und somit eine

Reduktion oder Unterbrechung der MPA-Gabe aufgrund von GIT-Störungen möglicherweise zu verhindern [64][65].

1.3.1.3 Calcineurininhibitoren (Cyclosporin A, Tacrolimus)

Cyclosporin A (CyA: Sandimmun®, Sandimmun Optoral®) und Tacrolimus (Prograf®, Advagraf®) bilden die Gruppe der CNI. CyA wurde bereits 1978 als Immunsuppressivum nach NTx eingesetzt [66]. Nach der Einführung von Tacrolimus in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts [8] wird dieses aufgrund der aktuellen Studienlage heutzutage als CNI-Standard im Transplantationssetting eingesetzt und hat CyA weitgehend abgelöst [8][60].

CNIs wirken hauptsächlich auf T-Helfer-, aber auch auf T-Supressor-Zellen sowie zytotoxische T- und B-Zellen [8]. Sie durchdringen die Zellmembran und binden an intrazelluläre Immunophiline, wodurch die Signalübermittlung in T-Zellen verhindert wird. CyA bindet an Cyclophilin und Tacrolimus bindet an FKBP12 [8][10][57]. Dies führt zur Inhibition der kalzium- und calmodulinabhängigen, zytoplasmatischen Phosphatase Calcineurin, wodurch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors nuclear factor of activated T cells (NFAT) beeinträchtigt wird [8][10][57]. Dies wiederum verhindert die Transkription unterschiedlicher Zytokin-Gene wie IL-2 und somit wird insbesondere die T-Zell-Aktivierung unterdrückt, wodurch schließlich die T-Zell-abhängige Ak-Produktion inhibiert wird [8][10][57].

CNIs wirken nicht nur spezifisch auf die Hemmung von NFAT, sondern haben eine pluripotente Wirkung auf eine Vielzahl von Stoffwechselfunktionen. So können neben der akuten und chronischen Nephrotoxizität auch Diabetes mellitus, Dyslipidämie, Neurotoxizität, Hypertonie, virale Infektionen sowie ein Neuauftreten von Karzinomen zu den vielfältigen Nebenwirkungen gehören [8][58][67][68]. Tacrolimus hat in vitro eine zehnfach stärkere Wirkung als CyA, ein besseres Nutzen-Risiko-Profil und geringeres nephrotoxisches Potential [8]. Es ist jedoch im Vergleich zu CyA häufiger für das Neuauftreten von Diabetes mellitus verantwortlich und besitzt ein stärkeres neurotoxisches Potenzial [8][15]. Um das Risiko der Nephrotoxizität zu minimieren und somit die Langzeit-Überlebensraten zu verbessern, beschäftigen sich viele Studien mit der Reduktion der Calcineurin-Inhibitoren bzw. deren Umstellung auf andere Immunsuppressiva [8][67]–[69]. An dieser Stelle sind insbesondere die Ergebnisse der SYMPHONY-Studie [60] sowie der ZEUS-Studie [67] hervorzuheben.

1.3.1.4 mTOR-Inhibitoren

Sirolimus (Rapamycin, Rapamune®) inhibiert infolge der Bindung an das Immunophilin FKBP12 den mTOR-Komplex [10][58]. So inhibiert es die B-Zell-Proliferation, die Ak-Synthese und die Interferon-Produktion durch Dendritische Zellen und greift in die T-Zell-Signalwege und Differenzierung der regulatorischen T-Zellen ein [58]. Positiv hervorzuheben ist seine anti-atherogene sowie antikanzerogene Wirkung [58]. Everolimus (Certican®) ist ein Derivat des Sirolimus, weshalb sich deren Wirkungsmechanismen und NW stark ähneln. Bekannte NW sind Stomatitis, Thrombopenie, Leukopenie, Anämie, Hyperlipidämie, Proteinurie, Ödeme, Diarrhoe und Akne [15][58]. Einsatz finden die mTOR-Inhibitoren vermehrt zum Ersatz der nephrotoxischen CNIs [58][67]. Sowohl in der ZEUS-Studie [67][70][71] als auch in der Herakles-Studie [72] wurden Patienten mit einer initialen Cyclosporin-Medikation auf eine CNI-freie Medikation mit Everolimus umgestellt. Hierbei konnten bessere Nierenfunktionswerte, jedoch auch ein erhöhtes Auftreten von DSAs und akuten Rejektionen in der CNI-freien Studiengruppe beobachtet werden [73].

1.3.2 Antikörper im Kontext der Induktionstherapie

Zur Vermeidung von frühen Abstoßungsreaktionen werden spezielle Ak nach einer NTx eingesetzt. Monoklonale Ak sind am besten in Mauszellen herzustellen, jedoch wirken diese Maus-Ak im menschlichen Organismus immunogen. Damit die Immunglobuline nicht vom menschlichen Immunsystem als fremd erkannt werden, müssen sie humanisiert werden. Der Anti-CD25-Ak Basiliximab (Simulect®) wird zur Induktionstherapie nach NTx eingesetzt [8][15]. Dieser bindet an die Alpha-Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) von aktivierten T-Zellen und blockiert diese daraufhin für acht bis zwölf Wochen [15], wodurch die Vermehrung von T-Lymphozyten unterschiedlichster Spezifitäten verhindert wird [19]. Neben monoklonalen Ak können auch polyklonale T-Zell-depletierende Immunglobuline zur Immunsuppression eingesetzt werden. Die Anti-Thymozyten-Globuline (ATG, Thymoglobulin®) sind polyklonale Ak aus Pferden oder Kaninchen, die zuvor gegen menschliche Lymphozyten immunisiert wurden und somit die Lymphozyten des menschlichen Organismus angreifen können.

1.3.3 Belatacept

Belatacept (Nulojix®) ist ein Fusionsprotein, welches das costimulatorische Signal über den CD28-Rezeptor und dadurch selektiv die T-Zell-Antwort unterbinden kann [8][59]. Belatacept, welches 2011 in Deutschland für Patienten nach NTx zugelassen wurde, spielt eine besondere Rolle im Rahmen der CNI-freien Immunsuppression [8][58]. So wurde bereits ein deutlich besseres Transplantat- und Patientenüberleben nach langjähriger Therapie mit Belatacept im Vergleich zu CyA festgestellt [59]. In einer Studie von Brakemeier et al. [74] wurden NTx-Patienten aufgrund von toxischen CNI- oder mTOR-induzierten NW auf Belatacept umgestellt mit dem Resultat einer signifikant besseren NTx-Funktion. Nachteilhaft bei der Anwendung von Belatacept sind das verstärkte Auftreten von akuten Abstoßungsreaktionen innerhalb der ersten Monate nach NTx sowie das erhöhte Risiko für lymphoproliferative Erkrankungen [8].

1.4 Transplantat-Rejektion

Eine Transplantatabstoßung entsteht infolge einer komplexen Wechselwirkung zwischen alloreaktiven T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und Mediatoren wie Zytokinen, Adhäsionsmolekülen, Chemokinen, IL-1 und TNF- α . Mit Einführung der Banff-Klassifikation im Jahre 1991 wurde die Erfassung, Graduierung und diagnostische Kategorisierung histopathologischer Befunde in NTx-Biopsien auf internationalem Niveau ermöglicht. Hinsichtlich des Abstoßungsgeschehens für Nierentransplantate können grob sechs verschiedene Kategorien unterschieden werden (Tab. 1). Da der Fokus dieser Studie auf der AMR liegt, wird im Folgenden näher darauf eingegangen.

Tab. 1: Banff-Klassifikation der Rejektionen nach NTx [15]

Banff	Befund
1	Normalbefund (nicht pathologisch)
2	Humorale Rejektion (AMR)
3	Borderline-Rejektion
4	Akute zelluläre Rejektion (ACR)
5	Interstitielle Fibrose bzw. tubuläre Atrophie im Sinne eines chronischen Transplantatschadens
6	Histopathologische Veränderungen, die nicht auf eine Abstoßungsreaktion zurückzuführen sind

1.4.1 Humorale Rejektion

Der humorale Teil des Immunsystems spielt – wie oben bereits erwähnt – eine wichtige Rolle bei der Abwehr extrazellulärer Pathogene. Jedoch kann dieser über seine spezifischen Ak auch körperfremde Antigene des Transplantates erkennen und somit schädlich für das transplantierte Organ sein. Im Allgemeinen bezeichnet die AMR alle Rejektionen, die durch Ak gegen spenderspezifische HLA-Antigene, Blutgruppen-Antigene oder Nebenhistokompatibilitätsantigene bzw. Antigene von Endothelzellen ausgelöst werden [16][40]. Eine AMR tritt bei ungefähr 2-10 % aller nierentransplantierten Patienten auf [41][75]–[79]. Es können drei AMR-Formen unterschieden werden: Die hyperakute AMR wird durch hohe Titer von bereits vorgeformten spenderspezifischen Alloantikörpern gegen HLA-Antigene oder Blutgruppen-Antigene verursacht und tritt meist bereits innerhalb von Minuten bis einige Stunden nach der NTx auf [40][41][80]. Diese Art der Abstoßung ist jedoch sehr selten geworden, da vor jeder NTx ein HLA-Crossmatch-Test von Empfänger und Spender erfolgt und die AB0-Kompatibilität überprüft wird [40][41]. Die frühe aktive AMR tritt meist in den ersten Wochen nach der NTx auf und verursacht eine plötzliche Verschlechterung der Transplantatfunktion [40][75][80]. Eine AMR kann jedoch auch erst Monate oder Jahre nach einer NTx auftreten [3][75] und wird dann als späte/chronische aktive AMR bezeichnet. Die Differenzierung der AMR in eine frühe und eine späte Form wird nicht einheitlich definiert. So kann die frühe aktive AMR innerhalb der ersten 3 bzw. 6 Monate (M) und die späte aktive AMR frühestens 3 bzw. 6 M nach NTx auftreten [37][81].

Die Alloantikörper greifen bevorzugt die peritubulären und glomerulären Kapillaren des Spenderorgans an [16][40][80]. So heften sich HLA-Ak an das Endothel und können über die Bindung des Komplementprotein C1q den klassischen Weg der Komplementkaskade aktivieren [42]. Komplementfaktoren binden wiederum an Antigen-Ak-Komplexe auf den Endothelzellen des Transplantates und verursachen letztendlich im Rahmen der Komplementkaskade eine Zerstörung der betroffenen Zellen [41]. Außerdem trägt das aktivierte Komplementsystem zur Rekrutierung von Neutrophilen und Makrophagen und Synthese von Entzündungsmarkern bei, welche weitere Transplantatschäden hervorrufen [16][41]. Der Nachweis des Komplementfaktors C4d in Biopsieschnitten des Transplantats, welcher als ein Endprodukt der Komplementkaskade gilt, ist ein zuverlässiger Marker der Komplementaktivierung und Ak-Aktivität [40][82]. Hierbei spielt insbesondere die Färbung der C4d-Ablagerungen in den peritubulären Kapillaren (PTC) eine entscheidende Rolle [40][75][76]. Es wurde festgestellt,

dass C4d-Ablagerungen mehrheitlich mit der Anwesenheit von DSA in Verbindung stehen [3] [41][75][76][80][82]. Die Abwesenheit von C4d-Ablagerungen im NTx schließt nicht grundsätzlich eine AMR aus. So spielt die Ak-vermittelte, aber komplementunabhängige Aktivierung von Endothelzellen sowie auch von natürlichen Killerzellen und Makrophagen eine Rolle in der Entstehung der AMR, welche jedoch seltener und eher bei der chronischen Form beobachtet wird [16][41][83][84]. Daher wurde in der 12. Banff-Konferenz im Jahre 2013 die C4d-negative AMR in die Banff-Klassifikation aufgenommen [85].

Ak gegen HLA-Antigene entwickeln sich T-Zell-abhängig als Antwort auf einen Kontakt mit allogenen HLA-Proteinen. Ein besonderes Risiko stellen HLA-Ak dar, welche spenderspezifisch sind. Die Anwesenheit der zirkulierenden DSA erhöht das Risiko einer AMR [81] und eines späten Transplantatverlustes [77][86]–[88]. Diese DSA können bereits vor NTx vorhanden sein, sie können aber auch nach der Transplantation de novo entstehen [81][78]. Patienten, die durch vorausgehende Transplantationen [37], Schwangerschaften, Bluttransfusionen oder Infektionen vorsensibilisiert sind, also vermehrt Ak gegen HLA-Antigene besitzen, haben ein hohes Risiko, eine frühe AMR zu entwickeln [41][81][89]. Die histologischen Charakteristika der frühen AMR sind die Margination von Neutrophilen in den PTCs, Glomerulitis und C4d-Ablagerungen [42]. Histologische Zeichen der späten chronischen AMR sind typischerweise eine Transplantatglomerulopathie (cg) und chronische Transplantatvaskulopathie (cv) [16][40][42] [80][81]. Akute und chronische Veränderungen überschneiden sich jedoch oft [81].

1.5 Therapiemöglichkeiten der humoralen Rejektion

Trotz der verbesserten Kenntnisse über die zellulären und humoralen Mechanismen einer AMR und neuer immunsuppressiver Therapiemöglichkeiten gehört die AMR zu den größten Risikofaktoren für einen Transplantatverlust. Eine AMR kann oftmals nicht mit einer konventionellen Abstoßungstherapie rückgängig gemacht werden [40][75][90][91]. Die Therapiekosten sind vergleichsweise hoch, die Aufhebung der AMR vollzieht sich – wenn überhaupt - sehr langsam und es entwickelt sich üblicherweise nach Therapie der AMR eine chronische Form der Abstoßung [92].

Bisher gibt es keine speziell für die AMR-Therapie zugelassenen Medikamente und die Daten bezüglich der AMR-Therapie beschränken sich noch auf Fallberichte und verhältnismäßig kleine

retrospektive Studien [41]. Noch immer besteht diesbezüglich ein hoher medizinischer Bedarf für NTx-Patienten [93]. Die KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) hat in ihrer Leitlinie aus dem Jahre 2009 [94] zur Behandlung einer akuten AMR empfohlen, dass mindestens eines der folgenden Therapiemöglichkeiten – mit oder ohne Einsatz von Kortikosteroiden – zur Anwendung kommen sollte: PPH (Plasmapherese), IVIg, Anti-CD-20-Ak und/oder Lymphozyten-depletierende Ak.

In der Entstehung der humoralen Abstoßung spielen die B-Zellen und Ak innerhalb des Transplantates eine entscheidende Rolle und sollten daher die Hauptangriffspunkte der Therapie sein. So werden die schädlichen zirkulierenden Ak mithilfe von PPHs entfernt [40]–[42]. Die PPH ist ein Verfahren, welches Proteine mit einem hohen Molekulargewicht (Ak, Gerinnungsfaktoren, Komplementfaktoren) aus der Blutzirkulation entfernt [42]. Langfristig können PPHs die DSA-Werte jedoch nicht niedrig halten, da sie keinen Einfluss auf die Ak-Synthese nehmen [40][95]. Die PPH wird generell gut vertragen, aber es wurden bereits milde Formen der Anämie, Thrombozytopenie und Koagulopathie als NW beobachtet [42].

Weiterhin werden niedrig- (100mg/kg) oder hochdosierte (1-2g/kg) intravenöse Immunglobulingaben (IVIg) einmal oder aber in wiederholten Dosen zur Neutralisierung der Ak verwendet [40][41][90][96]. Für die IVIg wird ein Plasmapool von 50.000-100.000 gesunden menschlichen Spendern zusammengestellt [40]. Es besteht hauptsächlich aus IgG verschiedenster Spezifitäten, enthält jedoch auch Dimere, Fab-Fragmente sowie kleinste Anteile von IgM und IgA [40]. Die Halbwertszeit der IVIg beträgt 3-4 Wochen [41]. Die immunologisch vermittelte Wirkweise der IVIg ist komplex. Die wichtigsten Eigenschaften liegen in der Unterdrückung der Ak-Synthese, einer anti-idiotypische Aktivität gegen zirkulierende DSAs mit einer daraus resultierenden Neutralisierung derselben und die Inhibition der Komplementaktivierung, der Fc-Rezeptoren sowie der T- und B-Zellfunktion. Zytotoxische Zytokine werden ebenfalls in ihrer Wirkung inhibiert [69][71][79]. Die IgG-Moleküle können im Empfänger mit löslichen Antigenen reagieren und als lösliche Immunkomplexe an das inhibitorische FcγRIIB auf B-Zellen binden. Infolgedessen entsteht eine Kreuzvernetzung dieser Rezeptoren, sodass eine Suppression der betroffenen Zellen erfolgt [19]. Im Kontext der NTx werden IVIg oftmals in experimentellen Therapie-Protokollen bei einer akuten oder chronisch aktiven AMR bei vorbekannten DSAs eingesetzt [40][42]. Neben den immunologisch vermittelten Wirkweisen führt die Therapie mit IVIg zu einer Reduktion von Infekten bei

behandelten Patienten [41], da wichtige Gammaimmunglobuline geliefert werden, die dem Körper während einer beispielsweise notwendigen PPH verloren gegangen sind [40].

Der Anti-CD-20-Ak Rituximab kann die zirkulierenden CD20⁺ B-Zellen stark depletieren [40], während der Proteasom-Inhibitor Bortezomib die reifen Ak-produzierenden Plasmazellen entfernen kann [41][97][98].

Die intravenöse Gabe des monoklonalen C5-Antikörpers Eculizumab (Soliris®) hat in Einzelfallberichten bereits Erfolge in der Behandlung der AMR zeigen können [40]–[42][90]. Eculizumab bindet spezifisch und mit hoher Affinität an das Komplementprotein C5, wodurch dessen Spaltung in die Fragmente C5a und C5b blockiert und die Bildung des terminalen Komplementkomplexes C5b-C9 verhindert wird [40][42]. Dies wiederum hat eine Hemmung der terminalen komplementvermittelten endothelialen Zellyse zur Folge [42]. Aufgrund der hohen Kosten wird dieses Medikament jedoch nur selten im Rahmen der AMR-Therapie eingesetzt und am ehesten nur dann, wenn andere Medikamente keinen Erfolg zeigten [41].

Eine Steroidpulstherapie (250-500 mg Prednisolon/Tag i.v. für 3-5 Tage) wird oftmals begleitend zur Therapie der AMR eingesetzt, da so zum einen die zelluläre Rejektionskomponente behandelt wird und zum anderen die Steroide über die Suppression der T-Helferzellen indirekt hemmend auf B-Zellen wirken können [40].

Bezüglich der Erhaltungstherapie nach AMR sind MMF und Tacrolimus empfehlenswert, weil MMF mit Tacrolimus bei Patienten mit einer AMR die B-Zell-Antwort einschränken kann [40].

Im Folgenden wird genauer auf Rituximab und Bortezomib eingegangen, da diese aufgrund ihrer Wirkung eine besondere Rolle im Rahmen der AMR-Therapie einnehmen.

1.5.1 Rituximab

Rituximab wird unter dem Handelsnamen MabThera® von Roche in der EU verkauft. Es ist ein humanisierter monoklonaler Ak gegen das membranständige CD20-Antigen und gehört zur IgG1-Unterkategorie. Die variable Domäne von Rituximab bindet mit hoher Affinität an CD20 und führt schließlich zur Zerstörung der CD20-positiven Zelle. Dadurch werden sowohl maligne als auch normale unreife und reife B-Zellen eliminiert, jedoch keine Plasmazellen [40][41].

Die Zerstörung der zirkulierenden B-Zellen durch Rituximab wird über drei wesentliche Mechanismen vermittelt: Es erfolgen eine komplementabhängige Zytotoxizität, eine Ak-

vermittelte Zytotoxizität sowie die Induktion der Zellapoptose [40][42][105]. In verschiedenen klinischen Studien konnte bereits eine effektive B-Zell-Reduktion durch Rituximab nachgewiesen werden [38][99][100]. Rituximab ist zugelassen zur Behandlung von Rheumatoider Arthritis und Non-Hodgin-Lymphomen [41], findet jedoch auch Anwendung in der Therapie von humoralen Abstoßungen nach NTx [40][41][99].

Es wird intravenös über einen Zeitraum von ca. vier Stunden verabreicht und kann gegebenenfalls in einem Abstand von zwei Wochen wiederholt werden. Nach Rituximabtherapie wurden bereits vermehrt bakterielle Infektionen sowie Infektionen durch CMV, Herpes-Zoster-Viren, Polyomavirus und Pilze beobachtet [41][79][101]. Neben Infektionen können u. a. Infusionsreaktionen, Fieber, Schüttelfrost, Lymphopenie und Neutropenie beobachtet werden [40][41].

1.5.2 Bortezomib

Bortezomib (Velcade®) ist der erste zugelassene Proteasom-Inhibitor [102] und stellt eine modifizierte Dipeptidyl-Boronsäure dar [40][103]. Bortezomib bindet mit hoher Selektivität an das 26S-Proteasom [103]. Dies ist ein Multienzym-Komplex und kommt im Zytoplasma und Zellkern aller eukaryotischer Zellen vor [102]–[104]. Das 26S-Proteasom besteht aus einem 20S-Kern, an dessen beiden Enden sich jeweils eine 19S-regulatorische Untereinheit befindet [102]. Der 20S-Kern wiederum setzt sich aus vier gestapelten Heptamer-Ringen zusammen: die beiden äußeren Ringe sind sog. α -Ringe und die beiden inneren Ringe werden als β -Ringe bezeichnet [102][104][105]. Innerhalb der β -Ringe gibt es jeweils drei verschiedene proteolytisch aktive Untereinheiten: eine Chymotrypsin-artige, eine Trypsin-artige und eine Caspase-artige [102][104][106]. Die α -Ringe formen einen schmalen Kanal und kontrollieren den Eintritt von Proteinen [104][107]. Das 26S-Proteasom ist für den Abbau bzw. Umbau von überzähligen, defekten oder missgefalteten Proteinen zuständig [103]. Dazu gehören Proteine, die in die Zell-Zyklus-Regulation, Onkogenese und Apoptose involviert sind: Tumor-Suppressor-Faktoren, Zell-Zyklus-regulierende Proteine (Zykline), Transkriptionsfaktoren, inhibitorische Moleküle und anti-apoptotische Proteine [102][104][108]. Bevor ein Protein vom Proteasom erkannt werden kann, muss eine Proteinmarkierung erfolgen, auch Ubiquitinierung bzw. Ubiquitin-Proteasom-System genannt [102][104].

Bortezomib bindet reversibel an die Untereinheit des 20S-Kerns, die eine Chymotrypsin-artige proteolytische Funktion hat [40]. So inhibiert es den Abbau verschiedener intrazellulärer Proteine und stört die zelluläre Homöostase. Proteasomen sind für die Erzeugung der meisten Antigenpeptide verantwortlich, die als Liganden für MHC-Klasse-I-Proteine dienen [105]–[107]. Somit inhibiert Bortezomib – durch seinen Einfluss auf das Ubiquitin-Proteasom-System – die Antigenprozessierung sowie die Antigenpräsentation auf MHC Klasse-I-Molekülen [95][105][106].

Der Transkriptionsfaktor Nuklearfaktor-kappaB (NF-κB) ist an das Inhibitor-Protein IκB gebunden und kann durch das 26S-Proteasom aktiviert werden [102]. In dieser Form kann er u. a. die Transkription von Wachstumsfaktoren (Interleukine), Zell-Adhäsions-Molekülen und anti-apoptotischen Faktoren (z. B. BCL2) aktivieren [102]. Bortezomib inhibiert die Aktivierung von NF-κB [40][102][103][108][109], indem es dafür sorgt, dass IκB an NF-κB gebunden bleibt [109]. Desweiteren kann eine Apoptose ausgelöst werden durch sog. ER-Stress [103][109]. Im endoplasmatischen Retikulum (ER) erfolgt die Synthese und Faltung von Proteinen, was essentiell für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase ist. Wie bereits oben erwähnt, verhindert Bortezomib die Entfernung miss- und ungefalteter Proteine. Um die erhöhte Menge dieser Proteine im ER abzubauen, wird zum Schutz die sog. Antwort auf ungefaltete Proteine (UPR) ausgelöst [108][109]. Wenn der ER-Stress zu groß wird, führt dies zur Apoptose der betroffenen Zelle [103][108]–[110].

Aufgrund der vielfältigen Funktionen der Proteasomen wird deutlich, dass Bortezomib wesentliche inhibitorische Auswirkungen sowohl auf Plasmazellen als auch auf T-Zellen und dendritische Zellen hat [40][92][111]. Bortezomib kann intravenös oder subkutan injiziert werden [41]. Dies erfolgt üblicherweise an den Tagen 1, 4, 8 und 11 und wird daraufhin für zehn Tage unterbrochen, um bei Bedarf einen erneuten Zyklus zu verabreichen [90]. Pro Injektion wird eine Dosis von 1,3mg/m² Körperoberfläche für 3-5 Sekunden empfohlen [40].

Krebszellen oder andere sich schnell teilende und metabolisch aktive Zellen reagieren sehr empfindlich auf Bortezomib [42][102][103]. Aufgrund seiner Effektivität in der Behandlung des multiplen Myeloms ist Velcade® seit 2010 als erster Proteasom-Inhibitor für die Therapie dieser malignen Plasmazell-Erkrankung in den USA zugelassen [90][102]. Da Plasmazellen mehrere tausend Ak pro Sekunde synthetisieren können, haben sie ein stark entwickeltes ER [31][108][112]. Diese ausgeprägte Stoffwechselaktivität wiederum macht sie sehr empfindlich für Proteasom-Inhibitoren, sodass es durch exzessiven ER-Stress schließlich zum Zelltod kommt

[95][110]. Als Off-Label-Use wird Bortezomib daher immer häufiger in der Therapie der AMR angewendet, bei der eine Überaktivität von Ak-sezernierenden Plasmazellen vorliegt [95]. Es ist das erste Medikament in der Immunsuppression, welches reife Plasmazellen angreifen kann [89][92][98][113][114]. Der Einsatz von Bortezomib in der Behandlung der AMR konnte bereits in mehreren Studien zu einer histologischen und klinischen Funktionsverbesserung des NTx sowie zu einer Verringerung der DSA beitragen [95].

Bortezomib hat ein relativ günstiges NW-Profil [90][95]. Übliche NW sind Anämie, Thrombozytopenie, gastrointestinale Störungen (GIT-Störungen), Appetitlosigkeit, Abgeschlagenheit, Hypotonie, Konjunktivitis und periphere Neuropathie, welche in den meisten Fällen nur vorübergehend sind [40][41][92][95][115]. Allerdings kann die periphere Neuropathie in seltenen Fällen irreversibel sein [42].

1.6 Fragestellung

Schwerpunkt dieser Studie ist die humoral vermittelte Abstoßung bei Patienten nach NTx. Diese Form der Abstoßung ist bis heute nur schwer therapierbar, sodass die Langzeiterfolge in den meisten Fällen sehr unbefriedigend sind. Da die schädliche Wirkung von DSAs die zentrale Rolle bei humoralen Abstoßungen spielt, machten wir an der Charité insbesondere diese Ak zum Ziel unserer AMR-Therapie. So zielten wir mit dem Einsatz von PPHs und IVIg darauf ab, zirkulierende Ak aus dem Körper zu entfernen und zu neutralisieren. Daneben kamen Rituximab und Bortezomib zum Einsatz, um die verschiedenen Stadien der B-Zellen anzugreifen und synergistische Effekte zu erzielen. Schließlich wurden aufgrund der Interaktion zwischen T- und B-Zellen auch Steroide eingesetzt, welche einen inhibitorischen Effekt auf T-Zellen ausüben.

Im Kontext dieses neuartigen Therapieansatzes sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Gibt es spezifische demografische Charakteristika bei Patienten mit AMR?
- 2) Kann durch die potente AMR-Therapie eine langfristige klinische Funktionsverbesserung des NTx bei einem gleichzeitig günstigen Nebenwirkungsprofil erreicht werden?
- 3) Haben AMR-Patienten eine andere Verteilung verschiedener B-Zell-Populationen im peripheren Blut als NTx-Patienten mit stabiler Transplantatfunktion und inwiefern ändern sich diese B-Zellpopulationen – insbesondere die Plasmazellen – infolge der B-Zell-depletierenden AMR-Therapie?
- 4) Gibt es zwischen AMR-Patienten und NTx-Patienten mit stabiler Transplantatfunktion Unterschiede in den sBAFF-Konzentrationen und kommt es nach der B-Zell-depletierenden AMR-Therapie zu einem nachweisbaren signifikanten Anstieg der sBAFF-Konzentration?
- 5) Kommt es infolge der Bortezomib-basierten AMR-Therapie zur langfristigen Reduktion der zirkulierenden DSA und werden zudem die langlebigen protektiven Ak gegen Mumps, Masern und Röteln beeinflusst?

2 Methodik

2.1 Versuchsteilnehmer und Blutentnahmen

Die Studiendurchführung wurde von der Ethikkommission mit der Antragsnummer EA1/192/11 genehmigt. Es nahmen insgesamt 10 Patienten mit humoraler Rejektion an dieser prospektiven Studie teil, welche zuvor bei vorausgegangener Aufklärung eine Einverständniserklärung unterzeichnet haben. Diese Patientengruppe wird im Folgenden als AMR-Gruppe bezeichnet und wurde im Zeitraum vom November 2011 bis Januar 2013 in die Studie aufgenommen. Der AMR-Gruppe wurden zwei Kontrollgruppen gegenübergestellt, welche über einen Zeitraum von mindestens drei Monaten eine stabile NTx-Funktion und auch keine Abstoßungsreaktionen aufwiesen. Die erste Kontrollgruppe (C_DSA⁻) besteht aus 10 NTx-Patienten, bei denen keine DSA nachweisbar waren und die zweite Kontrollgruppe (C_DSA⁺) aus 12 NTx-Patienten mit neu aufgetretenen DSA gegen das NTx. Die Patienten dieser beiden Kontrollkollektive wurden ebenso über die Studie aufgeklärt und haben daraufhin eine Einverständniserklärung unterschrieben. Bezüglich des Transplantatüberlebens erfolgte eine Beobachtungszeit von drei Jahren.

In regelmäßigen Abständen wurde den Patienten der AMR-Gruppe insgesamt pro Untersuchungstag ein Blutvolumen von ca. 16 ml aus den Kubitalvenen (Venen der Ellenbeuge) abgenommen, um jeweils ein 10 ml-Plasma-Röhrchen (Lithium-Heparin) und 6 ml-Serum-Röhrchen zu erhalten. Der Baseline-Zeitpunkt (BL) bezeichnet die Blutentnahme im Zeitraum AMR-Diagnose bis zum Beginn der AMR-Therapie. Die weiteren Blutentnahmen erfolgten zu den Monaten (M) 1 (½-2 M nach Behandlungsbeginn), 3 (2-4 M nach Behandlungsbeginn), 6 (4-8 M nach Behandlungsbeginn), 9 (8½-11 M nach Behandlungsbeginn), 12 (10-14½ M nach Behandlungsbeginn), 18 (14½-20½ M nach Behandlungsbeginn) und 24 (22-26 M nach Behandlungsbeginn). Den Patienten der beiden Kontrollgruppen wurde einmalig Blut entnommen. Die Blutentnahmen erfolgten während des stationären Aufenthaltes bzw. der ambulanten Betreuung und wurden an die regulär durchgeführten Blutabnahmen gekoppelt, sodass keine zusätzliche Punktion erfolgen musste. Die Verarbeitung des Blutes erfolgte spätestens vier Stunden nach Entnahme. Das Heparin-Blut wurde bei Raumtemperatur (RT) und Dunkelheit gelagert, bis es für die Durchflusszytometrie gefärbt wurde. Das Serum wurde

hingegen bei ca. 5°C dunkel gelagert, bis es für 5 Min (Minuten) bei 3000 U/Min (Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert und anschließend bei ca. -80°C tiefgekühlt wurde.

2.2 AMR-Diagnose und –Definitionen

2.2.1 Klinische Parameter

Nach der Banff-Klassifikation, welche bis 2015 mehrmals überarbeitet wurde, gibt es für die akute und chronische AMR nach NTx folgende typische immunhistologische, morphologische und/oder serologische Diagnosekriterien [85][89][116]: 1) histologischer Nachweis eines Ak-vermittelten Schadens, 2) positive C4d-Färbung in den PTC des NTx und/oder Anwesenheit von neu auftretenden zirkulierenden DSA im Patientenserum und 3) klinisch nachweisbare Verschlechterung der NTx-Funktion (Anstieg der Serum-Kreatinin-Werte von mindestens 0,5mg/dl innerhalb von sechs Monaten und/oder Entwicklung einer zunehmenden Proteinurie). Die Diagnose einer AMR erfolgte, sobald alle drei Kriterien erfüllt waren.

Das Serumkreatinin (SKrea) ist ein Stoffwechselprodukt, welches bei gesunden Patienten mit relativ konstanter Menge über die Nieren ausgeschieden wird. Da dieser Wert nur der groben Abschätzung der NTx-Funktion dient, wurde die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bestimmt, welche das pro Zeiteinheit in den Glomeruli der Nieren filtrierte Volumen (ml/min/1,73m²) angibt. Die CKD-EPI-Formel diente zur Berechnung der GFR und leitet sich von einer im Jahre 2009 veröffentlichten Arbeit von Levey et al. [117][118] ab:

Weiblich:

$$\text{SKrea} \leq 0,7 \text{mg/dl}; \text{GFR} = 144 \times \left(\frac{\text{SKrea} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right)}{0,7} \right)^{-0,329} \times (0,993)^{\text{Alter}}$$

$$\text{SKrea} > 0,7 \text{mg/dl}; \text{GFR} = 144 \times \left(\frac{\text{SKrea} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right)}{0,7} \right)^{-1,209} \times (0,993)^{\text{Alter}}$$

Männlich:

$$\text{SKrea} \leq 0,9 \text{mg/dl}; \text{GFR} = 141 \times \left(\frac{\text{SKrea} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right)}{0,9} \right)^{-0,411} \times (0,993)^{\text{Alter}}$$

$$\text{SKrea} > 0,9 \text{mg/dl}; \text{GFR} = 141 \times \left(\frac{\text{SKrea} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right)}{0,9} \right)^{-1,209} \times (0,993)^{\text{Alter}}$$

Bei Patienten mit einer ethnischen Zugehörigkeit mit schwarzer Hautfarbe wird jeweils der Faktor 1,159 hinzugerechnet. Dies war lediglich bei Patient Nr. 9 der Fall.

Weil das Serumkreatinin als Abbauprodukt des Energiestoffwechsels der Muskeln stark von der Muskelmasse abhängt, ist dieser Wert allein nur unzureichend zur Beurteilung der NTx-Funktion

geeignet. Aus diesem Grund werden zusätzlich die Proteinurie-Werte gegenübergestellt, welche regelmäßig im Spontanurin ermittelt wurden und wichtige zusätzliche Informationen über die Funktion der Nephronen liefern.

Zum Vergleich der GFR- bzw. Proteinurie-Werte der AMR-Patienten vor und nach AMR-Therapie wurden Mittelwerte (MW) für die Zeitpunkte vor AMR (MW 10 M vor AMR-Therapiebeginn), BL (niedrigster GFR- bzw. höchster Proteinurie-Wert der AMR-Patienten im Zeitraum der AMR-Diagnose bis zur AMR-Therapie), M1, M3, M6, M12 und M24 berechnet. Die Werte der beiden stabilen Kontrollgruppen wurden hingegen zu den Zeitpunkten BL (MW 10 M vor BL), M12 (MW 10-14 M nach BL) und M24 (MW 22-26 M nach BL) bestimmt. Bei der Diagnose einer terminalen Transplantatinsuffizienz innerhalb der AMR-Gruppe wurde die GFR für die entsprechenden Zeitpunkte mit 0 ml/min/1,73m² angegeben (mit Imputation), wohingegen hinsichtlich der Proteinurie-Werte keine Angaben für die entsprechenden Zeitpunkte erfolgten (ohne Imputation).

Die für diese Dissertation erforderlichen Laborwerte, Transplantationsdaten, Nebenwirkungen und Krankenhausaufenthalte wurden der Transplantationsdatenbank der Charité („T-Base 2“) sowie der SAP-Software entnommen.

2.2.2 Histologischer Nachweis: Biopsie

Sobald eine auffallende serologische und/oder klinische Verschlechterung der NTx-Funktion festgestellt wurde, bestand die Indikation einer Gewebsentnahme, um die Form der Rejektion sowie deren Schweregrad histologisch zu bestimmen. Die Biopsieschnitte wurden von zwei erfahrenen Nephropathologen ausgewertet und nach den entsprechenden Banff-Kriterien graduiert. Die relevanten histologischen Komponenten zur Diagnose einer AMR sind Banff g, cg, ptc, v und C4d-Nachweis. Der C4d-Nachweis erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenz an Paraffinschnitten mittels C4d-IgG-Ak.

Auf den Banff-Konferenzen der Jahre 2011 [119], 2013 [85] und 2015 [116] wurden die histologischen Diagnosekriterien der AMR genau beschrieben. Der „Banff ptc-score“ bezeichnet die peritubuläre Kapillaritis und der „Banff g-score“ den Grad der Glomerulitis als prozentualen Anteil der betroffenen Glomeruli [116]. Der „Banff cg-score“ wiederum gibt den Grad der chronischen Transplantatglomerulopathie mit Nachweis einer Verdopplung oder Mehrschichtung der glomerulären Basalmembran an [80][75]. Seit der Banff-Konferenz 2013 [85] ist zudem der

Nachweis der intimalen Arteriitis, d. h. der „Banff v-score“, ein entscheidendes Kriterium zur Diagnose der akuten AMR.

Zur Unterscheidung zwischen akuter und chronischer AMR ist insbesondere der Nachweis einer Transplantatglomerulopathie ($cg > 1$) entscheidend, welche die chronische Schädigung des NTx zuverlässig widerspiegelt [116]. Tubuläre Atrophie (ct), interstitielle Fibrose (ci) und chronische Transplantatarteriopathie (cv) sind weitere Anzeichen einer chronischen Abstoßung.

Die Borderline-Abstoßung (Banff-Kategorie 3, Tab. 1) und die ACR (Banff-Kategorie 4, Tab. 1) wurden ebenfalls in der Auswertung berücksichtigt und nach den Banff-Kriterien definiert [116].

2.2.3 Serologischer Nachweis von Spender-spezifischen Antikörpern

Zur DSA-Diagnostik wurden Serum-Proben zum BL-Zeitpunkt, M3 (2-5 M nach BL) und M12 (8-16 M nach BL) in das Institut für Transfusionsmedizin – Labor für Gewebetypisierung/HLA (ZTB) – Charité Campus Virchow-Klinikum (CVK) geschickt und ausgewertet. Zusätzlich sind bei einigen AMR-Patienten auch zu anderen Zeitpunkten HLA-Ak-Bestimmungen aus gegebenen klinischen Anlässen erfolgt und in diese Studien eingeflossen. Unsere Analysen basieren auf der Luminex-Technologie, bei der mikroskopisch kleine Polystyrolpartikel (Mikropartikel), sog. Beads, mit HLA-Antigenen einer Spezifität beschichtet sind und als Festphase für die Nachweisreaktion dienen. Nach Bindung der Ak aus dem Serum werden fluoreszierende Sekundär-Ak hinzugegeben, die wiederum mittels Durchflusszytometer gemessen werden können. Hierbei erfolgte zunächst eine qualitative Bestimmung der vorhandenen HLA-Ak mit LABScreen Mixed (One Lambda, Canoga Park, CA, USA). Nachfolgend wurden unsere Serumproben im Single-Antigen-Test (LABScreen Single Antigen beads assay, One Lambda) quantitativ auf Spender-spezifische HLA-Ak gegen einzelne Antigene bzw. HLA-Allele untersucht. Alle Tests wurden nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Der Gehalt an DSAs im Serum wurde mit der mittleren Fluoreszenz-Intensität (MFI) semiquantitativ angegeben. Die DSAs mit der höchsten MFI wurden als DSAm_{ax} und die MFI-Summe aller vorhandenen DSAs als DSAs_{um} bezeichnet. MFI-Werte unter 500 gelten als fraglich positiv, Werte zwischen 500 und 3000 als niedrig, Werte zwischen 3000 und 10000 als mittelgradig und Werte über 10000 als hoch.

Neben den DSAs wurden HLA-A und HLA-B der Klasse I sowie HLA-DQ und HLA-DR der Klasse II als sog. Split-MM angegeben.

2.3 AMR-Therapie

Die AMR-Therapie überspannte 16 Tage und wurde im Zeitraum dieser Studie routinemäßig nach AMR-Diagnose in der Nephrologischen Abteilung der Charité angewandt (Abb. 1) [120]. An den ersten drei Tagen erfolgte eine Methylprednisolon-Stoßtherapie mit einer Tagesdosis von 250 bzw. 500mg. An den Tagen 2, 5, 9 und 12 wurde jeweils 1,3mg/m² Bortezomib (Velcade) intravenös verabreicht. Zusätzlich erfolgten sechs PPH's (2,5 l je Sitzung, 4 % Albumin) - meist an den Tagen 3, 4, 6, 8, 10 und 11. 500mg Rituximab (MabThera) wurde entweder vor Beginn oder nach Abschluss der Bortezomib-Gabe intravenös injiziert. Abschließend erfolgte an den Tagen 14, 15 und 16 eine hochdosierte IVIg mit insgesamt 2 g/kg (max. 60 g/Tag).

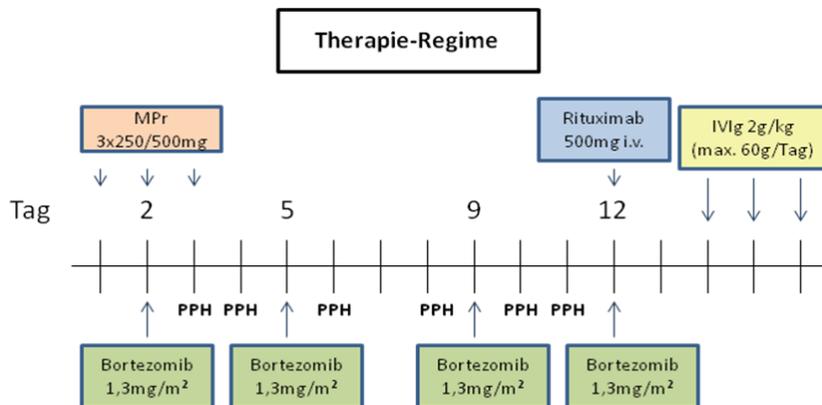


Abb. 1: AMR-Therapie-Regime für die AMR-Patienten; MPr, Methylprednisolon; PPH, Plasmapherese; IVIg, intravenöse Immunglobulingabe

Alle AMR-Patienten wurden von vier erfahrenen Nephrologen bezüglich ihrer Compliance eingeschätzt. Diese Beurteilung erfolgte unabhängig voneinander und stützte sich auf die regelmäßigen Kontrolluntersuchungen.

2.4 Durchflusszytometrie

Die Bestimmung der verschiedenen humanen Zellpopulationen erfolgte mittels Quantifizierung im Durchflusszytometer. Die Durchflusszytometrie hat sich zu einem essentiellen Bestandteil der Zelldiagnostik entwickelt. Sie ermöglicht die quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen, intrazellulären Proteinen, Peptiden und DNS in einer Zellsuspension. Mithilfe spezifischer monoklonaler Ak, welche mit Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorochromen) markiert sind, können nach dem Prinzip der Antigen-Ak-Reaktion kleine zelluläre Subpopulationen identifiziert und quantifiziert werden. Die Erkenntnis, dass jede Zellart charakteristische Oberflächenmoleküle trägt, gilt als Voraussetzung für diese Nachweismethode. So ist z. B. CD4 ein Marker für T-Zellen und CD20 wird nur von B-Zellen exprimiert. Der Begriff FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) ist ein Markenname der Firma Becton Dickinson (BD), wird jedoch auch synonym für die Durchflusszytometrie verwendet.

2.4.1 Phänotypisierung der B-Zell-Populationen im peripheren Blut

Im Rahmen dieser Studie soll der Einfluss der angewandten AMR-Therapie auf die verschiedenen B-Zell-Subpopulationen untersucht werden. Auf Grundlage der in Abschnitt 1.2.3 genannten Erkenntnisse haben wir mit den eingesetzten Antikörpern acht verschiedene B-Zell-Populationen abgegrenzt (Tab. 2).

Tab. 2: B-Zell-Populationen und deren spezifische Phänotypisierung

Zellpopulation	Phänotyp
B-Zellen	CD3⁻CD19⁺
unreife B-Zellen	CD3⁻CD19⁺CD20⁺CD27⁻IgD⁺CD38⁺
naive B-Zellen	CD3⁻CD19⁺CD20⁺CD27⁻IgD⁺CD38⁻
Gedächtnis-B-Zellen	CD3⁻CD19⁺CD20⁺CD27⁺
Gedächtnis-B-Zellen ohne Klassenwechsel (non class-switched)	CD3⁻CD19⁺CD20⁺CD27⁺IgD⁺
Gedächtnis-B-Zellen mit Klassenwechsel (class-switched)	CD3⁻CD19⁺CD20⁺CD27⁺IgD⁻
Doppelt negative B-Zellen (DN-Zellen)	CD3⁻CD19⁺CD20⁺CD27⁻IgD⁻
Plasmazellen	CD3⁻CD19⁺CD20^{-/low}CD27⁺CD38⁺IgD⁻ CD3⁻CD19⁺CD20^{-/low}CD27⁺CD38⁺CD138⁺

Zur übersichtlichen Veranschaulichung der phänotypischen Charakteristika und Entwicklungsstufen der menschlichen B-Zell-Populationen dient die Abb. 2.

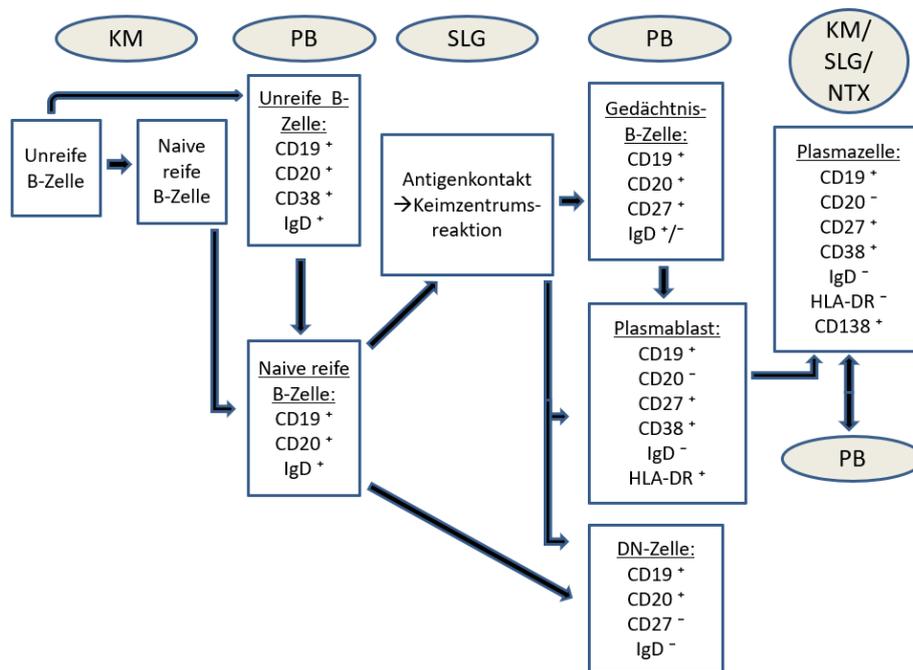


Abb. 2: B-Zell-Populationen des Knochenmarks (KM), des peripheren Blutes (PB) sowie der sekundären Lymphgewebe (SLG) mit Angabe des jeweils charakteristischen Phänotyps; adaptiert nach M. Perez-Andres et al. [25]

2.4.2 Vorbereitung und Verdünnung der Blutproben

Zum Vergleich der B-Zell-Populationen der AMR-Patienten vor und nach AMR-Therapie mittels Durchflusszytometrie wurden MW für die Zeitpunkte BL, M1, M3, M6, M12, M18 und M24 berechnet. Bei der Diagnose einer terminalen Transplantatinsuffizienz innerhalb der AMR-Gruppe erfolgten keine weiteren Messungen mehr. Zum Vergleich mit den BL-Werten der AMR-Gruppe wurden die B-Zell-Populationen der beiden Kontrollgruppen einmalig bestimmt. Die Vorbereitung der Proben für die Durchflusszytometrie wurde im Nephrologischen Labor der Klinik für Innere Medizin mit dem Schwerpunkt Nephrologie der Charité Campus Mitte, Universitätsmedizin Berlin, durchgeführt.

Als Ausgangsmaterial diente Vollblut, welches durch Lithium-Heparin ungerinnbar gemacht wurde. Zunächst wurde dieses antikoagulierte Blut mit der doppelten Menge an PBS-Puffer (Waschpuffer) verdünnt - so wurden 9 ml Blut mit 18 ml PBS-Puffer gemischt. Diese Verdünnung wurde daraufhin vorsichtig auf „Ficoll Paque Plus®“ gegeben. Auf 3 ml „Ficoll

Paque Plus®“ wurden 9 ml verdünntes Blut pipettiert, sodass drei kleine Röhrchen mit jeweils 3 ml „Ficoll-Paque® Plus“ und 9 ml verdünntes Blut pro Patient genutzt wurden. Es folgte eine Dichtezentrifugation über 25 Min bei 2400xg und 15°C (RT). Dadurch reicherte sich eine Interphase aus mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC-Ring) an. Diese angereicherte Zellfraktion aus Lymphozyten und Monozyten wurde mithilfe einer Pasteurpipette in ein kleines Röhrchen pipettiert, welches daraufhin auf 13 ml mit PBS-Puffer aufgefüllt wurde. Eine weitere Dichtezentrifugation über 9 Min bei 400xg und RT war als Waschschrift zum Entfernen von Thrombozyten und „Ficoll Paque Plus®“ erforderlich. Nach dem Vortexen der PBMCs wurden 600 µl FACS-Puffer (PBS + 2 % FBS) hinzugegeben und gleichmäßig durchmischt. Auf diese Weise stand uns eine ausreichende Menge an gereinigten PBMCs zur Verfügung, die wir auf charakteristische Eigenschaften untersuchen konnten.

2.4.3 Zählverfahren

Um eine optimale Antigen-Ak-Bindung zu gewährleisten, erfolgte eine regelmäßige Zellzählung mithilfe der Neubauer-improved-Zählkammer unter einem Mikroskop. Diese Zählkammer besteht aus einer rechteckigen Grundplatte aus optischem Spezialglas und weist die Größe eines Objektträgers auf. Der Mittelsteg ist zweigeteilt, wobei in jedem Teil ein Zählnetz eingraviert ist, welches unter dem Mikroskop als Gitter dunkler Linien erkannt werden kann. Die Oberfläche des Mittelsteges liegt 0,1mm tiefer als die der beiden Außenstege. Sobald ein Deckglas vorsichtig auf die Außenstege geschoben wird, entsteht ein Kapillarspalt zwischen dem Mittelsteg der Zählkammer und der Unterseite des Deckglases. Die zu untersuchende verdünnte Blutlösung wurde mithilfe einer 10 µl-Pipette in diesen Kapillarspalt pipettiert, bis sich der Spalt durch Kapillarwirkung vollständig und luftblasenfrei ausgefüllt hatte. Dazu war eine Verdünnung von 1:10 erforderlich, sodass 10 µl der gereinigten und verdünnten PBMCs (siehe oben) abgenommen und diese mit 90 µl PBS-Puffer verdünnt wurden. Von dieser Verdünnung wiederum konnten 10 µl zwischen Grundplatte und Deckglas pipettiert und für die Auszählung der Leukozyten genutzt werden. Die Objektiv-Vergrößerung in der Zählkammer betrug 10. Nachdem die Leukozyten in den vier für die Leukozytenzählung vorgesehenen Eckquadraten des Zählnetzes gezählt wurden, wurde der MW bestimmt. Diese vier Großquadrate von je 1 mm x 1 mm bestehen jeweils aus 16 Gruppenquadraten von je 0,25 mm x 0,25 mm und einer Tiefe von 0,1 mm. Das Volumen eines Großquadrates beträgt somit 0,1 mm³. Da bei allen Zellzählungen Doppelbestimmungen durchgeführt werden müssen, wurden beide Zählnetze mit der zu

untersuchenden Zellsuspension beschickt und ausgezählt. Die Differenz der gezählten Zellen in den Gruppenquadraten, Großquadraten und auch der beiden Zählnetze darf jeweils maximal 10 Zellen betragen. Somit ist das gründliche Durchmischen der Zellsuspension vor Einführung in die Zählnetze von entscheidender Bedeutung.

Zur Messung waren pro B-Zell-Röhrchen mindestens 1,5 Mio. Leukozyten und zur Färbung jeweils 100 µl verdünnte Blutlösung erforderlich. Um diese Angaben einzuhalten, wurde mithilfe geeigneter Formeln der entsprechende Verdünnungsfaktor berechnet.

2.4.4 Färbung

Für die Färbung der B-Zellen wurden für jeden Patienten zwei Reagenzröhrchen angefertigt (Tab. 3). Zu den mit Fluorochrom-markierten Aks versehenen Reagenzröhrchen wurden jeweils 100 µl von der verdünnten PBMC-Probe hinzugefügt und daraufhin für 25 Min bei Dunkelheit und RT inkubiert. Nach erfolgter Zellfärbung wurden alle Reagenzröhrchen mit jeweils 2 ml FACS-Puffer aufgefüllt und über 5 Min bei 300xg und RT dichtezentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgesaugt, sodass überschüssige nicht gebundene Aks entfernt werden. Durch gründliches Vortexen wurden alle Zellen vom Reagenzglasboden abgelöst. Zu den Reagenzgläsern 1 und 2 wurden jeweils 300 µl FACS-Puffer hinzugefügt und diese dann bis zur Messung kühl und dunkel gelagert.

Der Ak CD138 PE wurde zur zusätzlichen Bestimmung der Plasmazellen verwendet. Da die Färbung mit diesem Ak jedoch keine auswertbaren Ergebnisse lieferte, wird im Folgenden nicht näher darauf eingegangen.

Tab. 3: Zusammenstellung der markierten Aks für die B-Zell-Färbung

Ak mit Fluorochrom	CD3 PacBlue	CD20 PerCP	CD19 Pe-Cy7	CD27 APC	IgD/CD138 PE	CD38 FITC	HLA-DR APCCy7
Reagenzglas 1	2,5 µl	5 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Reagenzglas 2	2,5 µl	5 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

2.4.5 FMO-Kontrollen

Um die Zellen möglichst exakt gaten zu können, haben wir für unsere Mehrfarbenmessungen FMO-Kontrollen durchgeführt. FMO ist die Abkürzung für Fluorescence-Minus-One und ist eine Methode, um falsch von richtig positiven Zellen zu unterscheiden. Bei einer PE-FMO-Kontrolle beispielsweise enthält das Kontrollröhrchen alle für unser Experiment notwendigen Fluorochrome außer PE. Die Grenze zwischen positiv und negativ für das PE-Gating-Feld kann auf diese Weise sicher bestimmt werden. Außerdem besitzen sowohl Zellen als auch Moleküle im Reagenz eine gewisse Eigenfluoreszenz, welche das Gaten erschwert.

Zur Herstellung der FMO-Kontrollen haben wir 17 ml Vollblut einer gesunden nicht-nierentransplantierten Person verwendet. Es erfolgte eine Zellisolierung sowie ein Waschschriff nach oben beschriebener Methode. Daraufhin wurde das kleine Röhrchen mit den PBMCs auf 12 ml aufgefüllt und gut gemischt. Zum Zählen der Leukozyten in einer Neubauer-improved-Zählkammer erfolgte wiederum eine Verdünnung von 1:10, woraufhin 10 µl für die Auszählung der Leukozyten genutzt wurden.

Zur Berechnung der Gesamtleukozytenanzahl (als Beispiel befinden sich als MW in jedem Großquadrat 5 Leukozyten):

$$\frac{\text{Anzahl Zellen (MW)} \times 1000 \times \text{Verdünnung}^1}{\text{Fläche eines Großquadrates (mm}^2) \times \text{Kammertiefe(mm)} \times \text{Verdünnung}} = \text{Zellen insgesamt}$$

$$\frac{5 \times 1000 \times 12}{1\text{mm}^2 \times 0,1\text{mm} \times 1/10} = 5 \times 10^6 \text{ Zellen}$$

¹ Da wir zur Verdünnung 10 µl entnommen und zur Zählung der Zellen genutzt haben, wird über den Dreisatz berechnet, wie viele Zellen nach Verlust dieser 10 µl noch vorhanden sind:

$$\frac{5 \times 10^6}{1200\mu\text{l}} = \frac{x}{1190\mu\text{l}} \quad x = 4,96 \times 10^6$$

Nach der Zellzählung erfolgte ein zweiter Waschschriff. Zur Messung waren pro B-Zell-Röhrchen mindestens 500.000 Leukozyten und zur Färbung jeweils 50 µl verdünnte Blutlösung erwünscht, sodass folgende Formel aufgestellt wurde, um den Verdünnungsfaktor zu berechnen:

$$\frac{0,5 \times 10^6}{50\mu\text{l}} = \frac{\text{errechnete Gesamtleukozytenzahl}}{x} \rightarrow \frac{0,5 \times 10^6}{50\mu\text{l}} = \frac{4,96 \times 10^6}{x} \rightarrow x = \frac{50\mu\text{l}}{0,5 \times 10^6} \times 4,96 \times 10^6$$

$$x = 496\mu\text{l}$$

Somit mussten nach dem zweiten Waschschrift die gereinigten PBMCs mit FACS-Puffer auf 496 µl Gesamtvolumen aufgefüllt werden, damit in 50 µl Zelllösung 500.000 Leukozyten enthalten sind. Aufgrund von Fehlermöglichkeiten wurden die Lösungen etwas weniger stark verdünnt bei Beachtung der notwendigen Gesamtmenge, um so eine gesicherte Mindestanzahl an Leukozyten für die Messung zu erhalten. Da wir acht Röhrchen á 50 µl verdünnte Blutlösung zur Messung der B-Zell-FMO-Kontrollen benötigten, war ein Mindestvolumen von 400 µl insgesamt notwendig. Aus diesem Grund haben wir unsere PBMCs auf 430 µl statt 496 µl verdünnt.

Tab. 4: Zusammenstellung der markierten Aks für die B-Zell-FMO-Kontrollen

Ak mit Fluorochrom	IgD PE	CD27 APC	CD38 FITC	CD20 PerCP	CD19 Pe-Cy7	CD3 PacBlue	HLA-DR APC-Cy7
Reagenzglas 1	0 µl	3,75 µl	2,5 µl	2 µl	2,5 µl	2 µl	1,7 µl
Reagenzglas 2	2,5 µl	0 µl	2,5 µl	2 µl	2,5 µl	2 µl	1,7 µl
Reagenzglas 3	2,5 µl	3,75 µl	0 µl	2 µl	2,5 µl	2 µl	1,7 µl
Reagenzglas 4	2,5 µl	3,75 µl	2,5 µl	0 µl	2,5 µl	2 µl	1,7 µl
Reagenzglas 5	2,5 µl	3,75 µl	2,5 µl	2 µl	0 µl	2 µl	1,7 µl
Reagenzglas 6	2,5 µl	3,75 µl	2,5 µl	2 µl	2,5 µl	0 µl	1,7 µl
Reagenzglas 7	2,5 µl	3,75 µl	2,5 µl	2 µl	2,5 µl	2 µl	0 µl
Reagenzglas 8	2,5 µl	3,75 µl	2,5 µl	2 µl	2,5 µl	2 µl	1,7 µl

In jedes der mit den entsprechenden Aks versehenen Reagenzröhrchen werden jeweils 50 µl der verdünnten PBMC-Probe hinzugegeben und gut gemischt. Die Färbung der B-Zellen erfolgt nach den oben beschriebenen Methoden. Schließlich werden in jedes Röhrchen 300 µl FACS-Puffer hinzugefügt, sodass die Messung am Durchflusszytometer erfolgen kann.

2.4.6 Messung

Die Messungen am Durchflusszytometer FACS-Canto II (BD) erfolgten im FACS-Labor des Deutschen Rheuma-Forschungszentrums (DRFZ) in Berlin. Vor Beginn der Messungen mit dem Durchflusszytometer musste die Geräteempfindlichkeit optimiert und kalibriert werden. Für jedes der verwendeten Farbstoffe erfolgte eine Kompensation, da sich die Fluoreszenzspektren der verschiedenen Fluorochrome mehr oder weniger stark überlappen.

Nachdem die Zellen einer Blutprobe mit Fluoreszenz-markierten Ak inkubiert wurden, müssen die Proben unmittelbar vor der Messung im Durchflusszytometer auf dem Vortexer gründlich

durchmischt werden. Daraufhin wird die Zellsuspension aus dem Probenröhrchen in das Durchflusszytometer gesaugt. Die Zellen laufen in einem Strom einer geeigneten Trägerflüssigkeit vereinzelt und in hoher Geschwindigkeit durch eine dünne Kapillare in die sog. Durchflusszelle, in der sie durch einen Laserstrahl einer definierten Wellenlänge (405nm, 488nm bzw. 632nm) beleuchtet werden. Dadurch werden die Elektronen des gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes angeregt und diese in ein höheres Energieniveau befördert. Die Absorption der Lichtenergie liegt in einem für den Fluoreszenzfarbstoff charakteristischen Wellenlängenbereich. Die Elektronen geben nach dem Laserpuls die zuvor absorbierte Energie in Form von Licht einer höheren Wellenlänge ab und fallen daraufhin wieder in ihr Ausgangsniveau. Dieser Strahlungsübergang wird als Fluoreszenz bezeichnet. Die Detektoren (Photomultiplier) erkennen sowohl das emittierte Fluoreszenzlicht der Ak-gekoppelten Fluorophore als auch die Streuung des Lichtes durch die Zellen (Abb. 3). Streulicht entsteht, wenn eine Zelle an einem Laserstrahl vorbeiläuft. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Light Scatter) als größerer Anteil gibt die Beugung des Lichtes in einem flachen Winkel von $0,5-2^\circ$ wieder und hängt vom Volumen, also der Größe der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = Sideward Light Scatter) hingegen misst die Intensität des Lichtes, welches im rechten Winkel gestreut wird. Es korreliert mit der Granularität der Zelle und der Struktur des Zellkerns. So lassen sich bereits ohne Färbung Zellpopulationen des peripheren Blutes voneinander abgrenzen: Granulozyten sind große Zellen mit hoher Granularität, während die Lymphozyten kleine glatte Zellen sind.

Da das Durchflusszytometer mit verschiedenfarbigen Lasern und vor allem Filtern ausgestattet ist, können pro Messung verschiedene Farbstoffe unterschiedlicher Wellenlängen verwendet werden. Für die B-Zell-Färbung in unserer Studie wurden die Fluoreszenzen der sieben Signalkanäle genutzt, die über eine logarithmische Berechnung ermittelt wurden. Es wurden pro B-Zell-Röhrchen 1,5 Mio. Zellen am Durchflusszytometer gemessen. Die Durchflussrate betrug zwischen 4000 und 7500 Zellen pro Sekunde. Die erhaltenen Messergebnisse wurden mit der Gerätesoftware BD FACSDiva quantifiziert und grafisch dargestellt und schließlich zur Auswertung in die Software Microsoft Excel (Microsoft) übertragen. Die Art der Darstellung wurde als Punktdiagramm und Histogramm gewählt. Im Punktdiagramm werden immer zwei verschiedene Farbstoffe bzw. Zellpopulationen gegeneinander abgegrenzt (Zweifarbfluoreszenzen). Die Fluoreszenzintensität nimmt von links nach rechts (x-Achse) und von unten nach oben (y-Achse) zu. Die Auswertung erfolgte weiterhin durch das Definieren ausgewählter Populationen (Gates). Das Histogramm gibt auf der x-Achse die

Fluoreszenzintensität eines ausgewählten Farbstoffes und auf der y-Achse die Zellzahl wieder (Einfarbenfluoreszenzen).

Zum einen wurden die Zellpopulationen prozentual von allen CD19⁺ B-Zellen angegeben. Zum anderen erfolgte eine Berechnung der absoluten Zahl der verschiedenen B-Zell-Populationen. Dazu wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{\frac{\text{Lymphozyten}}{\text{nl}} \times \text{CD19}^+ \text{ Zellen in \% der Lymphozyten} \times 1000}{100} = \text{Anzahl der CD19}^+ \text{ B-Zellen je } \mu\text{l Blut}$$

Die Lymphozytenanzahl des entsprechenden Messtages wurde der Transplantationsdatenbank der Charité („T-Base 2“) entnommen, während der prozentuale Wert der CD19⁺ B-Zellen bzw. der Plasmazellen aus der FACS-Auswertung stammt (Abb. 3).

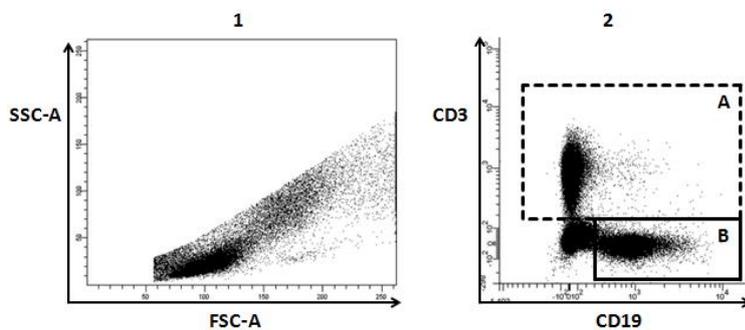


Abb. 3: 1) Seitwärtstreulicht (Sideward Scatter = SSC) und Vorwärtstreulicht (Forward Scatter = FSC); 2) Abgrenzung der CD19⁺ B-Zellen (B) aus der CD3⁺/CD19⁺ Lymphozytenpopulation (A) am Beispiel eines repräsentativen AMR-Patienten

2.4.7 Gating-Strategie

Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mittels BD FACSDiva Software v. 6.1.3. Das Gating bedeutet die elektronische Eingrenzung von einzelnen Zellpopulationen, die sich in Form von Punktwolken darstellen. Wenn uns z. B. nur die Lymphozytenpopulation interessiert, werden alle CD3⁺ und alle CD19⁺ Zellen umrandet und dadurch alle anderen Zellpopulationen ausgegrenzt. Im Folgenden wird dargestellt, wie die Abgrenzung der verschiedenen B-Zell-Populationen erfolgte (Abb. 4). Pro Messung konnte aufgrund der Ak-Kombination eine Doppelbestimmung der CD19⁺ B-Zellen sowie der Gedächtnis-B-Zellen erfolgen, während alle anderen B-Zell-Populationen einfach bestimmt wurden.

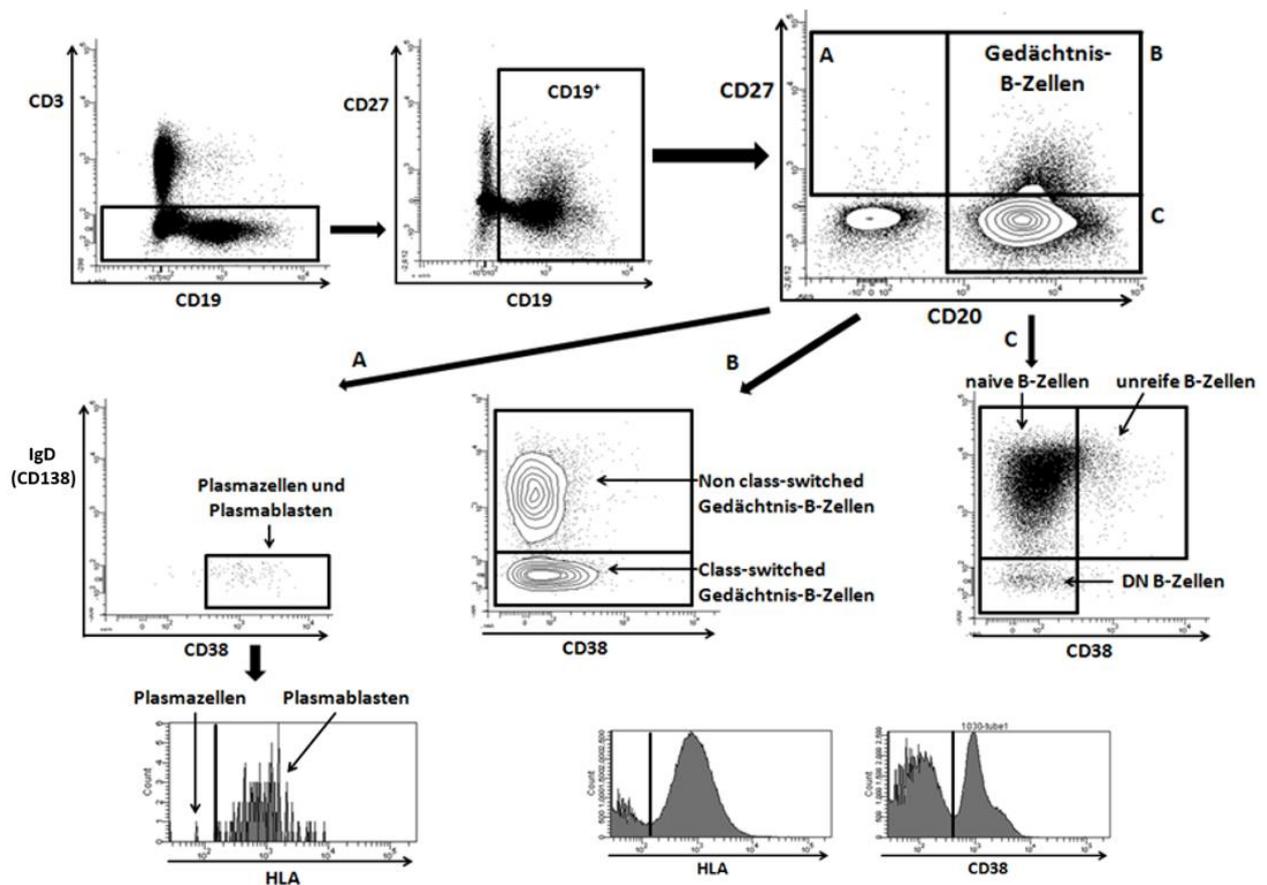


Abb. 4: Schematische Darstellung zur Abgrenzung der B-Zell-Populationen; die beiden Histogramme unten rechts dienen zur Abgrenzung HLA⁺/ bzw. CD38⁺/ und beinhalten alle CD3⁻ Zellen

2.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

2.5.1 Der B-Zell aktivierende Faktor (BAFF)

Um festzustellen, inwiefern unsere Therapie Einfluss auf die BAFF-Expression nimmt, haben wir mittels ELISA die sBAFF-Konzentrationen ermittelt. Als Ausgangsmaterial diente Serum, welches zu den Zeitpunkten BL, M3, M6, M9 und M12 abgenommen wurde. Zum Vergleich haben wir die s-BAFF-Konzentrationen der beiden Kontrollgruppen ermittelt (C_DSA⁻/ C_DSA⁺).

Das verwendete Quantikine ELISA-kit enthält eine ELISA-Platte, die bereits mit einem monoklonalen spezifischen Ak gegen BAFF/BLyS vorbehandelt wurde. Dieser Fänger-Ak wurde mithilfe eines Sekundär-Ak an die Festphase gebunden. Die Serumproben werden jeweils im

Verhältnis 1:1 mit dem „Calibrator Diluent RD6Q“ verdünnt. Zudem wird eine Standardreihe angefertigt, welche aus Proben unterschiedlicher bekannter löslicher BAFF-Konzentrationen besteht. Mithilfe dieser Standardreihe kann eine Standardkurve angefertigt werden, die es uns ermöglicht, die BAFF-Konzentrationen der gemessenen Proben zu errechnen.

Zunächst werden jeweils 100 µl des Proteins „Assay Diluent RD1-111“ in die Vertiefungen der ELISA-Platte gegeben. Es folgt die Zugabe von jeweils 50 µl Standardprobe, Blank-Probe oder verdünnter Serumprobe in die jeweiligen Vertiefungen der ELISA-Platte. Damit die löslichen BAFF-Antigene an die Fänger-Ak binden können, ist ein Inkubationsschritt über drei Stunden in einem horizontalen orbitalen Mikroplattenschüttler bei RT und 500 U/Min erforderlich. Anschließend wird der Inhalt der Vertiefungen entfernt und viermal mit je 400 µl PBS gewaschen. Nach dieser vollständigen Entfernung aller ungebundenen Substanzen folgt die Zugabe von 200 µl des Detektions-Ak. Dieses sog. „BAFF/BLyS Conjugate“ ist ein spezifischer polyklonaler Ak gegen BAFF/BLyS, der das Enzym Meerrettichperoxidase kovalent gebunden trägt. Auf diese Weise entsteht ein Antigen-Ak-Antigen-Komplex nach dem Prinzip der Sandwich-ELISA-Technik. Nach einer Stunde Inkubationszeit im Mikroplattenschüttler erfolgt ein erneuter Waschschrift. Zur Herstellung der Substratlösung wird ein Farbreagenz A und Farbreagenz B zu gleichen Anteilen gemischt. Durch Zugabe von jeweils 200 µl dieser zuvor noch farblosen Substratlösung wandelt die gebundene Meerrettichperoxidase dieses farblose Substrat in ein farbiges Produkt um. Um die Farbreaktion nach einer Inkubationszeit von 30 Min bei Dunkelheit zu beenden, werden jeweils 50 µl einer Schwefelsäurelösung in jede Vertiefung gegeben. Mithilfe eines Photometers kann bei einer Wellenlänge von 450 nm die Konzentration des entstandenen Farbprodukts gemessen werden, die wiederum proportional zur Konzentration des zu untersuchenden Antigens ist. Bei der Auswertung der Daten ist zu beachten, dass der Variationskoeffizient (CV %) der Doppelbestimmungen maximal bei 7,3 % liegen darf. Andernfalls muss die jeweilige Serumprobe erneut gemessen werden. Weiterhin muss von der ermittelten optischen Dichte aller Serumproben der Leerwert (Blank) abgezogen werden.

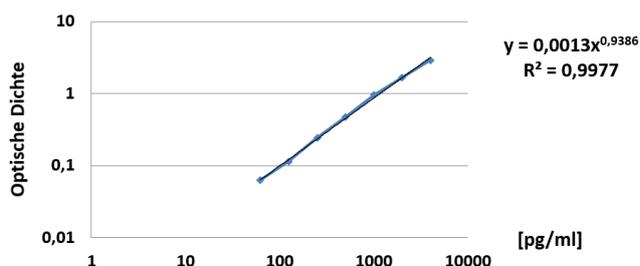


Abb. 5: Standardkurve mit Gleichung zur Berechnung der BAFF-Konzentrationen; R^2 , Bestimmtheitsmaß

Zunächst wurde aus den Daten der Standardreihe eine Standardkurve angefertigt. Hierzu wird die optische Dichte gegen die unterschiedlichen Konzentrationen der Standardproben grafisch aufgetragen, wodurch eine sigmoide Kurve entsteht. Der lineare Bereich der Kurve gibt das Verhältnis der optischen Dichte zur Konzentration am reproduzierbarsten wieder. Zur Darstellung der Standardkurve haben wir eine logarithmische Skalierung und den Trendtyp „Potenz“ gewählt. Somit erhalten wir eine Lineare und können die entsprechende Formel ermitteln lassen (Abb. 5). Diese Formel ermöglicht uns die Berechnung der Konzentrationen zu den zugehörigen Werten der optischen Dichte. Schließlich werden die berechneten Konzentrationen aufgrund der Verdünnung mit dem Faktor 2 multipliziert.

2.5.2 Mumps/Masern/Röteln (MMR)

Im Rahmen dieser Studie wollen wir den Einfluss der AMR-Therapie auf die langlebigen Axs gegen Mumps, Masern und Röteln (MMR) untersuchen. Unsere für die Messung verwendeten Serum-Proben wurden zu den Zeitpunkten BL, M3, M6, M9 und M12 den AMR-Patienten entnommen. Die o. g. Proben wurden dem Institut der Virologie (Charitéplatz 1, CCM) zugesandt. Unter der Leitung von Hr. Dr. Hofmann hat dieses die IgG-Impftiter unserer Studienteilnehmer bezüglich MMR mithilfe der ELISA-Methode gemessen. Alle Tests wurden nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Ein niedrig protektiver Impfschutz wurde bei Mumps als Ak-Titer bis 520 IU/ml, bei Masern als Ak-Titer bis 320 IU/ml und bei Röteln als Ak-Titer bis 14 IU/ml definiert. Jene Patienten, deren Ak-Titer zum BL-Zeitpunkt unterhalb dieser Grenzen lagen, wurden für diese Untersuchung ausgeschlossen.

2.6 Datenverwaltung und statistische Analysen

Die experimentell erhobenen Daten wurden mit der Software Microsoft Office Excel 2007 verwaltet und mithilfe des Statistik-Programms IBM SPSS Statistics 25 für Windows analysiert. Die grafische Darstellung erfolgte mithilfe von Microsoft Office PowerPoint 2007.

Zunächst erfolgte der Nachweis einer Nicht-Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test und Histogramm für jede Variable innerhalb der AMR-Gruppe, stabilen Kontrollgruppe und DSA-Gruppe. Nachfolgend wurden alle Variablen auf statistische Signifikanz überprüft. Zum

einen wurden die Unterschiede zwischen der stabilen Kontrollgruppe ohne DSA (C_DSA^-), der DSA-Gruppe (C_DSA^+) sowie der AMR-Patienten vor Therapiebeginn untersucht. Diese statistische Analyse erfolgte mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests für unabhängige Stichproben, da dieser auch bei kleinen Stichproben ohne Vorhandensein einer Normalverteilung angewandt werden kann. Zum anderen sind die Variablen der AMR-Patienten im Laufe der Therapie mithilfe des Wilcoxon-Tests für abhängige Stichproben (signed-rank-test) analysiert worden. Beim Vergleich zwei verschiedener Variablen (z. B. unswitched und switched Gedächtnis-B-Zellen sowie Plasmablasten und Plasmazellen) innerhalb der AMR-Gruppe im Therapieverlauf wurde wiederum der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Beim Vergleich von mehr als zwei abhängigen Variablen kam der Friedman-Test zur Anwendung. Ein p-Wert $\leq 0,001$ gilt als statistisch hoch signifikant, $p \leq 0,01$ als signifikant und $p < 0,05$ als schwach signifikant. Die Ergebnisse wurden entweder graphisch in Form von Liniendiagrammen oder sog. Box Plots dargestellt (Abb. 6).

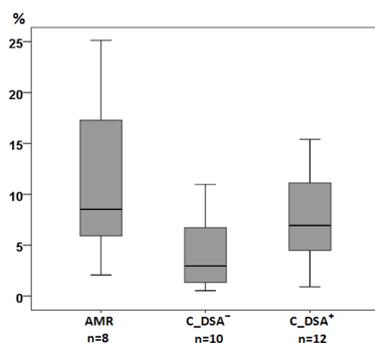


Abb. 6: Box-Plot-Grafik am Beispiel des relativen Anteils der B-Zellen; AMR, AMR-Gruppe; C_DSA^- , Kontrollgruppe ohne DSA-Nachweis; C_DSA^+ , Kontrollgruppe mit DSA-Nachweis; n, Anzahl

Ein Box Plot teilt die Daten in vier Bereiche (Quartile) mit der gleichen Anzahl an Werten auf. Hierbei beinhaltet eine rechteckige Box die mittleren 50% der Verteilung, während jeweils ober- und unterhalb dieser Box mithilfe senkrechter Antennen die restlichen 25% der gemessenen Werte dargestellt werden. Somit wird eine Box von der 25. Perzentile und 75. Perzentile begrenzt. Die Länge der Box gibt den Interquartilsabstand (IQA) an. Die beiden horizontalen Linien, welche die vertikalen Antennen oben und unten abschließen, geben als „innere Eingrenzung“ die Messwertspanne wieder und werden auch als „Whiskers“ bezeichnet. Da eine Antenne auf maximal das 1,5-fache des IQA begrenzt ist, werden Werte, die außerhalb dieser „inneren Eingrenzung“ liegen, als Ausreißer bezeichnet. Die „milden“ Ausreißer sind als Kreis gekennzeichnet, während die „extremen“ Ausreißer über $3 \times IQA$ liegen und als Sternchen in die

Grafiken eingezeichnet sind. Eine horizontale Linie innerhalb der Box kennzeichnet den Medianwert (50. Perzentile). Die Daten wurden als Medianwert mit IQA angegeben.

Die Kaplan-Meier-Analyse diente der Darstellung der NTx-Überlebenszeiten aller Studiengruppen. Die zensierten Ereignisse geben wieder, zu welchen Zeitpunkten die Beobachtung abgebrochen wurde. Zur statistischen Auswertung der Kaplan-Meier-Überlebenszeiten wurde der Log-Rank-Test (Mantel Cox) verwendet. Eine Zensierung erfolgte bei NTx-Versagen (Notwendigkeit der Dialyse-Aufnahme bzw. Retransplantation) oder drei Jahre nach Therapiebeginn bzw. BL.

2.7 Materialien

Tab. 5: Laborgeräte/Software

Laborgerät	Hersteller
-86° Gefrierschrank	REVCO (Niederlande)
-20°-Kühlschrank	Liebherr (Biberach an der Riß, Deutschland)
Sterilarbeitsbank (LaminAir HB 2448)	Holten (Brannenburg, Deutschland)
Durchflusszytometer (FACS-Canto II)	BD (Heidelberg, Deutschland)
Photometer/ELISA Reader (DTX 800 Multimode Detector)	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
Zentrifuge (Megafuge 2.R, Multifuge 3 S-R)	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Vortexer (MS2 Minishaker)	Janke & Kunkel IKA (Staufen, Deutschland)
Einstellbare Pipetten (0,5-10 µl; 10-100 µl; 20-200 µl; 100-1000 µl; 500-5000 µl)	Eppendorf-Research (Hamburg, Deutschland)
Multikanalpipette (Mehrkanalpipette® S-12; 30-300 µl)	Brand Tech BRAND (Essex, UK)
Multistepper/Dispensierpipette (Multipette® plus; 50-1000 µl)	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
Absaugpumpe (SUE 30)	Heto Lab Equipment
Computer (Esprimo D956/E85+)	FUJITSU (Deutschland)
Notebook (15-ay170ng)	HP (Böblingen, Deutschland)
Labormikroskop (DM IL)	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Zählkammer Neubauer-Improved	Laboroptik (Lancing, UK)

Tab. 6: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
FACS-Röhrchen: Polystyrene (5 ml, 12x75 mm)	BD Biosciences (New Jersey, USA)
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5 ml/1,5 ml/2 ml)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
kleine+große Falcon-Röhrchen: Polystyrene Conical Tube (15 ml, 17x120 mm) und Polypropylene Conical Tube (50 ml, 30x115 mm)	BD (Heidelberg, Deutschland)
Einmal-Pipetten: Polystyrene Serological Pipets (10 ml/25 ml)	BD (Heidelberg, Deutschland)
Einmal-Pasteurpipetten (3 ml)	VWR, Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Plastikpipettenspitzen (10 µl/200 µl/1000 µl/5000 µl)	SARSTEDT (Nümbrecht, Deutschland)
Vacutainer: Plasma-Blutentnahmeröhrchen grün(Li-Heparin,10 ml)	BD (Heidelberg, Deutschland)
Vacutainer: Serum-Blutentnahmeröhrchen orange (6 ml)	BD (Heidelberg, Deutschland)

Tab. 7: Chemikalien und Medien

Artikel	Hersteller
PBS-Puffer (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung ohne Kalzium/Magnesium)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
FBS (Fötales Bovines Serum)	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Ficoll-Paque® PLUS	GE Healthcare (Solingen, Deutschland)
Fixierungs- und Permeabilisierungskit (Foxp3 Staining Buffer Set)	eBioscience (San Diego, USA)
Erythrozyten-Lyse-Puffer (Lysing Solution, 10x Concentrate)	BD (San Jose, USA)
Nuclease-freies Wasser	Ambion (Austin, USA)
Quantikine ELISA Kit – Human BAFF/BLyS/TNFSF13B	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland)

Tab. 8: Anti-Human-Antikörper

Antikörper	Klon	Isotyp	Fluorochrom	Hersteller
CD3	SP34-2	Maus BALB/c IgG1, λ	Pacific Blue	BD
CD19	HIB19	Maus IgG1, κ	Pe-Cy7	BioLegend
CD20	L27	Maus BALB/c IgG1, κ	PerCP	BD
CD27	M-T271	Maus BALB/c IgG1, κ	APC	BD
IgD	IA6-2	Maus BALB/c IgG2a, κ	PE	BD
CD38	HIT2	Maus IgG1, κ	FITC	BD
HLA-DR	L243	Maus IgG2a, κ	APC-Cy7	BioLegend
CD138	44F9	Maus IgG1, κ	PE	MACS Miltenyi Biotec

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Versuchsteilnehmer

Tab. 9: Demografie zum Baseline-Zeitpunkt (AMR-Diagnose)

	AMR (n=10)	C_DSA ⁻ (n=10)	C_DSA ⁺ (n=12)	p
Männlich	7 (70 %)	6 (60 %)	10 (83 %)	n.s.
<i>Grunderkrankung:</i>				
Pyelonephritis	2 (20 %)	-	1 (8 %)	n.s.
Glomerulonephritis/IgA-Nephropathie	3 (30 %)	7 (70 %)	7 (58%)	n.s.
Hämolytisch-urämisches Syndrom	1 (10 %)	-	1 (8 %)	n.s.
hypertensive Nephropathie	2 (20 %)	1 (10 %)	2 (17 %)	n.s.
Zystennieren	-	2 (20 %)	-	n.s.
Sonstige	2 (20 %)	-	1 (8 %)	n.s.
<i>NTx-Charakteristika:</i>				
Empfängeralter zum Zeitpunkt der Transplantation, Median (IQA)	32,5 (19)	49 (28)	40 (24,5)	n.s.
Retransplantation	2 (20 %)	-	-	n.s.
Lebendspende	3 (30 %)	5 (50 %)	6 (50 %)	n.s.
Spenderalter, Median (IQA)	51 (18)	39,5 (25)	51,5 (8,5)	0,036*
Monate zw. NTx und BL, Median (IQA)	41 (63)	48 (83)	35 (59)	n.s.
verzögerte Transplantatfunktion	3 (30 %)	-	1 (8 %)	n.s.
vorangegangene AMR	2 (20 %)	-	-	n.s.
<i>Immunologische Parameter:</i>				
HLA-MM, Median (IQA)	5 (1)	2 (3)	4 (1)	0,011 **/0,043*
HLA-MM Kl. I (A,B) 0/1/2/3/4	0/1/3/5/1	2/2/6/0/0	0/3/6/0/3	-
HLA-MM Kl. II (DR,DQ) 0/1/2/3/4	0/2/5/2/1	5/1/3/0/1	1/1/7/1/2	-
Kl. I DSA	4 (40 %)	-	5 (42 %)	n.s.
Kl. II DSA	8 (80%)***	-	10 (83 %)	n.s.
Kl. I + Kl. II DSA	4 (40 %)	-	-	n.s.

n, Anzahl der Patienten; NTx, Nierentransplantation; n.s., nicht signifikant; *p*, Vergleich zwischen AMR-, C_DSA⁻- und C_DSA⁺-Gruppe sowie innerhalb der AMR-Gruppe zwischen Patienten mit und ohne NTx-Überleben nach 3 Jahren durch Mann-Whitney-U-Test; * C_DSA⁻ vs. C_DSA⁺; ** C_DSA⁻ vs. AMR; ***DR1 mit MFI<500 und DQ2 als nicht sicher spenderspezifisch

Bei der Analyse der Daten zum BL-Zeitpunkt fällt auf, dass die NTx-Spender der Kontrollgruppe ohne DSA-Nachweis ein signifikant geringeres Lebensalter aufweisen als die der Kontrollgruppe mit DSA-Nachweis ($p=0,036$) (Tab. 9). Weiterhin ist die Anzahl der HLA-MM in der Kontrollgruppe ohne DSA-Nachweis signifikant geringer als bei der AMR-Gruppe ($p=0,011$) und der Kontrollgruppe mit DSA-Nachweis ($p=0,043$). Bei Betrachtung aller anderen demografischen Charakteristika fallen keine wesentlichen Unterschiede zwischen der AMR-Gruppe und den beiden Kontrollgruppen auf. Nach der AMR-Diagnose wurden alle Patienten mehrmals und eindringlich über die Bedeutung der regelmäßigen Medikamenteneinnahme sowie die regelmäßigen Kontrolluntersuchungen aufgeklärt. Dennoch wurden zwei der AMR-Patienten als inkompliant eingestuft (Tab. 10).

Tab. 10: Besondere klinische Charakteristika der AMR-Gruppe zum Baseline-Zeitpunkt

Besondere klinische Charakteristika	AMR (n=10)
Hypertonie	9 (90 %)
Hyperlipoproteinämie	3 (30 %)
Übergewicht *	5 (50 %)
Diabetes mellitus	0 (0 %)
Nikotonabusus	1 (10 %)
Schlechte Compliance	2 (20 %)

* Übergewicht bei BMI > 25 (Männer) bzw. bei BMI > 24 (Frauen)

3.2 Immunsuppression

Tab. 11: Immunsuppression zum BL-Zeitpunkt

Immunsuppressiva	AMR (n=10)	C_DSA ⁻ (n=10)	C_DSA ⁺ (n=12)	p
Steroide (Methylprednisolon)	4 (40 %)	4 (40 %)	3 (25 %)	n.s.
Mycophenolatmofetil/ -natrium	9 (90 %)	10 (100 %)	11 (92 %)	n.s.
Cyclosporin A	4 (40 %)	4 (40 %)	5 (42 %)	n.s.
Tacrolimus	4 (40 %)	5 (50 %)	6 (50 %)	n.s.
Everolimus	1 (10 %)	1 (10 %)	-	n.s.
Azathioprin	1 (10 %)	-	1 (8 %)	n.s.

Eine detaillierte Auflistung der AMR-Therapie der 10 AMR-Patienten ist der Tabelle 12 zu entnehmen. Der AMR-Patient Nr. 3 erhielt nach der regulären AMR-Therapie zusätzlich 3x500 mg Methylprednisolon, drei PPHs sowie den Komplementinhibitor Eculizumab (Soliris®,

1x1200 mg und 3x600 mg). Die AMR-Patientin Nr. 5 erhielt im Abstand von zwei Monaten zweimal eine AMR-Therapie, wobei Rituximab bei der 2. Therapie nicht erneut verabreicht wurde. Pat. Nr. 6 hat im Laufe der AMR-Therapie ein Polyarthralgie-Syndrom entwickelt, weshalb der Bortezomib-Zyklus bereits nach der zweiten Dosis gestoppt wurde.

Tab. 12: Angaben zur AMR-Medikation

Pat.-Nr.	Methylprednisolon (Urbason i.v.)	Bortezomib (Velcade i.v.)	Immunglobulin human	Rituximab (Mab Thera)	Plasma- pheresen
1	3x500 mg	4x 1,3 mg/m ²	2x60 g (Privigen)	1x500 mg	6
2	3x500 mg	4x 1,3 mg/m ²	3x 60 g (Privigen)	1x500 mg	6
3	6x500 mg	4x 1,3 mg/m ²	3x40 g (Privigen)	1x500 mg	9
4	3x500 mg	4x 1,3 mg/m ²	3x60 g (Privigen), 2x10 g (KIOVIG)	1x500 mg	6
5 a)	3x250 mg	4x 1,3 mg/m ²	2x60 g (Privigen)	1x500 mg	6
b)	3x500 mg	4x 1,3 mg/m ²	2x60 g (Privigen)		6
6	1x500 mg, 2x250 mg	2x 1,3 mg/m ²	2x60 g (Privigen)	1x500 mg	6
7	3x250 mg	4x 1,3 mg/m ²	4x60 g (Privigen)	1x500 mg	6
8	3x500 mg	4x 1,3 mg/m ²	3x60 g (Privigen)	1x500 mg	6
9	3x500 mg	4x 1,3 mg/m ²	2x60 g (Privigen)	1x500 mg	7
10	3x500 mg	4x 1,3 mg/m ²	2x60 g (Privigen)	1x500 mg	6

Nach der AMR-Therapie besteht die Immunsuppression der AMR-Patienten aus Methylprednisolon, einem Mycophenolat-Präparat und Tacrolimus. Den Patienten wurde zunächst eine Tagesdosis von max. 60 mg Methylprednisolon (Urbason®) verabreicht, welche schrittweise bis auf 4 mg reduziert wurde. Die tägliche Einnahme der Mycophenolatmofetil-Präparate (CellCept®) variiert zwischen 750 mg und 2000 mg. Die Tagesdosis von Mycophenolatsodium (Myfortic®) hingegen reicht von 360 mg bis 1440 mg (0,5-2 g Mycophenolatmofetil). Weiterhin erfolgte nach AMR-Diagnose bei allen Patienten, die zum BL-Zeitpunkt CyA oder einen mTor-Inhibitor eingenommen haben, eine Umstellung auf das potentere Immunsuppressivum Tacrolimus (Prograf®). Patienten, die bereits vor AMR-Diagnose Tacrolimus eingenommen haben, haben das Medikament beibehalten. Die Tagesdosis von Tacrolimus liegt bei 1-14 mg. Der AMR-Patient Nr. 2 ist der einzige, dem nach AMR-Therapie nur kurzfristig Tacrolimus verabreicht wurde und stattdessen täglich 180-200 mg CyA (Sandimmun Optoral®). Grund hierfür war die Diagnose eines posterioren reversiblen

Enzephalopathie-Syndroms (PRES), welches auf die Einnahme von Tacrolimus zurückgeführt wurde. Den Patienten Nr. 3, 5 und 8 wurden ab dem 12.11.12 (ca. ein Jahr nach BL), 09.12.13 (ca. 9 M nach BL) und 05.02.13 (ca. 7 M nach BL) das Medikament Belatacept (Nulojix®) intravenös verabreicht.

3.3 Transplantat- und Patienten-Überlebensraten

Bei keinem unserer untersuchten Patienten kam es zum Tode. Somit liegt die Patienten-Überlebensrate über einen Beobachtungszeitraum von drei Jahren bei allen drei Gruppen bei 100 %. Das NTx-Überleben der AMR-Patienten für eine Beobachtungszeit von drei Jahren zeigt deutliche Unterschiede verglichen mit dem der beiden Kontrollgruppen (Abb. 7; $p=0,005$). Die AMR-Patienten Nr. 3 und 8 hatten 14 M nach AMR-Diagnose ein terminales NTx-Versagen und bei den Patienten Nr. 10 und 9 wurde dieses nach 15 bzw. 20 M diagnostiziert. Die Transplantatüberlebensrate bei unseren AMR-Patienten beträgt somit 60 %, wohingegen die der C_DSA^- ($n=10$) und der C_DSA^+ ($n=12$) jeweils bei 100 % liegt. Beim Vergleich der Patienten aus der AMR-Gruppe mit und ohne C4d-Positivität fällt auf, dass die beiden Patienten ohne histologischen C4d-Nachweis ein terminales NTx-Versagen erlitten (2/2), während 2/8 (25 %) der AMR-Patienten mit C4d-Positivität ein terminales NTx-Versagen aufweisen (Abb. 7).

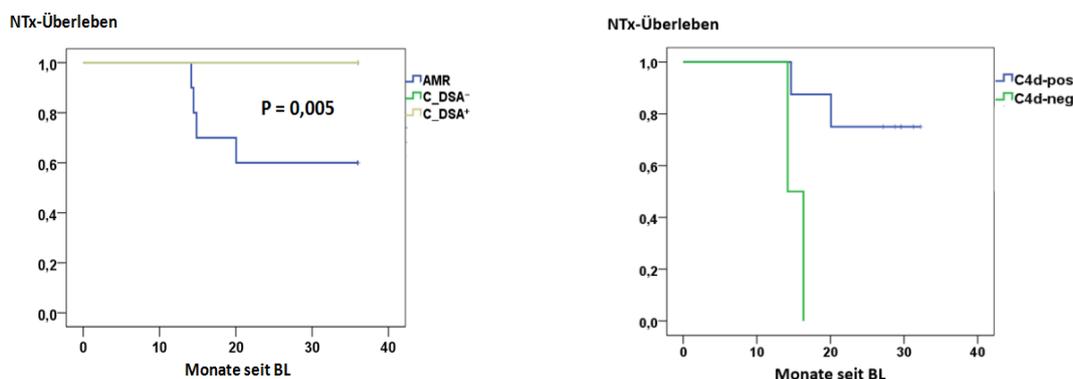


Abb. 7: Kaplan-Meier-Analyse; links: AMR, AMR-Patienten; C_DSA^- , stabile Kontrollpatienten ohne DSA; C_DSA^+ , stabile Kontrollpatienten mit DSA; rechts: Kaplan-Meier-Analyse der AMR-Gruppe, getrennt nach C4d-Positivität

Die AMR-Patienten wurden weiterhin hinsichtlich ihrer HLA-MM aufgeteilt. Patienten mit weniger oder genau 4 MM weisen ein besseres Transplantatüberleben auf (100 %; 4/4) als solche mit mehr als 4 MM (33 %; 2/6). Wird die AMR-Gruppe bezüglich des Grades der histologisch

nachgewiesenen chronischen Transplantatvaskulopathie (cv) unterschieden, haben die AMR-Patienten mit $cv < 3$ (83 %; 5/6) ein besseres NTx-Überleben als solche mit $cv = 3$ (25 %; 1/4).

3.4 Biopsie-Ergebnisse

Die histologische Auswertung ist ein wesentlicher Eckpfeiler für die Diagnose der AMR (Tab. 13). Der AMR-Patient Nr. 1 ist der einzige Patient, der eine frühe aktive AMR entwickelt hat. So wurde bei ihm bereits 6 Tage nach NTx eine AMR festgestellt, während bei den anderen AMR-Patienten die Diagnose frühestens zwei Jahre nach NTx erfolgte und somit als späte aktive AMR eingestuft werden kann. 8 von 10 Patienten haben zudem eine Transplantatglomerulopathie (cg) ≥ 1 und somit eine chronische AMR. Die beiden Patienten ohne initial nachgewiesene cg (Pat. Nr. 1 und 6) weisen auch nach einer Beobachtungszeit von drei Jahren eine erhaltene NTx-Funktion auf. Zudem konnte bei diesen beiden Patienten auch keine Transplantatglomerulitis (g) festgestellt werden. Jedoch erfolgte bei Pat. Nr. 6 eine Kontrollbiopsie 18 M nach Therapiebeginn, wobei $cg = 3$ sowie $g = 1$ festgestellt wurde. Demzufolge ist die akute AMR in eine chronische Form übergegangen. Von den vier Patienten mit terminalem NTx-Versagen waren alle Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose über 40 Jahre alt und drei Patienten hatten eine $cv = 3$. Je zwei unserer vier Patienten mit terminalem NTx-Versagen hatten einen cg-score von 1 bzw. 3. Von den acht Patienten mit C4d-Positivität hatten vier Patienten (Nr. 1, 2, 3 und 6) peritubuläre und drei Patienten glomeruläre Ablagerungen, während bei einem Patienten (Nr. 7) sowohl peritubuläre als auch glomeruläre C4d-Ablagerungen festgestellt werden konnten. Bei den beiden AMR-Patienten ohne C4d-Positivität wurde ein NTx-Versagen nach drei Jahren festgestellt (Nr. 8 und 10). Wird der g- und ptc-Score summiert, wie nach der Banff-Konferenz 2013 empfohlen [85], stellt man fest, dass 7 unserer AMR-Patienten zum BL-Zeitpunkt eine schwere mikrovaskuläre Entzündung von $g + ptc \geq 4$ besitzen, inklusive der vier Patienten mit terminalem Transplantatversagen. Eine moderate mikrovaskuläre Entzündung ist definiert als $g + ptc \geq 2$. Eine intimale Arteriitis mit $v = 1$ konnte bei drei AMR-Patienten festgestellt werden, wobei einer von ihnen ein terminales NTx-Versagen nach drei Jahren aufweist. Obwohl Unterschiede bezüglich der pathohistologischen Daten zwischen den AMR-Patienten mit und ohne NTx-Überleben nach drei Jahren festgestellt werden konnte, sind diese nicht signifikant.

Tab. 13: Pathohistologische Charakteristika der Baseline-Biopsie (Banff 2013)

	AMR (n=10)	AMR-Patienten mit erhaltener NTx- Funktion nach 36 Monaten (n=6)	AMR-Patienten mit NTx-Versagen nach 36 Monaten (n=4)	p
Monate zw. NTx und AMR, Median (IQA)	41 (63)	37 (56,5)	59 (75)	n.s.
Frühe AMR (<6 Monate nach NTx)	1 (10 %)	1 (16 %)	0 (0 %)	n.s.
Späte AMR (>6 Monate nach NTx)	9 (90 %)	5 (83 %)	4 (100 %)	n.s.
AMR + ACR:	6 (60 %)	5 (83 %)	1 (25 %)	n.s.
Banff 1A	1 (10 %)	1 (16 %)	0 (0 %)	n.s.
Banff 1B	1 (10 %)	1 (16 %)	0 (0 %)	n.s.
Banff 2A	2 (20 %)	1 (16 %)	1 (25 %)	n.s.
Banff 2B	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	n.s.
Borderline-Rejektion	2 (20 %)	2 (33 %)	0 (0 %)	n.s.
C4d-Positivität	8 (80 %)	6 (100 %)	2 (50 %)	n.s.
cg = 0/1/2/3	2/3/1/4	2/1/1/2	0/2/0/2	n.s.
g = 0/1/2/3	3/0/5/2	3/0/2/1	0/0/3/1	n.s.
ptc = 0/1/2/3	1/0/5/4	1/0/3/2	0/0/2/2	n.s.
v = 0/1/2/3	7/3/0/0	4/2/0/0	3/1/0/0	n.s.
g + ptc ≥ 2*	7 (70 %)	3 (50 %)	4 (100 %)	n.s.
ci = 0/1/2/3	3/4/2/1	2/3/1/0	1/1/1/1	n.s.
ct = 0/1/2/3	3/4/2/1	2/3/1/0	1/1/1/1	n.s.
cv = 0/1/2/3	2/2/2/4	2/1/2/1	0/1/0/3	n.s.

* $g \geq 1$ und ausgenommen ptc-Score ≥ 2 allein; p, Vergleich innerhalb der AMR-Gruppe zwischen Patienten mit und ohne NTx-Überleben nach 3 Jahren durch Mann-Whitney-U-Test

3.5 Nierenfunktion

3.5.1 Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

Im Folgenden werden die GFR-Werte der beiden Kontrollgruppen sowie der AMR-Patienten zum BL-Zeitpunkt sowie ein und zwei Jahre nach BL gegenübergestellt (Abb. 8). Der Patient Nr. 1 hat bereits 8 Tage nach NTx eine AMR entwickelt und weist somit vor und zu Beginn der Therapie noch ausgesprochen niedrige GFR-Werte auf. Die Werte der beiden Kontrollgruppen liegen deutlich über denen der AMR-Patienten zum BL-Zeitpunkt (AMR: 22 ml/Min/1,73m² mit IQA=15,3 ml/Min/1,73m²; p<0,001), ein Jahr nach BL (C_DSA⁻ vs. AMR: p<0,001 und C_DSA⁺ vs. AMR: p=0,003) sowie zwei Jahre nach BL (C_DSA⁻: 51,8 ml/Min/1,73m² mit IQA=26,9 ml/Min/1,73m² und C_DSA⁺: 49,6 ml/Min/1,73m² mit IQA=16,5 ml/Min/1,73m²; p=0,002). Somit war auch der mittels GFR-Differenz berechnete Nierenfunktionsverlust in der AMR-Gruppe nach zwei Jahren im Vergleich zum BL-Zeitpunkt mit 14,6 ml/Min/1,73m² und einem mit IQA von 17,2 ml/Min/1,73m² deutlich höher als in den beiden Kontrollgruppen (C_DSA⁻: 6,6 ml/Min/1,73m² mit IQA=15,8 ml/Min/1,73m² und C_DSA⁺: 2,8 ml/Min/1,73m² mit IQA=9,1 ml/Min/1,73m²). Im ersten Jahr hingegen ist der Unterschied bezüglich des GFR-Abfalls nicht so groß zwischen den drei Gruppen: AMR: 4,4 ml/Min/1,73m² mit IQA=4,8 ml/Min/1,73m²; C_DSA⁻: 1,9 ml/Min/1,73m² mit IQA=10,7 ml/Min/1,73m² und C_DSA⁺: 2,2 ml/Min/1,73m² mit IQA=10,7 ml/Min/1,73m². Zur Berechnung des Nierenfunktionsverlustes wurde der AMR-Pat. Nr. 1 aufgrund der frühen AMR ausgeschlossen. Innerhalb der einzelnen Studiengruppen gibt es für den Beobachtungszeitraum von zwei Jahren keine Unterschiede.

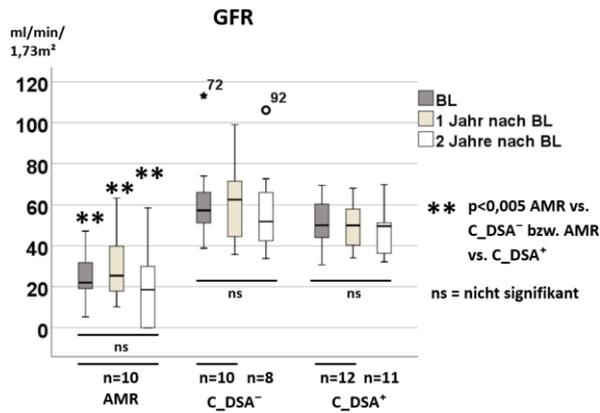


Abb. 8: GFR der AMR-Gruppe und der beiden Kontrollgruppen zum BL-Zeitpunkt, 1 Jahr nach BL und 2 Jahre nach BL; AMR, AMR-Gruppe; C_DSA⁻, Kontrollgruppe ohne DSA-Nachweis; C_DSA⁺, Kontrollgruppe mit DSA-Nachweis; bei NTx-Versagen GFR= 0 ml/Min/1,73m²

Bei den GFR-Werten der AMR-Patienten im Verlauf der AMR-Therapie sind geringfügige Unterschiede erkennbar (Abb. 9). Es fällt auf, dass die Werte der AMR-Gruppe vor AMR-Therapie höher sind als zum BL-Zeitpunkt (vor_BL=35,3 ml/Min/1,73m² mit IQA=16,6 ml/Min/1,73m²; p=0,005). Infolge der AMR-Therapie gab es keine signifikante Verbesserung der GFR-Werte (24 M nach BL=18,6 ml/Min/1,73m² mit IQA=33 ml/Min/1,73m²) verglichen zum BL-Zeitpunkt (22 ml/Min/1,73m² mit IQA=15,3 ml/Min/1,73m²). Da zwei Jahre nach BL bereits vier AMR-Patienten ein terminales Transplantatversagen erlitten haben und deren GFR-Werte deshalb 0 ml/Min/1,73m² betragen, liegt hier – verglichen zu den anderen Zeitpunkten – der niedrigste Medianwert vor. Der Patient Nr. 1 entwickelte wenige Tage nach NTx eine AMR, weshalb dessen Werte stark von denen der anderen AMR-Patienten abweichen. Ein terminales NTx-Versagen wurde bei den Patienten Nr. 3, 8 und 10 (14-15 M nach BL) sowie Nr. 9 (20 M nach BL) diagnostiziert.

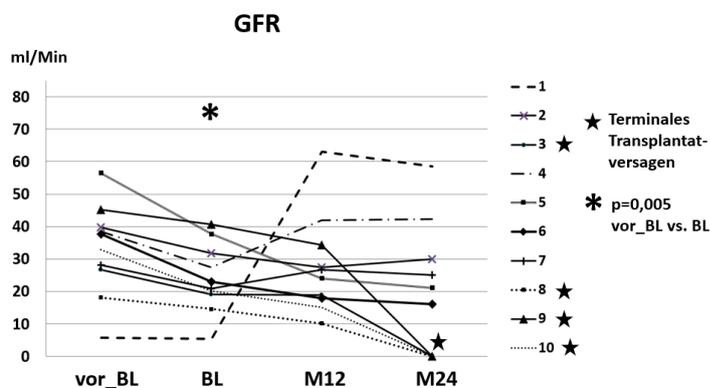


Abb. 9: Verlauf der GFR der AMR-Patienten vor Therapiebeginn, zum Therapiebeginn (BL), ein Jahr nach BL und zwei Jahre nach BL; bei NTx-Versagen GFR= 0 ml/Min/1,73m²

3.5.2 Proteinurie

Bezüglich der Proteinurie-Werte ergeben sich signifikante Unterschiede zum BL-Zeitpunkt bei den stabilen Kontrollgruppen ohne DSA (78 mg/l mit IQA=131 mg/l; $p < 0,001$) und mit DSA (212 mg/l \pm 289 mg/l; $p = 0,006$) verglichen zur AMR-Gruppe (752 mg/l mit IQA=1473 mg/l) (Abb. 10). Weiterhin unterscheiden sich die Proteinurie-Werte zwischen C_DSA⁻ und C_DSA⁺ zum BL-Zeitpunkt ($p = 0,03$) und ein Jahr nach BL ($p = 0,01$). Die Werte der stabilen Kontrollgruppe ohne DSA-Nachweis liegen auch ein Jahr später (85 mg/l mit IQA=70 mg/l; $p < 0,001$) deutlich unter denen der AMR-Gruppe (432 mg/l mit IQA=875 mg/l), während der Unterschied zwei Jahre später nicht mehr signifikant ist (C_DSA⁻: 77 mg/l mit IQA=80 mg/l vs. AMR: 366 mg/l mit IQA=312 mg/l; $p = 0,05$). Innerhalb der beiden stabilen Kontrollgruppen gibt es für den Beobachtungszeitraum von zwei Jahren keine Unterschiede. In Abb. 10 und 11 wurden die vier AMR-Patienten, welche ein terminales Transplantatversagen erlitten haben, zum Zeitpunkt zwei Jahre nach BL ausgeschlossen.

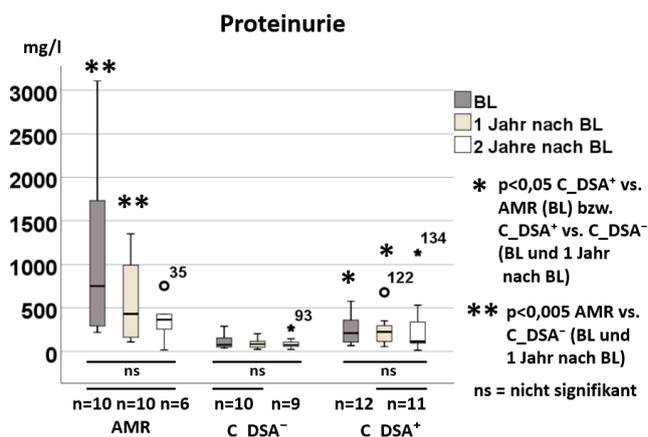


Abb. 10: Proteinurie der AMR-Gruppe und der beiden Kontrollgruppen zum BL-Zeitpunkt, 1 Jahr nach BL und 2 Jahre nach BL; AMR, AMR-Gruppe; C_DSA⁻, Kontrollgruppe ohne DSA-Nachweis; C_DSA⁺, Kontrollgruppe mit DSA-Nachweis; Ausschluss bei NTx-Versagen

Verglichen zum BL-Zeitpunkt (752 mg/l mit IQA=1473 mg/l) unterscheiden sich die Proteinurie-Werte der AMR-Patienten vor BL (683 mg/l mit IQA=1099 mg/l; $p = 0,011$) und 1 M nach BL (512 mg/l mit IQA=713 mg/l; $p = 0,015$). Ein bzw. zwei Jahre nach BL sind keine Unterschiede festzustellen (Abb. 11). Die Patientin Nr. 5 hat zum BL-Datum unter einer stark ausgeprägten Laryngitis gelitten. Dieser Infekt kann ursächlich für die massive Proteinurie sein.

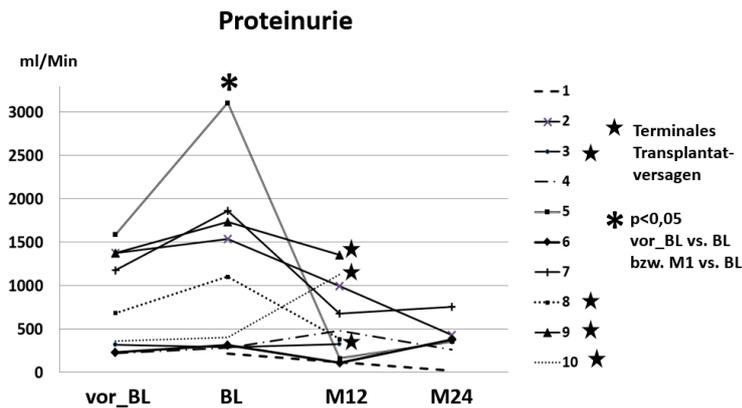


Abb. 11: Verlauf der Proteinurie der AMR-Patienten vor Therapiebeginn, zum Therapiebeginn (BL), ein Jahr nach BL und zwei Jahre nach BL; Ausschluss bei NTx-Versagen; Ausschluss bei NTx-Versagen

3.6 Nebenwirkungen der AMR-Therapie

Wird das Alter der AMR-Patienten zum BL-Zeitpunkt betrachtet, so sind die sechs Patienten mit NTx-Überleben signifikant jünger (30,5 Jahre mit IQA=15 Jahre) als die vier Patienten mit NTx-Versagen (56,5 Jahre mit IQA=13,5 Jahre) ($p=0,019$) (Tab. 14). Bei 8 Patienten erfolgten stationäre Aufenthalte innerhalb eines Jahres nach AMR-Therapie, wobei ein Patient (Nr. 10) viermal stationär aufgenommen werden musste. Der Grund einer stationären Aufnahme war in den meisten Fällen die Diagnose eines akuten Nierenversagens und/oder eine Infektion mit bakteriellen oder viralen Erregern. Die beiden Kontrollgruppen weisen mit je zwei stationären Aufenthalten signifikant weniger auf im Vergleich zur AMR-Gruppe mit insgesamt 20 Hospitalisationen (C_DSA^- : $p=0,004$ bzw. C_DSA^+ : $p=0,004$). Bei einer Beobachtungszeit von einem Jahr traten bei 7 von 10 AMR-Patienten insgesamt 10 schwerwiegende unerwünschte NW (SAE = Severe adverse event) innerhalb von 6 M nach AMR-Therapie auf. Während der AMR-Therapie entwickelte sich sowohl bei Pat. Nr. 6 als auch bei Pat. Nr. 8 eine reversible Arthralgie-Symptomatik. Nach AMR-Therapie waren hingegen 8 SAEs bei 6 Patienten zu beobachten: Jeweils ein Patient hatte eine virale Meningitis, eine Urosepsis durch ESBL-e.coli, eine Polyneuropathie mit Taubheit in Armen und Beinen und ein posteriores reversibles Enzephalopathie-Syndrom (PRES). Bei dem Patienten Nr. 9 hingegen entwickelte sich innerhalb von einem halben Monat nach AMR-Therapie sowohl ein Bridenileus als auch eine Koronare Herzkrankheit (Myokardinfarkt, KHK-2) mit zwei betroffenen Herzkranz-Gefäßen, sodass sofortige operative Behandlungen eingeleitet werden mussten (Ileus-OP, PTCA und Stent-

Einlage). Patient Nr. 10 hatte eine CMV-Erkrankung ca. ein Monat nach AMR-Therapie. Weiterhin konnte ein Nebenschilddrüsenadenom Level IV bei demselben Patienten 3 M nach AMR-Therapie diagnostiziert werden.

Während der AMR-Therapie kam es bei zwei Patienten zu unerwünschten NW (AE = Adverse events). So wurden bei Pat. Nr. 5 während der 2. AMR-Therapie ein Infekt der oberen Atemwege und bei Pat. Nr. 6 ein Harnwegsinfekt sowie starke Knieschmerzen diagnostiziert. Weiterhin konnten bei allen 10 Patienten während der Beobachtungszeit von einem Jahr nach AMR-Therapie unerwünschte Ereignisse festgestellt werden. Dazu gehören GIT-Störungen wie Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoe (n=9), Kopfschmerzen (n=4), bakterielle (6), virale (n=2) und mykotische Infektionen (n=2) sowie Ödeme (n=6). Zwei Patienten zeigten eine milde allergische Reaktion während der IVIg-Gabe, welche erfolgreich mit Antihistaminika und Prednisolon behandelt werden konnte. Pat. Nr. 5 leidet seit 1994 an einer Colitis ulcerosa, welche ursächlich für die rezidivierenden Diarrhoen ist. Pat. Nr. 1 hingegen beklagt seit 2010, also bereits vor seiner NTx, eine chronische Übelkeit. Demzufolge sind die GIT-Störungen dieser beiden Patienten nicht auf die AMR-Therapie zurückzuführen. Zudem hatte sich bei Pat. Nr. 9 aufgrund starker chronischer und z. T. blutiger Diarrhoen ein Perianalabszess entwickelt, welcher operativ behandelt werden musste. Intermittierende Dialysen erfolgten bei Pat. Nr. 8 ca. 10 M nach AMR-Therapie und bei Pat. Nr. 9 ca. 11 M nach AMR-Therapie.

Die Patienten der beiden Kontrollgruppen hatten deutlich weniger SAEs als die der AMR-Gruppe (C_DSA^- : $p=0,035$ bzw. C_DSA^+ : $p=0,021$). Zu den beiden SAEs der Kontrollgruppe ohne DSA-Nachweis gehören ein Infekt der oberen Atemwege und ein Harnwegsinfekt, welche stationär behandelt werden mussten. Die beiden Patienten der Kontrollgruppe mit DSA-Nachweis hingegen mussten zum einen aufgrund einer tiefen rechten Beinvenenthrombose und zum anderen wegen einer schweren peripheren arteriellen Verschlusskrankheit Stadium IV im rechten Fuß stationär behandelt werden. Unter den AEs konnten deutlich weniger GIT-Störungen bei den beiden Kontrollgruppen im Vergleich zur AMR-Gruppe festgestellt werden (C_DSA^- : $p=0,023$ bzw. C_DSA^+ : $p=0,001$). Jedoch musste ein Patient aus der Kontrollgruppe mit DSA-Nachweis aufgrund einer nachgewiesenen CMV-Colitis behandelt werden.

Die oben genannten SAEs und AEs waren mithilfe konservativer und operativer Therapiemaßnahmen kontrollierbar und somit nur vorübergehend. Weder eine maligne Veränderung noch eine opportunistische Infektion durch das Polyomavirus oder EBV konnten bei den Patienten der drei Untersuchungsgruppen beobachtet werden.

Tab. 14: Nebenwirkungsprofil der AMR-Gruppe nach AMR-Therapie sowie der beiden stabilen Kontrollgruppen über eine Beobachtungszeit von einem Jahr

	AMR (n=10)	C_DSA ⁻ (n=10)	C_DSA ⁺ (n=12)	p
Alter bei AMR-Diagnose bzw. BL in Jahren, Median (IQA)	40 (27)	55 (24)	45 (29)	0,019*
Stationärer Aufenthalt während AMR-Therapie in Tagen, Median (IQA)	23 (7)	-	-	-
Anzahl der stationären Aufenthalte nach Therapie (Tag 17 bis Mo 12) bzw. nach BL:	20	2	2	0,004**/ 0,002***
< 2	3 (30 %)	2 (20 %)	2 (17 %)	-
2-3	6 (60 %)	0	0	-
4	1 (10 %)	0	0	-
Anzahl der SAEs	10	2	2	0,035**/ 0,021***
AE nach Therapie (Tag 17 bis M12) bzw. nach BL:	10 (100 %)	6 (60 %)	6 (50 %)	n.s.
GIT-Störungen	9 (90 %)	3 (30 %)	1 (8 %)	0,023**/ 0,001***
Kopfschmerzen	4 (40 %)	1 (10 %)	0	n.s.
Infektionen	8 (80 %)	3 (30 %)	6 (50 %)	n.s.
bakteriell	6 (60 %)	2 (30 %)	5 (42 %)	n.s.
viral	2 (20 %)	1 (10 %)	1 (8 %)	n.s.
mykotisch	2 (20 %)	0	0	n.s.
allergische Reaktionen auf IVIg	2 (20 %)	-	-	-
Ödeme	6 (60 %)	1 (10 %)	1 (8 %)	n.s.
intermittierende Dialysen	2 (20 %)	0	0	n.s.

SAE, schwerwiegende unerwünschte NW; AE, unerwünschte NW; GIT-Störungen, gastrointestinale Störungen (Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe); * AMR-Patienten mit vs. ohne NTx-Überleben; ** AMR vs. C_DSA⁻; *** AMR vs. C_DSA⁺

Weiterhin erfolgte eine Darstellung der hämatologischen NW (Anämie, Thrombozytopenie, Leukopenie, Lymphopenie und Neutropenie), welche nach dem Common Terminology Criteria for Adverse Events version 3.0 (CTCAE) bewertet und somit jeweils in vier Schweregrade aufgeteilt wurden (Tab. 15). Die hämatologische Toxizität konnte als häufigste NW innerhalb des ersten Jahres nach AMR-Therapie festgestellt werden. Eine Anämie ist bei allen AMR-Patienten bereits vor der AMR-Therapie zu beobachten, wobei es sich um Grad I oder II handelt. Nach der Therapie haben sich die Hämoglobinwerte verschlechtert, sodass eine Anämie Grad II bis Grad

IV vorliegt. Die Anzahl der Thrombozyten ist bei allen AMR-Patienten nach der Therapie erniedrigt, sodass eine Thrombozytopenie Grad I oder II feststellbar ist. Vor AMR-Therapie konnte hingegen nur bei einem Patienten eine Thrombozytopenie diagnostiziert werden. Sechs von 10 AMR-Patienten haben nach der Therapie eine neu aufgetretene Leukopenie entwickelt, wohingegen drei Patienten eine neu aufgetretene Neutropenie nach AMR-Therapie aufweisen. Eine Lymphopenie Grad I-IV ist bei acht AMR-Patienten nach Therapie zu beobachten, während drei von ihnen bereits vor Therapie eine Lymphopenie Grad I oder II hatten. Die Thrombopenie, Leukopenie und Lymphopenie haben sich bei allen Patienten spontan zurückgebildet, wohingegen die Anämie erfolgreich mit höheren Erythropoetin-Dosen behandelt werden konnte.

Tab. 15: Hämatologische Nebenwirkungen der AMR-Gruppe über eine Beobachtungszeit von einem Jahr

	AMR-Gruppe gesamt (n=10)	
	Anzahl zum BL-Zeitpunkt	Anzahl nach Therapie <12 Mo
Anämie:	10 (100 %)	10 (100 %)
Grad I (m: 10-13,5 g Hb/dl; w: 10-12 g Hb/dl)	7 (70 %)	-
Grad II (8-10 g Hb/dl)	3 (30 %)	3 (30 %)
Grad III (6,5-8 g Hb/dl)/Grad IV (<6,5 g Hb/dl)	-/-	5 (50 %)/2 (20 %)
Thrombopenie:	1 (10 %)	10 (100 %)
Grad I (75-150 Thromboz./nl)	1 (10 %)	6 (60 %)
Grad II (50-75 Thromboz./nl)	-	4 (40 %)
Grad III (25-50 Thromboz./nl)/Grad IV (<25 Thromboz./nl)	-/-	-/-
Leukopenie:	0	6 (60 %)
Grad I (3-4 Leukoz./nl)	-	2 (20 %)
Grad II (2-3 Leukoz./nl)	-	2 (20 %)
Grad III (1-2 Leukoz./nl)/Grad IV (<1 Leukoz./nl)	-/-	2 (20 %)/-
Lymphopenie:	3 (30 %)	8 (80 %)
Grad I (0,8-1 Lymphoz./nl)	1 (10 %)	2 (20 %)
Grad II (0,5-0,8 Lymphoz./nl)	2 (20 %)	3 (30 %)
Grad III (0,2-0,5 Lymphoz./nl)/Grad IV (<0,2 Lymphoz./nl)	-/-	2 (20 %)/1 (10 %)
Neutropenie:	0	3 (30 %)
Grad I (1,5-2 Neutrophile/nl)	-	1 (10 %)
Grad II (1-1,5 Neutrophile/nl)	-	1 (10 %)
Grad III (0,5-1 Neutrophile/nl)/Grad IV (<0,5 Neutrophile/nl)	-/-	2 (20 %)/-

Hb, Hämoglobin; Thromboz., Thrombozyten; Leukoz., Leukozyten; Lymphoz., Lymphozyten

3.7 Die Spender-spezifischen HLA- Antikörper (DSA)

Tab. 16: Spender-spezifische Antikörper der AMR-Gruppe zum BL-Zeitpunkt

Pat-Nr.	HLA-MM (Gesamt)	HLA-MM (Kl. I: A,B)	HLA-MM (Kl. II: DQ,DR)	DSA Kl. I	DSA Kl. II	DSAm _{max}	Transplantatüberleben nach drei Jahren
1	4	3	1	-	DQ2	DQ2	ja
2	3	1	2	-	DR1	DR1	ja
3	8	4	4	A1	DQ2, DQ6	DQ6	nein
4	4	2	2	-	DQA5	DQA5	ja
5	3	2	1	-	DR16	DR16	ja
6	5	2	3	A29	DQ4, DQ7	DQ4	ja
7	6	3	3	A2, A29	DQ6	DQ6	ja
8	5	3	2	-	DR11, DR13	DR13	nein
9	5	3	2	-	DQA5, DR17	DQA5	nein
10	5	3	2	A1	DQ5	DQ5	nein

Die DSA der AMR-Gruppe wurden in Tab. 16 dargestellt. Zunächst sei erwähnt, dass es sich ausschließlich um neu entstandene DSA handelt. Bei Pat. Nr. 1 zeigten sich vor AMR-Therapie DQ2-Werte (MFI=5608), welche nicht sicher als spenderspezifisch eingestuft werden konnten und nach der AMR-Therapie auf hohe Werte mit MFI>10000 anstiegen. Patient Nr. 2 hatte DSA gegen DR1, wurde jedoch mit MFI<500 als fraglich positiv eingestuft und wies zudem im Laufe der Beobachtung abnehmende Werte auf. Beide Patienten weisen nach einer Beobachtungszeit von drei Jahren ein funktionierendes Transplantat auf. Aufgrund der fraglichen DSA-Positivität dieser beiden Patienten flossen deren Werte nicht in die weiteren MFI-Berechnungen und Abbildungen mit ein. Alle eindeutig DSA-positiven AMR-Patienten haben Klasse-II-DSA (8/8): DQ bei fünf und DR bei zwei Patienten sowie gleichzeitig DQ und DR bei einem Patienten. Vier Patienten haben zusätzlich Klasse-I-DSA, bei denen es sich ausschließlich um HLA-A-Ak handelt. Die AMR-Patienten mit den meisten HLA-MM (Pat. Nr. 3, 6, 7, 8, 9 und 10; MM ≥5) haben jeweils mindestens zwei verschiedene DSA entwickelt, wobei vier dieser Patienten (Pat. Nr. 3, 8, 9 und 10) im Laufe der Gesamt-Beobachtungszeit ein terminales NTx-Versagen erlitten. Obwohl die Anzahl der MM der Kl. I (Median: 3 mit IQA=1) höher war als die der Kl. II (Median: 2 mit IQA=1) gehören alle DSAm_{max} der HLA-Kl. II an, welche zum BL-Zeitpunkt einen Medianwert von 5192 MFI mit IQA=4309 MFI aufweisen (Abb. 12, links). Dabei liegen diese bei zwei Patienten (Pat. Nr. 5 und 9) im niedrigen, bei einem Patienten (Pat. Nr. 3) im

hohen und bei den fünf anderen sicher positiv getesteten AMR-Patienten im mittleren MFI-Bereich (horizontale Linien in Abb. 12, links). 3 M bzw. 12 M nach AMR-Therapie liegen die Median-Werte der DSAm_{ax} bei 3796 MFI mit IQA=5712 MFI bzw. bei 4439 MFI mit IQA=6806 MFI. Als DSA-Responder wurden diejenigen Patienten bezeichnet, bei denen ein Rückgang der DSAm_{ax}- und/oder der DSAs_{um}-Werte von mind. 10 % erreicht wurde. Somit gab es nach einer Beobachtungszeit von einem Jahr fünf DSA-Responder, wobei der DSAm_{ax}-Wert von Patient Nr. 10 von einem mittleren auf ein niedriges DSA-Level und der von Patient Nr. 3 von einem hohen auf ein mittleres DSA-Level gesunken sind. Der Patient Nr. 9 unterschreitet die Cutoff-Grenze von 500 MFI (gestrichelte Linie) ein Jahr nach BL (274 MFI) und liegt zuvor im niedrigen MFI-Bereich. Bei Patient Nr. 6 ist der DSAm_{ax}-Wert nach einem Jahr auf einen hohen MFI-Wert von 17086 angestiegen. Trotz dieses hohen Wertes besitzt der Patient nach einer Gesamt-Beobachtungszeit von drei Jahren ein funktionstüchtiges NTx. Wird die Anzahl der DSA zwischen den AMR-Patienten mit und ohne NTx-Überleben verglichen, so fällt kein signifikanter Unterschied auf ($p=0,352$). 3 M nach AMR-Therapie ist der mittlere DSAm_{ax}-Wert um 23,7 % und der mittlere DSAs_{um}-Wert um 33,4 % gesunken. 3 M nach BL ist der DSAs_{um}-Wert signifikant niedriger (BL: 7810 MFI mit IQA=8608 MFI vs. M3: 3796 MFI mit IQA=7719 MFI; $p=0,028$) (Abb. 12, rechts). Ein Jahr nach BL ist dieser Unterschied jedoch nicht mehr signifikant (M12: 5273 mit IQA=12000 MFI).

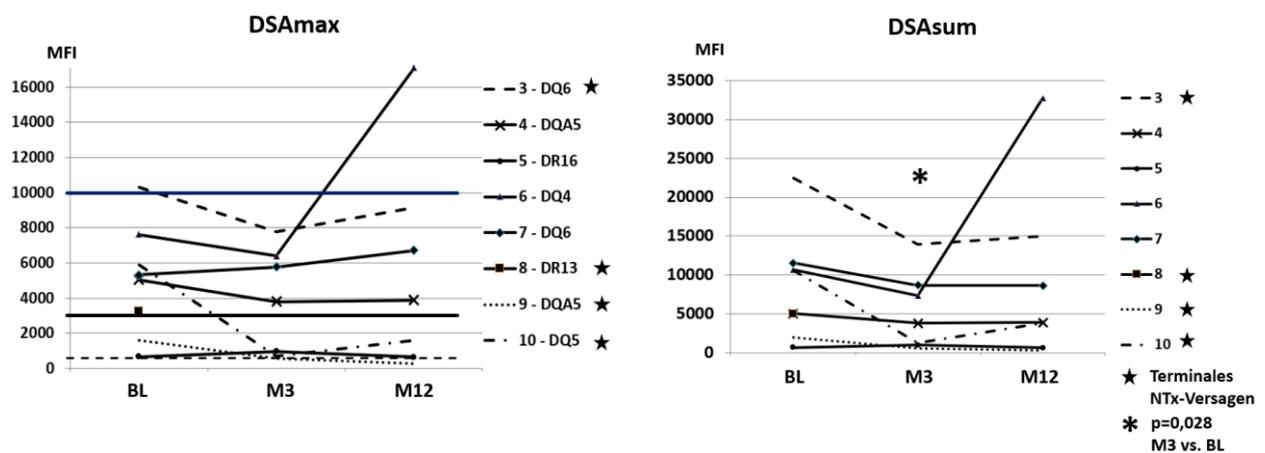


Abb.12: DSAm_{ax}-Werte (links) und DSAs_{um}-Werte (rechts) der AMR-Gruppe über eine Beobachtungszeit von einem Jahr; [Stern], NTx-Versagen

Im Folgenden werden alle DSA-Werte der als eindeutig positiv getesteten AMR-Patienten grafisch dargestellt (Abb. 13). Die erste vertikale Linie kennzeichnet den Beginn der AMR-Therapie, wohingegen die zweite vertikale Linie bei den Patienten Nr. 3, 8, 9 und 10 angibt, zu welchem Zeitpunkt ein terminales NTx-Versagen diagnostiziert wurde. Pat. Nr. 4 und Nr. 5

haben jeweils nur einen Spender-spezifischen Ak, die Patienten 8, 9 und 10 hingegen haben jeweils zwei DSA, und Pat. Nr. 3, 6 und 7 weisen sogar jeweils drei DSA auf. Die DSA-Werte der Patientin Nr. 8 konnten aufgrund fehlender Serumproben nicht zum Monat 3 bestimmt werden.

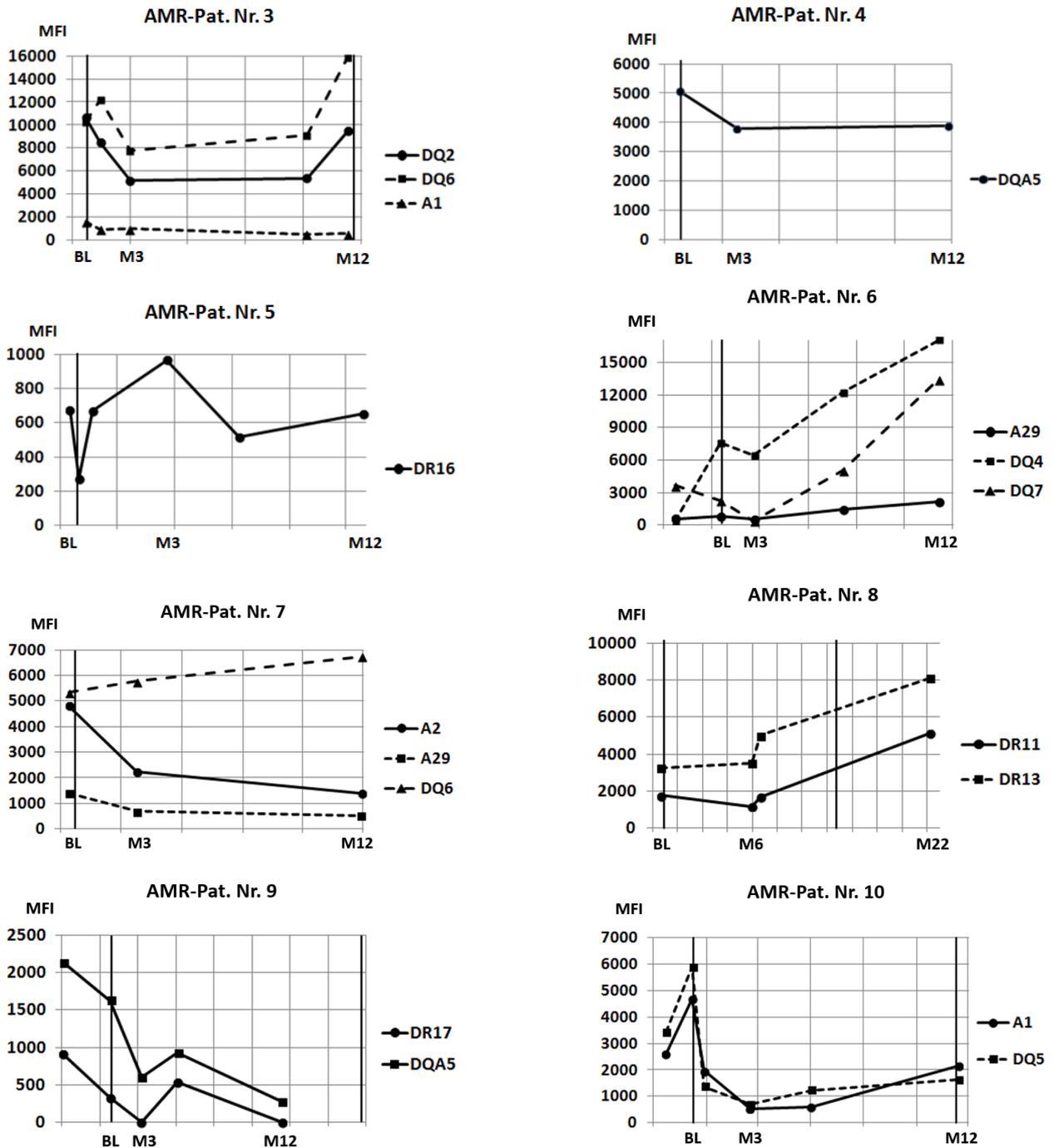


Abb. 13: DSA-Werte der AMR-Patienten Nr. 3-10 über eine Beobachtungszeit von jeweils einem Jahr bzw. über 22 Monate (AMR-Pat. Nr. 8)

3.8 Durchflusszytometrie

3.8.1 CD19⁺ B-Zellen

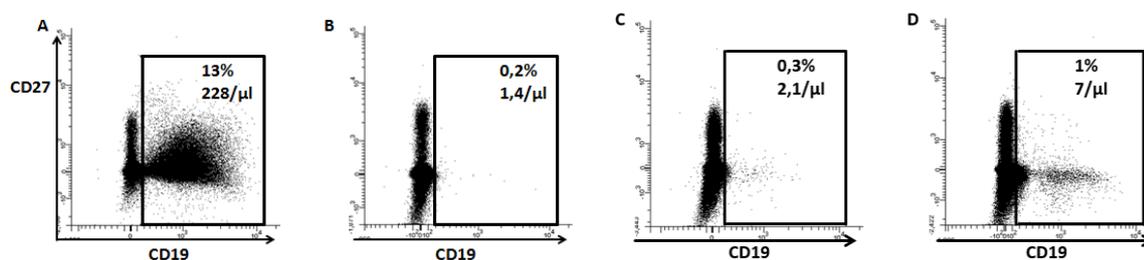


Abb. 14: CD19⁺ B-Zellen vor und nach AMR-Therapie am Beispiel eines repräsentativen AMR-Patienten; A, BL; B, M1; C, M12; D, M24

Die Auswertung der Daten der AMR-Gruppe ergab, dass der BL-Wert der AMR-Patienten (327/ μ l mit IQA=403/ μ l) signifikant höher liegt als der Wert der stabilen Kontrollgruppe ohne DSA (74/ μ l mit IQA=145/ μ l; $p=0,043$) (Abb. 15 A, oben).

Nach Therapie sind die absoluten B-Zell-Werte bei den AMR-Patienten signifikant niedriger im Vergleich zum BL-Wert (M1: 1,4/ μ l mit IQA=1/ μ l, $p=0,012$; M3: 2,4/ μ l mit IQA=4,3/ μ l, $p=0,018$; M6: 2,2/ μ l mit IQA=2,2/ μ l, $p=0,012$; M12: 3,8/ μ l mit IQA=5,5/ μ l, $p=0,012$; M18: 5,5/ μ l mit IQA=7/ μ l, $p=0,043$). Zwei Jahre nach Therapiebeginn liegt der Medianwert mit 7,2/ μ l und einem IQA von 13/ μ l noch signifikant unter dem BL-Wert ($p=0,043$) (Abb. 15 B, oben).

Bei der Auswertung der Daten zum prozentualen Anteil der CD19⁺ B-Zellen an den PBMC's verhält es sich ähnlich. Zu Beginn der Therapie ist dieser höher (8,5 % mit IQA=13,9 %) als der der stabilen Kontrollgruppe ohne DSA-Nachweis (3 % mit IQA=6,2 %, $p=0,043$) (Abb. 15 A, unten).

Im Vergleich zu den BL-Werten ist der relative Anteil der CD19⁺ B-Zellen 1 M (0,09 % mit IQA=0,08 %, $p=0,012$), 3 M (0,07 % mit IQA=0,11 %, $p=0,018$), 6 M (0,17 % mit IQA=0,13 %, $p=0,012$), 12 M (0,28 % mit IQA=0,28 %, $p=0,012$), 18 M (0,59 % mit IQA= 0,52 %, $p=0,043$) und auch 24 M (0,33 % mit IQA=0,91 %, $p=0,043$) nach Therapie bei den AMR-Patienten signifikant erniedrigt (Abb. 15 B, unten).

B-Zellen (CD19⁺CD3⁻)

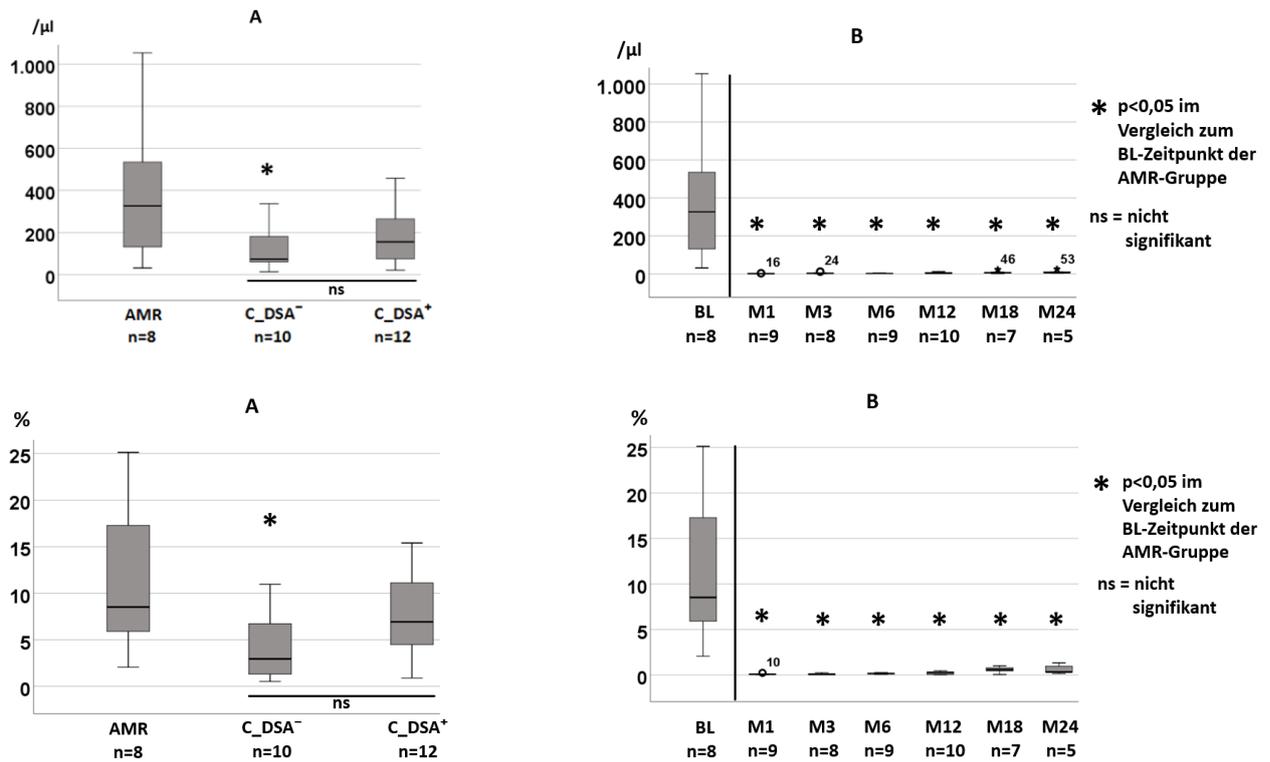


Abb. 15: Absolute Anzahl (oben) und prozentualer Anteil (unten) CD19⁺CD3⁻ B-Zellen von PBMC's; A: AMR, AMR-Gruppe zum BL-Zeitpunkt; C_DSA⁻, Kontrollgruppe ohne DSA-Nachweis; C_DSA⁺, Kontrollgruppe mit DSA-Nachweis; B: AMR-Gruppe über eine Beobachtungszeit von zwei Jahren; Ausschluss bei NTx-Versagen

3.8.2 Unreife B-Zellen (CD19⁺CD20⁺CD27⁻IgD⁺CD38⁺)

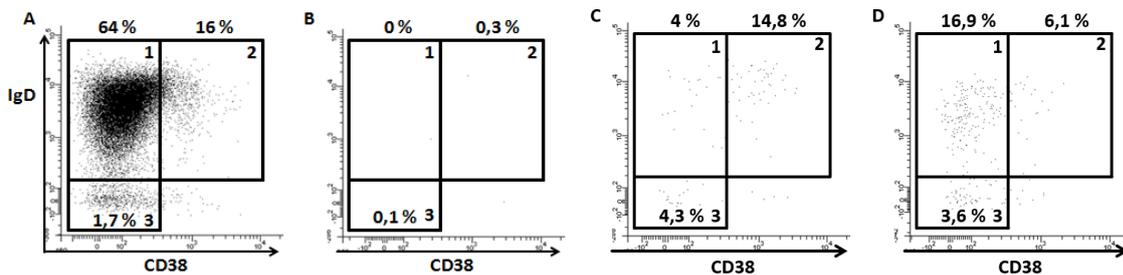


Abb. 16: Naive (CD20⁺CD27⁻IgD⁺CD38⁻; 1), unreife (CD20⁺CD27⁻IgD⁺CD38⁺; 2) und Doppelt negative (CD20⁺CD27⁻IgD⁻CD38⁻; 3) B-Zellen vor und nach AMR-Therapie am Beispiel eines repräsentativen AMR-Patienten; A, BL; B, M1; C, M12; D, M24

Die absolute Anzahl sowie auch der Anteil der unreifen B-Zellen an den B-Zellen (CD19⁺CD3⁻) sind bei den drei Gruppen annähernd gleich (AMR: 33/μl mit IQA=146/μl vs. C_DSA⁻: 11,9/μl

mit IQA=16,1/ μ l vs. C_DSA⁺: 37,5/ μ l mit IQA=79,2/ μ l sowie AMR: 12 % mit IQA=14,4 % vs. C_DSA⁻: 11 % mit IQA=20,3 % vs. C_DSA⁺: 19,9 % mit IQA=23,2 %) (Abb. 17 A).

Die Anzahl der unreifen B-Zellen ist über zwei Jahre nach AMR-Therapie signifikant reduziert im Vergleich zum BL-Wert (M1: 0,01/ μ l mit IQA=0,02/ μ l, p=0,012; M24: 0,23/ μ l mit IQA=4,11/ μ l, p=0,043) (Abb. 17 B, oben).

Der prozentuale Anteil der unreifen B-Zellen liegt 1 und 3 M nach Therapiebeginn (0,7 % mit IQA=1,5 % bzw. 0,3 % mit IQA=6,7 %, p=0,012 bzw. p=0,043) deutlich niedriger als vorher. 12 und 18 M nach Therapiebeginn erhöht sich der Wert und fällt zwei Jahre nach BL wieder auf 4,1 % mit IQA=17,1 % (Abb. 17 B, unten).

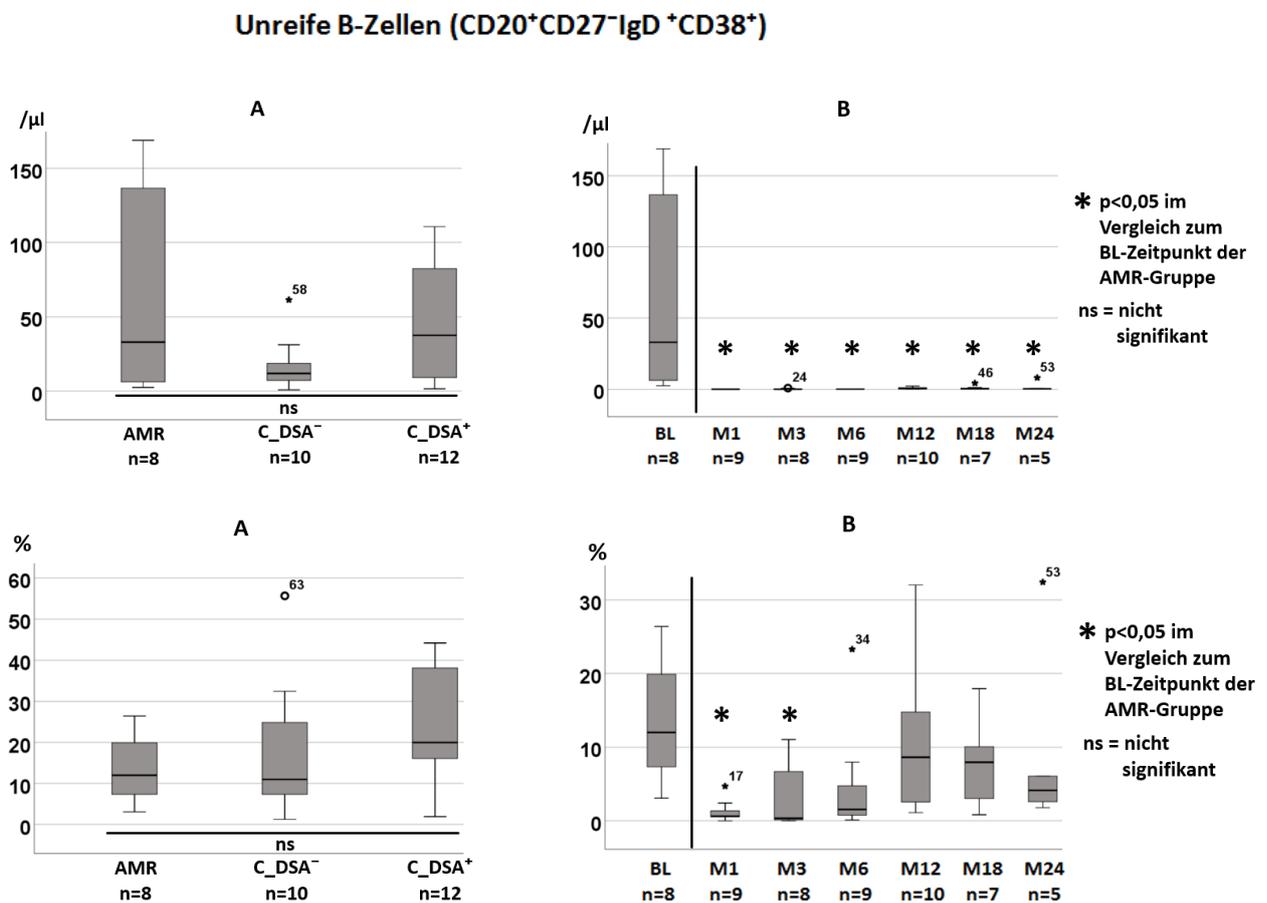


Abb. 17: Absolute Anzahl (oben) und prozentualer Anteil (unten) CD20⁺CD27⁻IgD⁺CD38⁺ unreife B-Zellen von B-Zellen; A: AMR, AMR-Gruppe zum BL-Zeitpunkt; C_DSA⁻, Kontrollgruppe ohne DSA-Nachweis; C_DSA⁺, Kontrollgruppe mit DSA-Nachweis; B: AMR-Gruppe über eine Beobachtungszeit von zwei Jahren; Ausschluss bei NTx-Versagen

3.8.3 Naive B-Zellen (CD19⁺CD20⁺CD27⁺IgD⁺CD38⁻)

Wird der prozentuale Anteil der naiven B-Zellen an den B-Zellen betrachtet, so fällt auf, dass die AMR-Patienten zu Beginn der Therapie einen signifikant höheren Wert aufweisen (60,8 % mit IQA=11,4 %) als die Kontrollgruppe mit DSA-Nachweis (49,9 % mit IQA=9,9 %; $p=0,012$) (Abb. 18 A, unten). Beim Vergleich der absoluten Werte fällt zwischen den drei Studiengruppen kein signifikanter Unterschied auf (Abb. 18 A, oben).

Sowohl bei der absoluten Anzahl als auch beim relativen Anteil der naiven B-Zellen fällt nach AMR-Therapie eine signifikante Reduktion der Werte über zwei Jahre auf (BL: 198/ μ l mit IQA=293/ μ l; M1: 0/ μ l mit IQA=0,01/ μ l, $p=0,012$; M12: 0,44/ μ l mit IQA=2,32/ μ l, $p=0,012$; M24: 1,73/ μ l mit IQA=4,78/ μ l, $p=0,043$ bzw. M1: 0,24 % mit IQA=0,71 %, $p=0,012$; M12: 10,6 % mit IQA=17 %, $p=0,012$; M24: 22,07 % mit IQA=22,85 %, $p=0,043$) (Abb. 18 B).

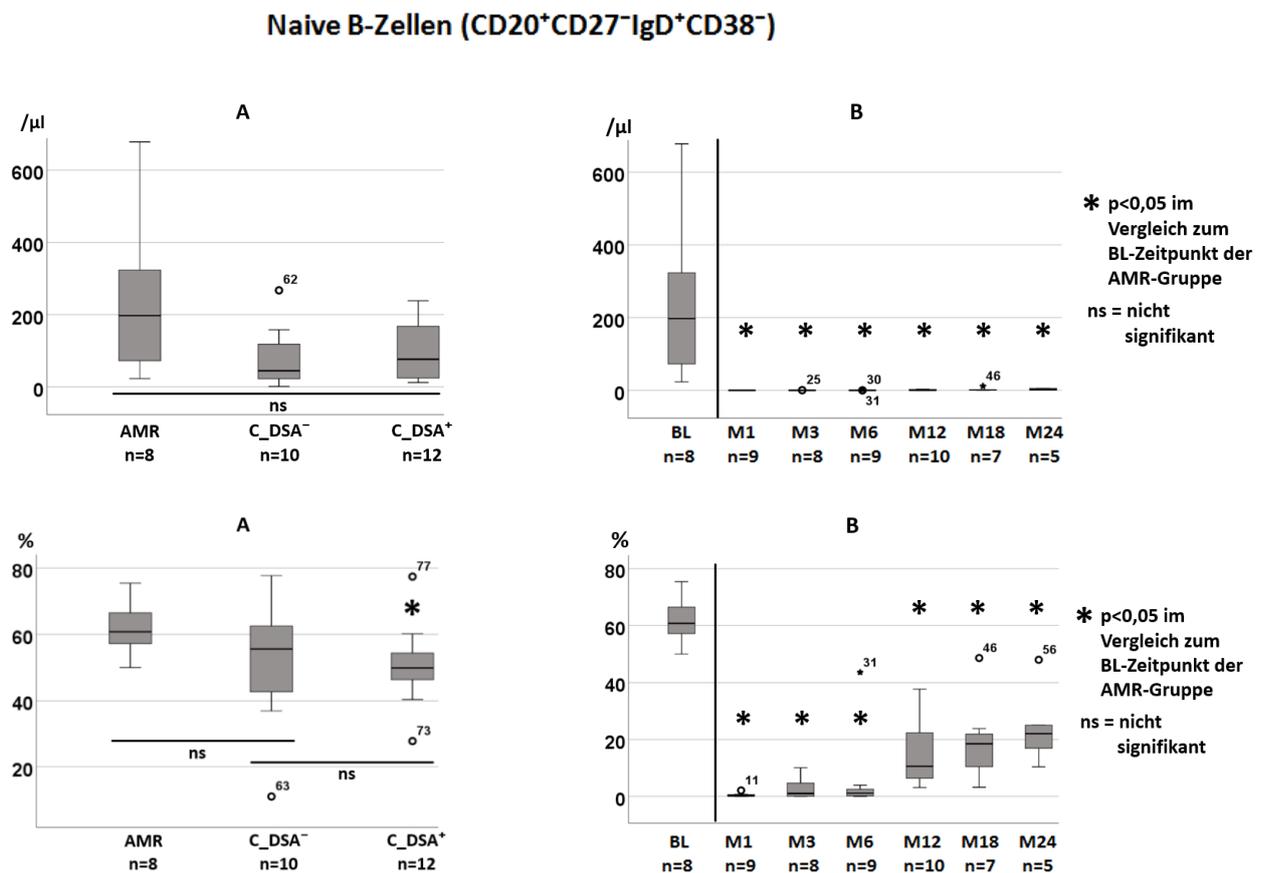


Abb. 18: Absolute Anzahl (oben) und prozentualer Anteil (unten) CD20⁺CD27⁻IgD⁺CD38⁻ naive B-Zellen von B-Zellen; A: AMR, AMR-Gruppe zum BL-Zeitpunkt; C_DSA⁻, Kontrollgruppe ohne DSA-Nachweis; C_DSA⁺, Kontrollgruppe mit DSA-Nachweis; B: AMR-Gruppe über eine Beobachtungszeit von zwei Jahren; Ausschluss bei NTx-Versagen

3.8.4 Doppelt negative (DN) B-Zellen (CD19⁺CD20⁺CD27⁻IgD⁻CD38⁻)

Bei der Betrachtung der absoluten Anzahl der DN B-Zellen fällt ein signifikanter Unterschied zwischen der AMR-Gruppe zum BL-Zeitpunkt (26,2/ μ l mit IQA=26,1/ μ l) und der Kontrollgruppe ohne DSA-Nachweis (6,9/ μ l mit IQA=14/ μ l, p=0,027) auf (Abb. 19 A, oben). Der prozentuale Anteil der DN B-Zellen liegt bei den drei dargestellten Gruppen bei einem Medianwert von 5,6 bis 9 % und stellt keinen deutlichen Unterschied dar (Abb. 19 A, unten).

Nach AMR-Therapie bleiben die absoluten DN-B-Zell-Werte über 24 M signifikant reduziert (M1: 0/ μ l mit IQA=0,01/ μ l, p=0,012; M12: 0,2/ μ l mit IQA=1,02/ μ l, p=0,012; M24: 0,76/ μ l mit IQA=1,79/ μ l, p=0,043) (Abb. 19 B, oben). Der relative Anteil dieser B-Zell-Population ist hingegen nur über 6 M nach AMR-Therapie signifikant reduziert ist (M1: 0,1 % mit IQA=0,3 %, p=0,012; M3: 0,5 % mit IQA=2,4 %, p=0,018; M6: 0,6 % mit IQA=2,4 %, p=0,017). 24 M nach Therapie hat sich der Anteil Doppelt negativer Zellen an den B-Zellen bei den AMR-Patienten wieder auf 9,4 % mit IQA=7,1 % erholt und ähnelt dem BL-Wert von 9 % mit IQA=11,2 % (Abb. 19 B, unten).

Doppelt negative B-Zellen (CD20⁺CD27⁻IgD⁻CD38⁻)

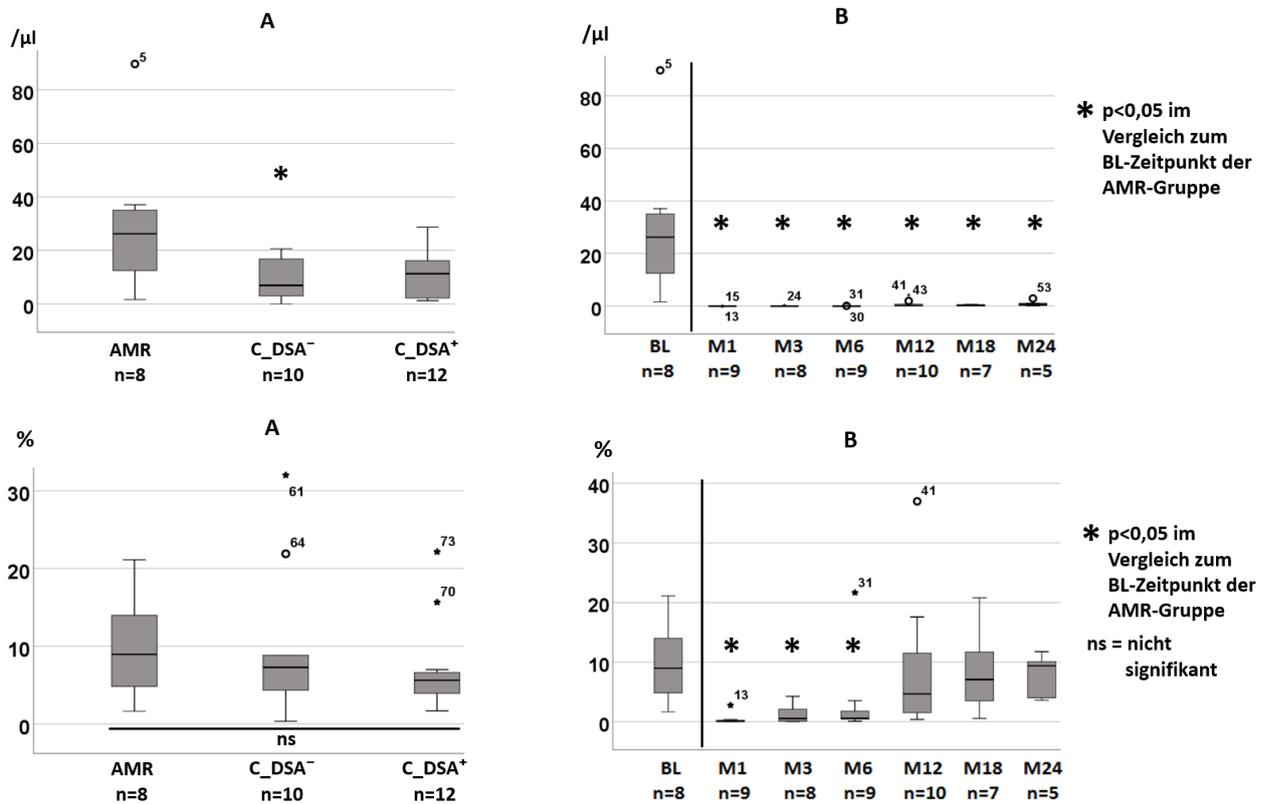


Abb. 19: Absolute Anzahl (oben) und prozentualer Anteil (unten) CD20⁺CD27⁻IgD⁻CD38⁻ DN B-Zellen von B-Zellen; A: AMR, AMR-Gruppe zum BL-Zeitpunkt; C_DSA⁻, Kontrollgruppe ohne DSA-Nachweis; C_DSA⁺, Kontrollgruppe mit DSA-Nachweis; B: AMR-Gruppe über eine Beobachtungszeit von zwei Jahren; Ausschluss bei NTx-Versagen

3.8.5 Gedächtnis-B-Zellen (CD19⁺CD20⁺CD27⁺)

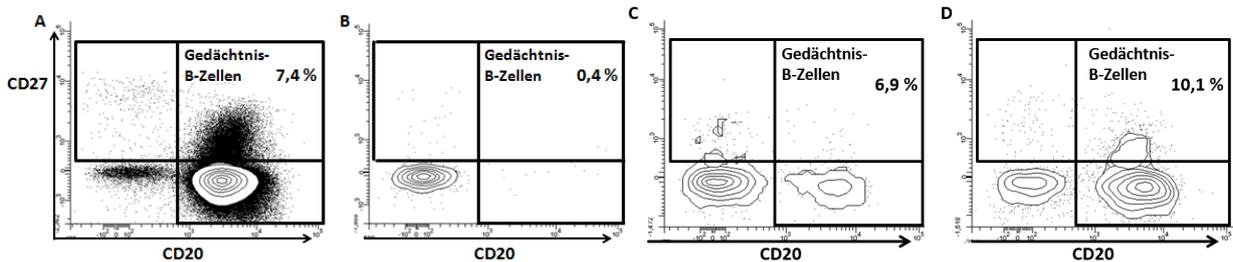


Abb. 20: Gedächtnis-B-Zellen (CD19⁺CD20⁺CD27⁺) vor und nach AMR-Therapie am Beispiel eines repräsentativen AMR-Patienten; A, BL; B, M1; C, M12; D, M24

Im Folgenden werden die CD20⁺CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen gegenübergestellt. (Abb. 21). Mit 36,1/µl und einem IQA von 41,2/µl liegt die absolute Anzahl dieser B-Zell-Population bei der AMR-Gruppe vor Therapie signifikant höher als bei der Kontrollgruppe ohne DSA-Nachweis

(8,7/ μ l mit IQA=17,9/ μ l, $p=0,034$). Der prozentuale Anteil der Gedächtnis-B-Zellen an den B-Zellen hingegen unterscheidet sich zwischen den drei Gruppen nicht signifikant voneinander (9,3 % bis 13,3 %).

Verglichen zur absoluten Anzahl der Gedächtnis-B-Zellen vor der AMR-Therapie ist über 2 Jahre nach Therapie eine signifikante Reduktion zu beobachten (M1: 0,1/ μ l mit IQA=0,02/ μ l, $p=0,012$; M12: 0,2/ μ l mit IQA=0,62/ μ l, $p=0,012$; M24: 0,74/ μ l mit IQA=1,5/ μ l, $p=0,043$) (Abb. 21 B, oben). 1 und 3 M nach BL ist der relative Anteil bei den AMR-Patienten verglichen zum BL-Zeitpunkt (9,3 % mit IQA=4,9 %) signifikant reduziert (M1: 0,6 % mit IQA=1,7 %, $p=0,012$ bzw. M3: 1,6 % mit IQA=2,8 %, $p=0,028$). Zwei Jahre nach BL hingegen liegt er mit 8,6 % und einem IQA von 6,6 % wieder nahe an dem BL-Wert von 9,3 % (Abb. 21 B, unten).

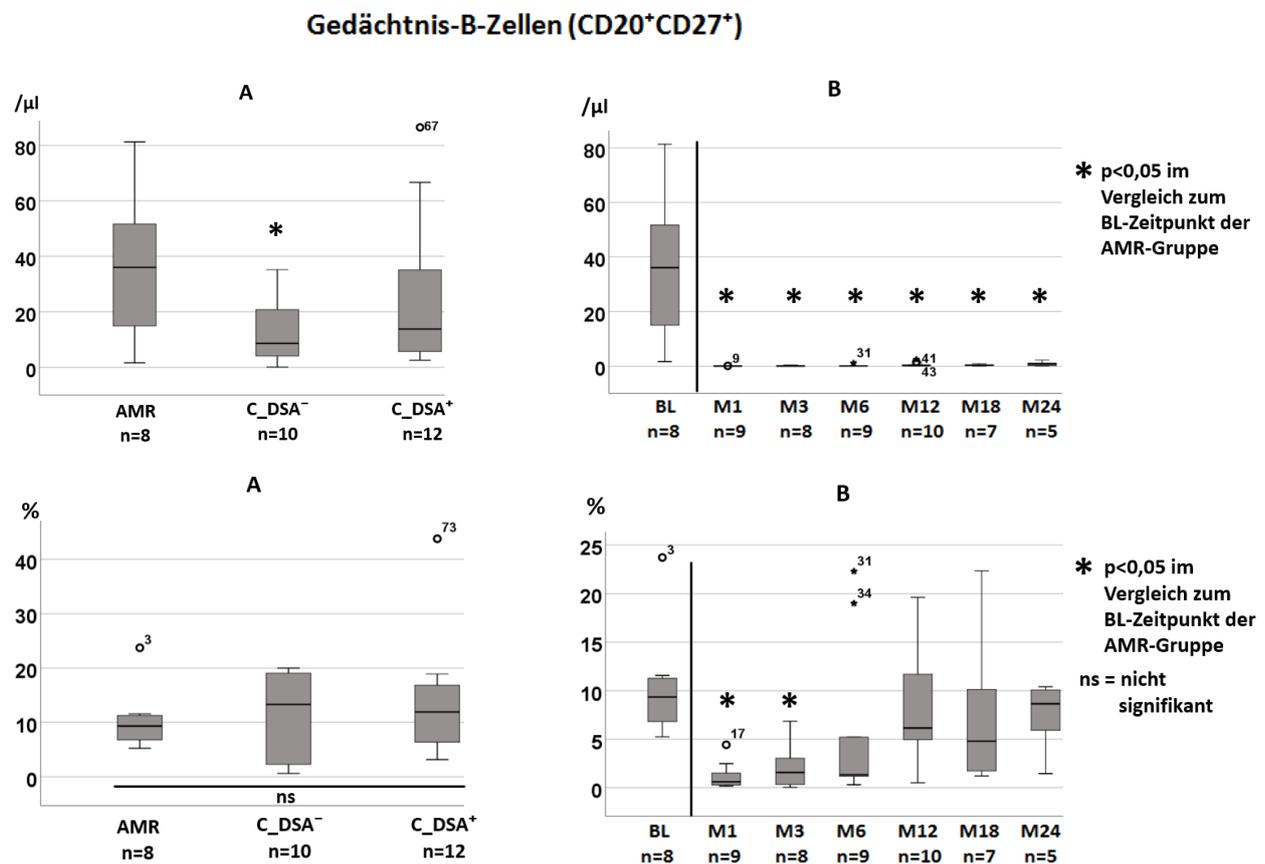


Abb. 21: Absolute Anzahl (oben) und prozentualer Anteil (unten) CD20⁺CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen von B-Zellen; A: AMR, AMR-Gruppe zum BL-Zeitpunkt; C_DSA⁻, Kontrollgruppe ohne DSA-Nachweis; C_DSA⁺, Kontrollgruppe mit DSA-Nachweis; B: AMR-Gruppe über eine Beobachtungszeit von zwei Jahren; Ausschluss bei NTx-Versagen

Non class-switched (IgD⁺) vs. class-switched (IgD⁻) Gedächtnis-B-Zellen

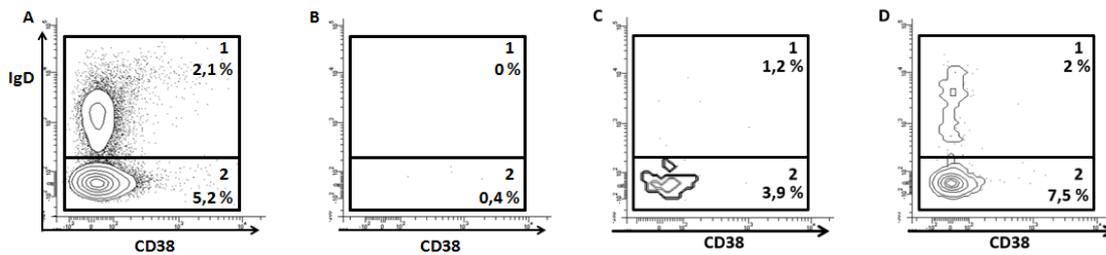


Abb. 22: IgD⁺ non class-switched (1) und IgD⁻ class-switched (2) Gedächtnis-B-Zellen vor und nach AMR-Therapie am Beispiel eines repräsentativen AMR-Patienten; A, BL; B, M1; C, M12; D, M24

Weiterhin werden die non class-switched (IgD⁺) sowie die class-switched (IgD⁻) Gedächtnis-B-Zellen miteinander verglichen (Abb. 23 A). Die Kontrollgruppe ohne DSA weist eine signifikant niedrigere Anzahl an IgD⁺ Gedächtnis-B-Zellen auf (3/μl mit IQA=6,6/μl) als die AMR-Patienten vor Therapie (11/μl mit IQA=22,7/μl, p=0,043). Ansonsten gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Studiengruppen bei diesen beiden Populationen.

Genauso wie bei den unreifen, naiven und DN B-Zellen bleiben die absoluten Werte der non class-switched sowie der class-switched Gedächtnis-B-Zellen verglichen zum BL-Wert über zwei Jahre nach AMR-Therapie signifikant reduziert (IgD⁺: M1: 0/μl mit IQA=0,01/μl, p=0,012; M12: 0,05/μl mit IQA=0,09/μl, p=0,012; M24: 0,05/μl mit IQA=0,13/μl, p=0,043) (IgD⁻: BL: 22,13/μl mit IQA=21,38/μl; M1: 0/μl mit IQA=0,02/μl, p=0,012; M12: 0,19/μl mit IQA=0,56/μl, p=0,012; M24: 0,53/μl mit IQA=1,3/μl, p=0,043) (Abb. 23 B, oben). Wird der prozentuale Anteil der non class-switched und class-switched Gedächtnis-B-Zellen der AMR-Patienten im Verlauf von zwei Jahren betrachtet, fallen einige Unterschiede auf (Abb. 23 B, unten). 1 bis 24 M nach Therapie ist der Anteil der unswitched Gedächtnis-B-Zellen signifikant verringert im Vergleich zum BL-Wert (M1: 0,3 % mit IQA=0,4 %, p=0,025; M12: 1,1 % mit IQA=0,7 %, p=0,017; M24: 0,7 % mit IQA=1 %, p=0,043). Weiterhin fällt auf, dass die switched Gedächtnis-B-Zellen einen Monat nach Therapie (0,4 % mit IQA=1,2 %; p=0,012) deutlich unter dem BL-Wert von 5,4 % mit einem IQA von 4,7 % liegen. Zwei Jahre nach Therapie hingegen haben diese mit 7 % und einem IQA von 5,1 % einen höheren Anteil an den B-Zellen als zum BL-Zeitpunkt. Vergleicht man hingegen den relativen Anteil der IgD⁺ mit dem der IgD⁻ Gedächtnis-B-Zellen der AMR-Gruppe ergibt sich ein signifikanter Unterschied sowohl ein Jahr als auch zwei Jahre nach AMR-Therapie (p=0,004 bzw. p=0,016). Wird die absolute Anzahl

betrachtet, so unterscheiden sich die non class-switched und class-switched Gedächtnis-B-Zellen zum Zeitpunkt M6, M12 und M18 voneinander ($p=0,04$ bzw. $p=0,015$ bzw. $p=0,026$).

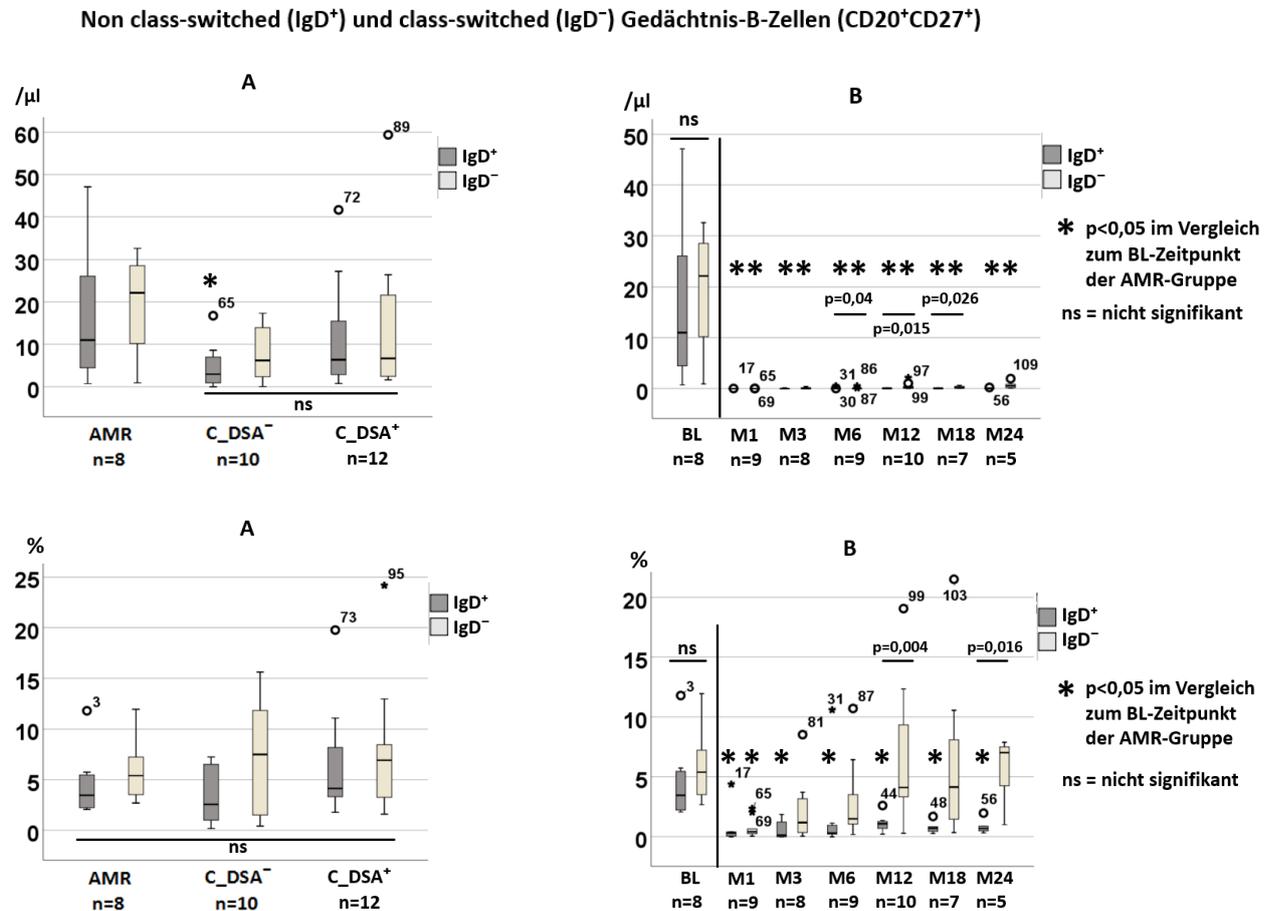


Abb. 23: Absolute Anzahl (oben) und prozentualer Anteil (unten) von CD20⁺CD27⁺IgD⁺ non class-switched und CD20⁺CD27⁺IgD⁻ class-switched Gedächtnis-B-Zellen von B-Zellen; A: AMR, AMR-Gruppe zum BL-Zeitpunkt; C_DSA⁻, Kontrollgruppe ohne DSA-Nachweis; C_DSA⁺, Kontrollgruppe mit DSA-Nachweis; B: AMR-Gruppe über eine Beobachtungszeit von zwei Jahren; Ausschluss bei NTx-Versagen

3.8.6 Verhältnis naive B-Zellen zu Gedächtnis-B-Zellen

Im Folgenden wurde das Verhältnis der naiven B-Zellen zu den Gedächtnis-B-Zellen der beiden stabilen Kontrollgruppen und der AMR-Patienten vor Therapiebeginn gegenübergestellt (Abb. 24 A). Die AMR-Patienten haben zu Beginn der Therapie den höchsten Wert (7,3 mit IQA=4,8). Die Kontrollgruppen ohne und mit DSA hingegen haben mit 3,9 und einem IQA von 17,4 bzw. 4,4 und einem IQA von 5,9 ein geringeres Verhältnis der naiven B-Zellen zu den Gedächtnis-B-Zellen.

Weiterhin wird das Verhältnis der naiven B-Zellen zu den Gedächtnis-B-Zellen der AMR-Patienten im Laufe der AMR-Therapie dargestellt (Abb. 24 B). Im Vergleich zum BL-Wert ist das Verhältnis der naiven B-Zellen zu den Gedächtnis-B-Zellen 1 bis 12 M nach Therapiebeginn signifikant erniedrigt (M1: 0,2 mit IQA=0,7, p=0,012; M3: 0,8 mit IQA=1,3, p=0,018; M6: 0,5 mit IQA=1, p=0,012; M12: 1,7 mit IQA=2,4, p=0,012). Zwei Jahre nach Therapiebeginn liegt dieses Verhältnis mit einem Medianwert von 2,9 und einem IQA von 9,2 noch immer deutlich niedriger als vor der Therapie, jedoch ist dieser Wert nicht signifikant. Der AMR-Pat. Nr. 4 ist 18 M nach AMR-Therapie mit einem Verhältnis von 39,5 % ein extremer Ausreißer und wurde nicht in der Abb. 24 B dargestellt.

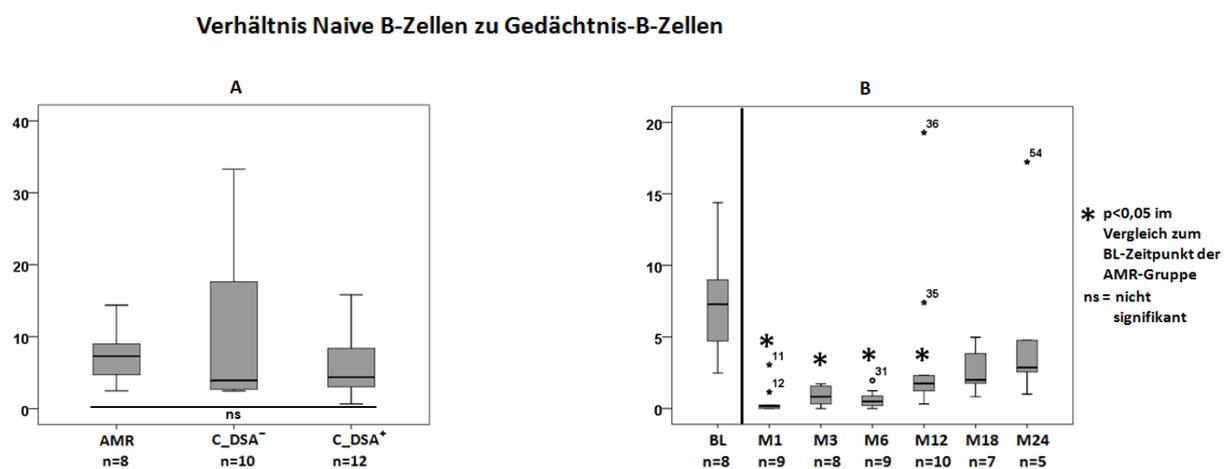


Abb. 24: Verhältnis naive B-Zellen zu Gedächtnis-B-Zellen; A: AMR, AMR-Gruppe zum BL-Zeitpunkt; C_DSA⁻, Kontrollgruppe ohne DSA-Nachweis; C_DSA⁺, Kontrollgruppe mit DSA-Nachweis; B: AMR-Gruppe über eine Beobachtungszeit von zwei Jahren; Ausschluss bei NTx-Versagen

3.8.7 Plasmazellen (CD19⁺CD20⁻CD27⁺IgD⁻CD38⁺)

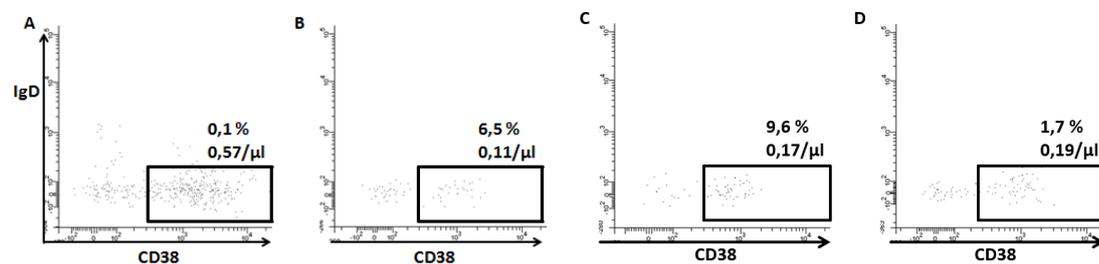


Abb. 25: Plasmazellen (CD20⁻CD27⁺IgD⁻CD38⁺) vor und nach AMR-Therapie am Beispiel eines repräsentativen AMR-Patienten; A, BL; B, M 1; C, M 12; D, M 24

Die absolute Anzahl der Plasmazellen ist mit Werten zwischen 0,25 und 0,54 Zellen/ μ l bei allen drei Gruppen ähnlich gering, während der relative Anteil der Plasmazellen an den B-Zellen bei den AMR-Patienten vor Therapie (0,09 % mit IQA=0,28 %) signifikant geringer ausfällt als bei der Kontrollgruppe ohne DSA-Nachweis (0,43 % mit IQA=0,92 %; $p=0,016$) (Abb. 26 A). 1 und 3 M nach AMR-Therapie ist diese Population auf 0,08/ μ l bzw. 0,1/ μ l abgefallen und unterscheidet sich somit signifikant vom BL-Wert (0,36/ μ l mit IQA=0,61/ μ l; $p=0,025$ bzw. $p=0,027$). Im weiteren Verlauf kommt es jedoch wieder zu einem Anstieg der PZ (Abb. 26 B, oben). Im Vergleich dazu ist der relative Anteil der Plasmazellen an den B-Zellen nach der AMR-Therapie über 24 M signifikant höher als vor der Therapie (M1: 6,5 % mit IQA=6,8 %, $p=0,012$; M12: 3,4 % mit IQA=3,8 %, $p=0,012$; M24: 1,7 % mit IQA=1,7 %, $p=0,043$) (Abb. 26 B, unten). Der Ausreißer Nr. 1 aus der Abb. 26 A wurde aus der Abb. 26 B ausgeschlossen.

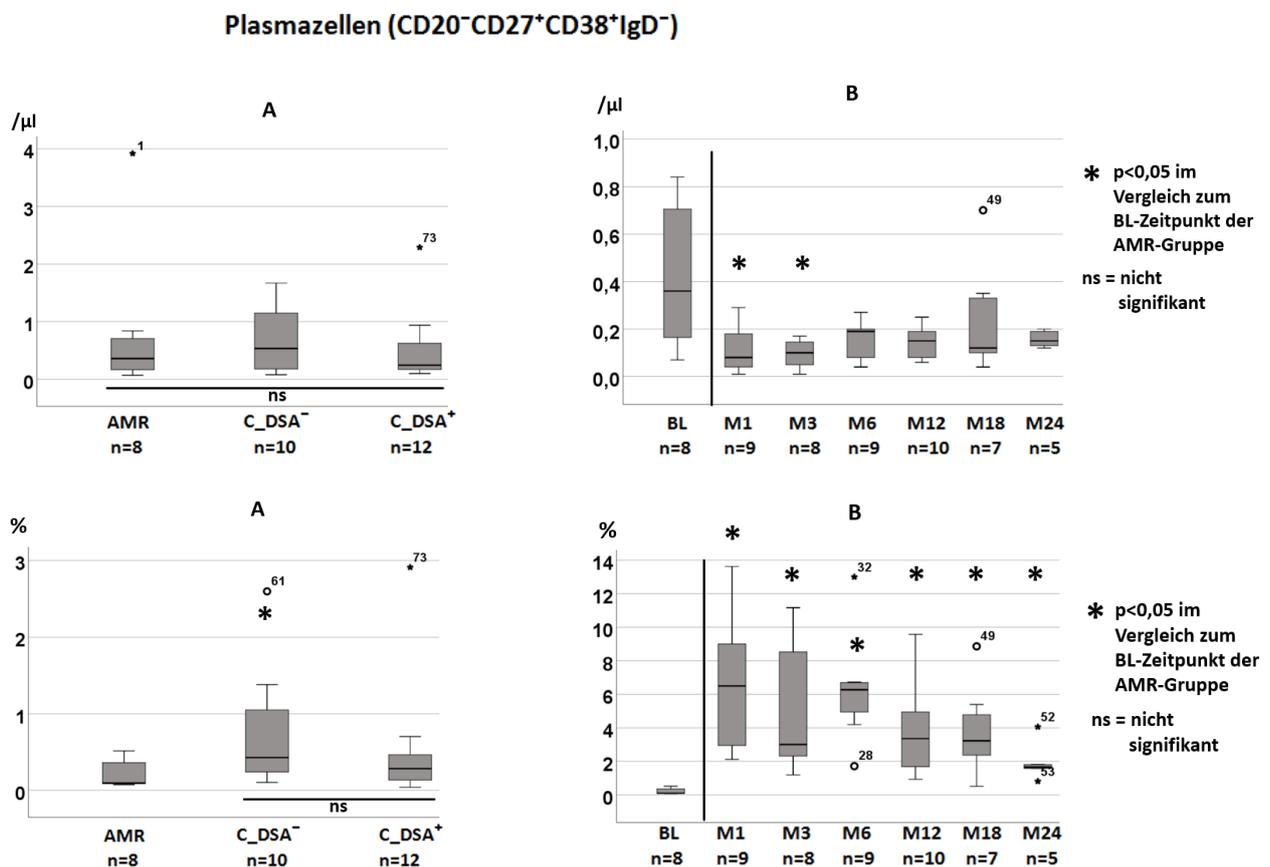


Abb. 26: Absolute Anzahl (oben) und prozentualer Anteil (unten) CD20⁻CD27⁺CD38⁺IgD⁻ Plasmazellen von B-Zellen; A: AMR, AMR-Gruppe zum BL-Zeitpunkt; C_DSA⁻, Kontrollgruppe ohne DSA-Nachweis; C_DSA⁺, Kontrollgruppe mit DSA-Nachweis; B: AMR-Gruppe über eine Beobachtungszeit von zwei Jahren; Ausschluss bei NTx-Versagen

HLA-DR⁻ und HLA-DR⁺ Plasmazellen (CD20⁻CD27⁺CD38⁺IgD⁻)

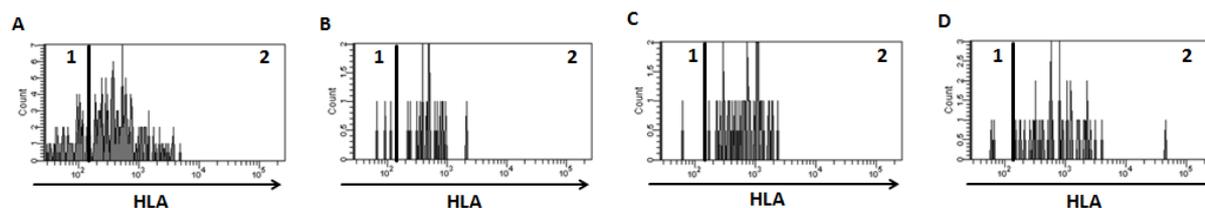


Abb. 27: HLA-DR⁻ (1) und HLA-DR⁺ (2) Plasmazellen (CD20⁻CD27⁺ CD38⁺ IgD⁻) vor und nach AMR-Therapie am Beispiel eines repräsentativen AMR-Patienten; A, BL; B, M 1; C, M 12; D, M 24

Weiterhin wurden die Plasmazellen auf ihre HLA-DR-Expression untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass mit 60-80 % die überwiegende Mehrheit HLA-DR positiv ist (Abb. 27).

Betrachtet man die absolute Anzahl der beiden Plasmazell-Populationen separat, so kann festgestellt werden, dass jeweils sowohl bei den HLA-DR⁺ als auch bei den HLA-DR⁻ Plasmazellen die Medianwerte der drei Gruppen sehr ähnlich sind (Abb. 28 A, oben). Nach AMR-Therapie beobachtet man einen Abfall der HLA-DR⁺ PZ, welcher nach einem Monat (0,07/ μ l mit IQA=0,12/ μ l; p=0,025) im Vergleich zum BL-Wert (0,28/ μ l mit IQA=0,42/ μ l) einen signifikanten Wert erreicht (Abb. 28 B, oben). Zwei Jahre nach Therapiebeginn ist diese PZ-Population auf 0,11/ μ l mit IQA=0,07/ μ l wieder etwas angestiegen. Der Ausreißer Nr. 1 aus der Abb. 28 A wurde nicht in die Abb. 28 B eingeschlossen. Bei den HLA-DR⁻ Plasmazellen hingegen ist ein signifikanter Abfall nach 1 M (0,02/ μ l mit IQA=0,03/ μ l; p=0,036), 3 M (0,01/ μ l mit IQA=0,03/ μ l; p=0,027) und nach einem Jahr (0,03/ μ l mit IQA=0,03/ μ l; p=0,034) im Vergleich zum BL-Zeitpunkt (0,1/ μ l mit IQA=0,21/ μ l) zu beobachten. Auch hier ist 24 M nach Therapiebeginn mit 0,04/ μ l und einem IQA von 0,07/ μ l nur eine leichte Repopulation erkennbar.

Bei den relativen Werten kann festgestellt werden, dass die HLA-DR⁺ PZ der AMR-Gruppe vor der Therapie (0,06 % mit IQA=0,27 %) geringer ausfallen im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne DSA (0,29 % mit IQA=0,5 %; p=0,043) (Abb. 26 A) (Abb. 28 A, unten). Nach AMR-Therapie sind sowohl die HLA-DR⁺ als auch die HLA-DR⁻ Plasmazellen über 24 M signifikant erhöht (HLA-DR⁺: M1: 4,57 % mit IQA=5,8 %, p=0,012; M24: 1,32 % mit IQA=1,98 %, p=0,043) (HLA-DR⁻: BL: 0,04 % mit IQA=0,06 % M1: 1,47 % mit IQA=1,9 %, p=0,012; M24: 0,44 % mit IQA=0,29 %, p=0,043) (Abb. 28 B, unten).

Beim Vergleich der absoluten Werte der HLA-DR⁺ mit den HLA-DR⁻ Plasmazellen innerhalb der AMR-Gruppe kann ein signifikanter Unterschied zum BL-Zeitpunkt (p=0,038), 3 M

($p=0,003$) und 12 M ($p<0,001$) nach Therapiebeginn festgestellt werden. Der relative Anteil zwischen diesen beiden Subpopulationen unterscheidet sich hingegen im gesamten Zeitraum nach AMR-Therapie signifikant voneinander (Abb. 28 B).

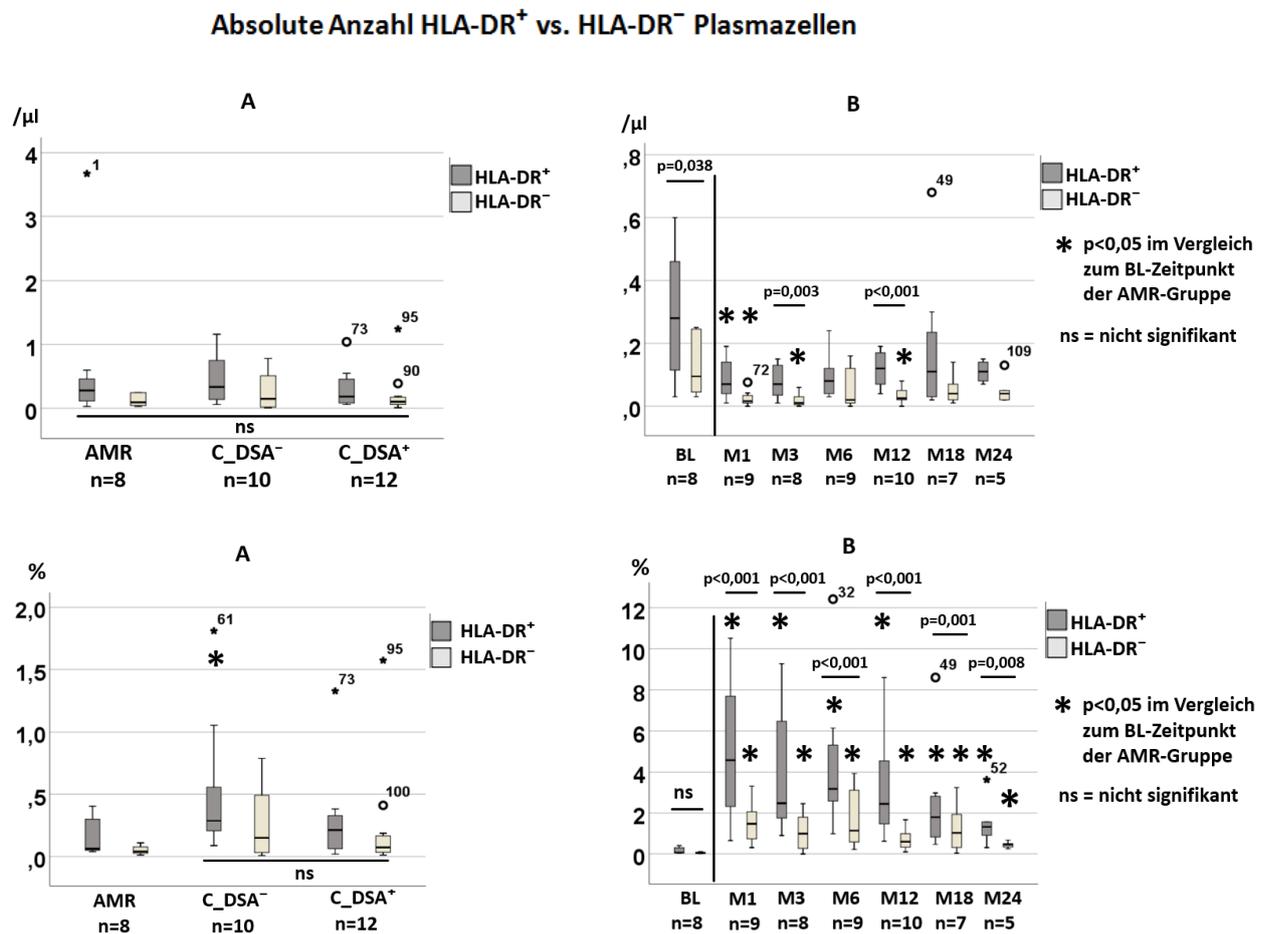


Abb. 28: Absolute Anzahl (oben) und prozentualer Anteil (unten) HLA-DR⁺ und HLA-DR⁻ Plasmazellen von B-Zellen; A: AMR, AMR-Gruppe zum BL-Zeitpunkt; C_DSA⁻, Kontrollgruppe ohne DSA-Nachweis; C_DSA⁺, Kontrollgruppe mit DSA-Nachweis; B: AMR-Gruppe über eine Beobachtungszeit von zwei Jahren; Ausschluss bei NTx-Versagen

Wie bereits in Abschnitt 2.4.4 erwähnt, lieferte die Bestimmung der Plasmazellen mittels CD138 keine auswertbaren Ergebnisse. Die Medianwerte der CD138⁺ PZ sind mit unter 0,05/μl bei allen drei Gruppen sehr niedrig und werden daher nicht näher betrachtet (Abb. 29).

Absolute Anzahl Plasmazellen (CD20⁻CD27⁺CD38⁺CD138⁺)

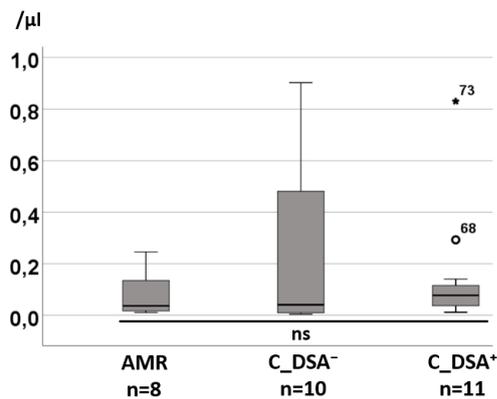


Abb. 29: Absolute Anzahl CD20⁻CD27⁺CD38⁺CD138⁺ Plasmazellen; A: AMR, AMR-Gruppe zum BL-Zeitpunkt; C_DSA⁻, Kontrollgruppe ohne DSA-Nachweis; C_DSA⁺, Kontrollgruppe mit DSA-Nachweis; B: AMR-Gruppe über eine Beobachtungszeit von zwei Jahren; Ausschluss bei NTx-Versagen

3.9 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

3.9.1 Der B-Zell aktivierende Faktor (BAFF)

Der Vergleich der Serum-BAFF-Werte der AMR-Gruppe zum BL-Zeitpunkt mit denen der beiden Kontrollgruppen zeigt keine signifikanten Unterschiede (Abb. 30 A). Die Medianwerte der Kontrollgruppe ohne DSA (937 pg/ml mit IQA=262 pg/ml) und der Kontrollgruppe mit DSA (959 pg/ml mit IQA=243 pg/ml) fallen etwas höher aus als der Wert der AMR-Gruppe (683pg/ml mit IQA=805pg/ml).

Die sBAFF-Konzentrationen der AMR-Patienten vor und nach AMR-Therapie unterscheiden sich wiederum signifikant (Abb. 30 B). Verglichen mit dem BAFF-Wert zum BL-Zeitpunkt (683 pg/ml mit IQA=805pg/ml) sind die Werte der AMR-Patienten 3 (2200 pg/ml mit IQA=1258 pg/ml; p=0,008), 6 (2617 pg/ml mit IQA=1951 pg/ml; p=0,012), 9 (3506 pg/ml mit IQA=1190 pg/ml; p=0,008) und 12 M (3525 pg/ml mit IQA=1869 pg/ml; p=0,012) nach Therapiebeginn erhöht. Der BL-Wert von Patient Nr. 3, der 6-M-Wert des Patienten Nr. 10 sowie der 12-M-Wert der Patientin Nr. 8 konnten nicht bestimmt werden.

BAFF-Serum-Konzentrationen

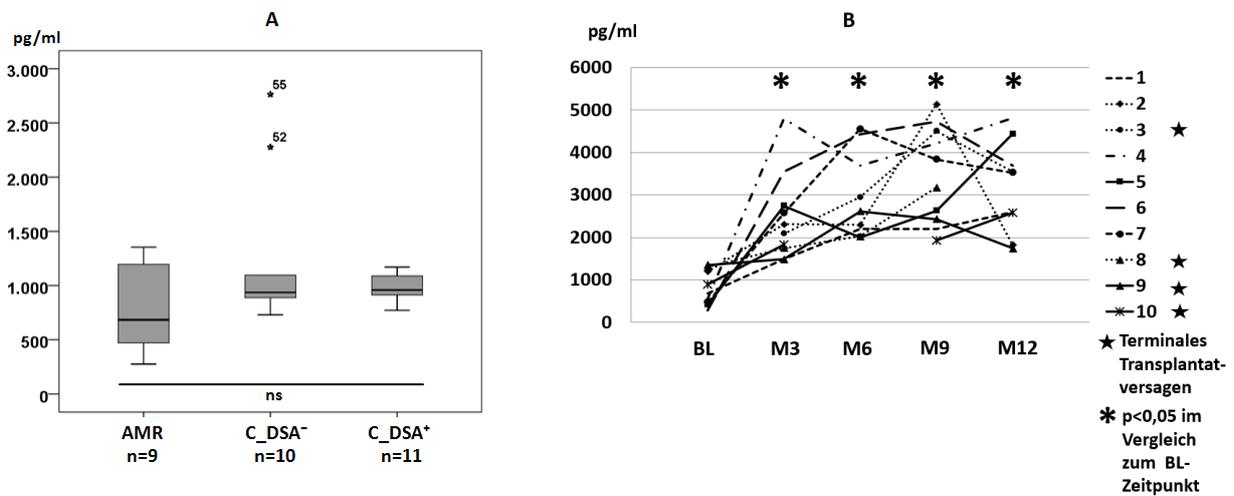


Abb. 30: Serum-BAFF-Konzentrationen; A: AMR, AMR-Gruppe zum BL-Zeitpunkt; C_DSA⁻, Kontrollgruppe ohne DSA-Nachweis; C_DSA⁺, Kontrollgruppe mit DSA-Nachweis; B: AMR-Gruppe über eine Beobachtungszeit von einem Jahr; Ausschluss bei NTx-Versagen

In der Gegenüberstellung der BAFF-Konzentrationen und der B-Zellen verhält sich die BAFF-Konzentration in den ersten drei Monaten nach Therapie umgekehrt proportional zur B-Zellzahl. (Abb. 31). So steigt die BAFF-Konzentration zum Zeitpunkt M3 von ursprünglich 0,68 ng/ml mit IQA=0,73 ng/ml auf 2,2 ng/ml mit IQA=0,99 ng/ml, während die B-Zellen von 327/μl mit IQA=403/μl auf 2,4/μl mit IQA=4,3/μl sinken. Im weiteren Beobachtungszeitraum kann ein Konzentrationsanstieg sowohl von BAFF als auch von den CD19⁺B-Zellen beobachtet werden. Die sBAFF-Konzentrationen zum Zeitpunkt M9 und M12 sind annähernd gleich, während die B-Zellen nach einem Jahr weiterhin zunehmen. Der Friedman-Test ergab eine Signifikanz von p<0,001.

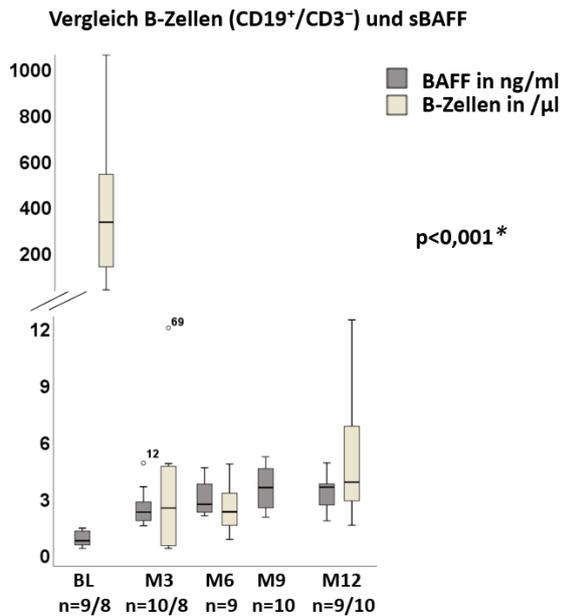


Abb. 31: BAFF-Konzentrationen und B-Zellen mit gebrochener y-Achse; * Friedman-Test

3.9.2 Mumps/Masern/Röteln (MMR)

Es konnte festgestellt werden, dass sich die Ak-Werte weder gegen Mumps, noch gegen Masern, noch gegen Röteln infolge der AMR-Therapie verändert haben. Bei der Betrachtung der Mumps-Ak-Titer zum BL-Zeitpunkt (2600 IU/ml mit IQA=2895 IU/ml) und 12 M nach BL (4250 IU/ml mit IQA=6758 IU/ml), so fällt eine leichte Zunahme der Titer auf (Abb. 32). Die Ak-Werte der AMR-Gruppe gegen Masern sind weitestgehend stabil geblieben (BL: 950 IU/ml mit IQA=5363 IU/ml; 1 Jahr: 3400 IU/ml mit IQA=3420 IU/ml) (Abb. 33). Bei Patient Nr. 1 liegt der Masern-Ak-Titer 9 und 12 M nach BL unterhalb der Nachweisgrenze. Die Ak-Titer gegen Röteln sind ebenfalls eher ansteigend als abnehmend, jedoch sind auch hier keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen (BL: 64 IU/ml mit IQA=46 IU/ml; M12: 94 IU/ml mit IQA=215 IU/ml) (Abb. 34).

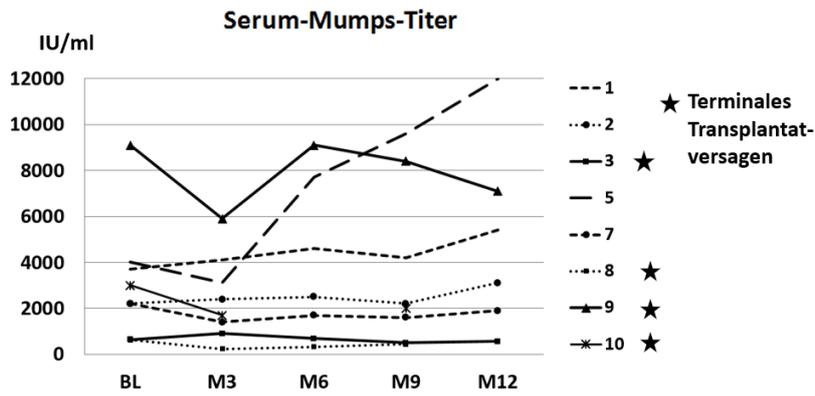


Abb. 32: Mumps-Ak-Titer der AMR-Gruppe über eine Beobachtungszeit von einem Jahr

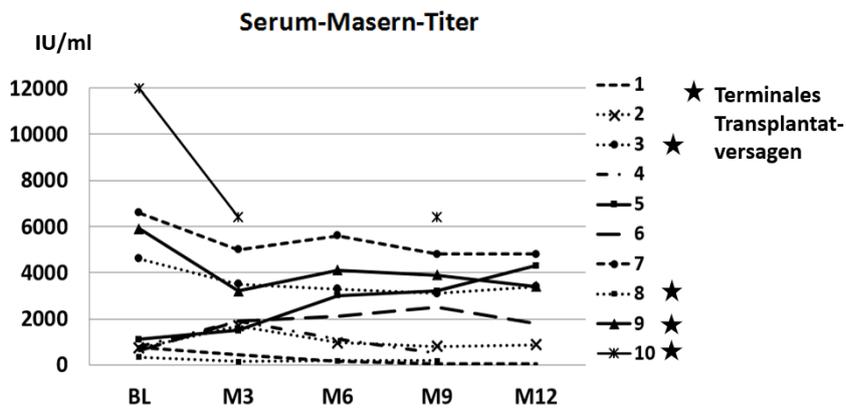


Abb. 33: Masern-Ak-Titer der AMR-Gruppe über eine Beobachtungszeit von einem Jahr

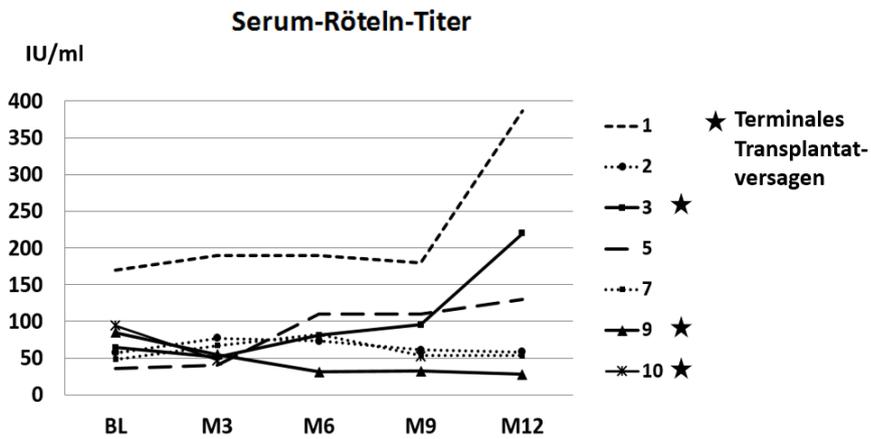


Abb. 34: Röteln-Ak-Titer der AMR-Gruppe über eine Beobachtungszeit von einem Jahr

4 Diskussion

Die frühzeitige Diagnostik und Behandlung von Transplantatabstoßungen hat eine wesentliche Bedeutung bei Patienten nach NTx im Hinblick auf das Transplantatüberleben. Ein nach wie vor ungelöstes Problem stellen Antikörper-vermittelte Abstoßungen dar, welche zu den Hauptursachen eines NTx-Versagens gehören [87][88]. Bisweilen liegt keine eindeutige Therapie-Leitlinie, sondern nur Therapieempfehlungen der unterschiedlichen Fachgesellschaften vor. Die internationale Leitlinie der KDIGO empfiehlt zur Behandlung einer akuten AMR den Einsatz von PPH, IVIg, Rituximab und/oder Lymphozyten-depletierenden Ak mit oder ohne Kortikosteroide [94]. Eine chronische oder auch spät auftretende Form der AMR wird in den Empfehlungen bislang noch nicht berücksichtigt, obwohl bzw. weil diese Form der AMR sehr therapieresistent erscheint.

Die vorliegende Studie evaluiert eine potentiell synergistische AMR-Therapie, die u. a. aus CD20⁺ depletierenden Antikörpern (Rituximab) und dem Proteasomen-Inhibitor Bortezomib besteht. Ziel der Studie ist es, neben dem klinischen Verlauf der behandelten zehn Patienten auch deren DSA-Verlauf sowie die immunphänotypischen Veränderungen von B-Zellpopulationen – insbesondere Plasmazellen – prospektiv über zwei Jahre im Kontext der AMR-Therapie zu analysieren.

4.1 Klinisches Ergebnis

Ein NTx-Überleben von nur 60 % (6/10) nach drei Jahren in der AMR-Gruppe trotz intensiver Immunsuppression ist nicht zufrieden stellend. Weiterhin konnte keine signifikante Verbesserung der Nierenfunktionswerte nach zwei Jahren festgestellt werden, wobei jedoch die beiden Kontrollgruppen erwartungsgemäß signifikant bessere GFR-Werte aufwiesen als die AMR-Gruppe ($p < 0,005$). Die schlechte Prognose einer AMR ist leider bekannt. So ist bereits bei 10-50 % der AMR-Patienten ein Transplantat-Versagen nach einem Jahr beschrieben [75][79][95]. Diese großen Schwankungen kommen zum einen durch die Unterschiede in der angewandten Immunsuppression zustande. Zum anderen sollte der diagnostizierten AMR-Form Beachtung geschenkt werden. Die späte Form der AMR geht mit einer schlechteren Prognose einher als die akute frühe Form [81][121][122], weil letztere besser auf eine Therapie anspricht

[79][89][91]. So stellten Walsh et al. [37][123] in einer multizentrischen Studie fest, dass eine Bortezomib-Therapie bezüglich der histologischen Werte, der DSA-Titer und der Nierenfunktion bessere Ergebnisse bei der frühen AMR erzielte im Vergleich zur späten AMR. Da neun von zehn unserer AMR-Patienten eine späte chronische AMR hatten, ist dieses Ergebnis nicht überraschend. Wie erwartet, weist der Patient mit einer frühen akuten AMR auch noch nach zwei Jahren vergleichsweise gute Nierenfunktionswerte auf. Unsere Patienten der beiden Kontrollgruppen mit und ohne DSA-Nachweis hatten ein hervorragendes NTx-Überleben von 100 % nach drei Jahren. Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass die schlechte Prognose der späten AMR u. a. auf eine eher späte Diagnose zurückzuführen ist. Dies liegt zum einen daran, dass sowohl DSA als auch C4d-Ablagerungen bereits Monate bis Jahre vor einer klinisch feststellbaren NTx-Verschlechterung entstehen [16]. Zum anderen kommen diese Patienten seltener zu ambulanten Kontrollterminen und weisen oftmals eine nur schleichende klinische NTx-Verschlechterung auf [37][42][81]. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die späte AMR vermehrt mit Incompliance und einer insuffizienten Immunsuppression einhergeht [37][42][81][91][119][124]. So wurde in unserer Studie bei zwei Patienten eine schlechte Compliance festgestellt. Junge Patienten werden eher als nicht-therapietreu eingestuft als ältere [81], was bei einer unserer Patienten mit einem Alter von 20 Jahren zum Zeitpunkt der AMR-Diagnose zutrifft. Noncompliance erhöht das Risiko eines terminalen NTx-Versagens [84] und sollte deshalb möglichst früh erkannt werden. Aufgrund der Schwierigkeit, eine Incompliance festzustellen, ist es umso wichtiger, regelmäßig die Medikamentenspiegel zu messen und insbesondere junge Patienten auf die große Bedeutung einer regelmäßigen Medikamenteneinnahme aufmerksam zu machen. Auf diese Weise könnten humorale Abstoßungsreaktionen verhindert oder zumindest verzögert werden. Gerade bei einer langanhaltenden stabilen NTx-Funktion ist es üblich, die Dosis verschiedener Immunsuppressiva Schritt für Schritt zu verringern. Dies reduziert das Risiko für Infektionen, maligne Erkrankungen sowie Nephrotoxizität, erhöht jedoch auch die Gefahr einer späten AMR.

Bei zwei von zehn Patienten wurde eine C4d-Negativität histologisch festgestellt. Diese beiden Patienten weisen gleichzeitig einen hohen cg-Wert von 3 auf und entwickelten im Laufe der Beobachtungszeit ein NTx-Versagen. Die C4d-Positivität ist ein Abbild der Komplementaktivierung und fakultativ in der AMR-Diagnostik. Bei der Diagnose einer AMR ohne C4d-Nachweis kann von einer komplementunabhängigen Ak-Aktivierung ausgegangen werden. Diese C4d-negative AMR weist in unserer Studie eine besondere Therapieresistenz auf.

Bei unseren vier AMR-Patienten mit NTx-Versagen fielen ein Patientenalter von über 40 Jahren zum Zeitpunkt der NTx, eine schwere mikrovaskuläre Entzündung, eine chronische Vakulopathie und eine chronische Transplantatglomerulopathie auf. Diese ausgeprägten histologischen Transplantatschäden unterscheiden sich nicht signifikant von denen der AMR-Patienten mit erhaltener NTx-Funktion nach drei Jahren. Jedoch verdeutlichen diese Ergebnisse, dass bereits ein großer Schaden am NTx entstanden ist und die AMR-Patienten dieser Studie eine besondere Risikogruppe hinsichtlich eines Transplantatverlustes darstellen. Unsere Ergebnisse decken sich mit der Annahme von Gupta et al., dass bei der späten AMR ein hohes Patientenalter und eine chronische Vakulopathie ($cv \geq 2$) mit einer schlechteren Prognose einhergehen [91]. Neun von zehn unserer AMR-Patienten hatten eine Transplantatglomerulopathie ($cg \geq 1$), welche wiederum neben einer schlechten Prognose auch mit erhöhten C4d-Ablagerungen und DSAs einhergeht [75][80]. Lefaucher et al. [77] verdeutlichten wiederum, dass erweiterte peritubuläre Kapillaren (ptc) und Monozyten-/Makrophageninfiltrate in den Glomeruli (g1-g3) mit einem schlechten Transplantatüberleben bei Patienten mit AMR einhergehen. Wir konnten jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den AMR-Patienten mit und ohne NTx-Überleben feststellen.

Die NW-Rate sowie die Notwendigkeit von kumulativ 20 stationären Aufenthalten innerhalb eines Jahres nach AMR-Therapie sind nicht zu unterschätzen. So wurden in der AMR-Gruppe signifikant mehr stationäre Aufenthalte, SAEs sowie GIT-Störungen im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen beobachtet (Tab. 14). Die Diagnose einer infektiösen viralen Meningitis wenige Tage nach Therapieabschluss zeigte eine sehr ernst zu nehmende Komplikation und spiegelt eine Über-Immunsuppression des betroffenen Patienten wider. Dennoch waren alle beobachteten NW innerhalb der AMR-Gruppe therapierbar und somit reversibel. Ein Vergleich der identischen AMR-Therapie mit und ohne Rituximab führte bereits zu der Erkenntnis, dass die zusätzliche Gabe von Rituximab die Immunsuppression des gesamten Organismus erhöht mit der Folge vermehrter Infektionen und notwendiger stationärer Aufenthalte [120]. Gleichzeitig konnte keine Verbesserung des NTx-Überlebens durch Rituximab festgestellt werden. Eine interessante Studie von Waiser et al. vergleicht AMR-Patienten, die zwei verschiedene Kombinationstherapien bestehend aus Rituximab bzw. Bortezomib erhielten. Dabei stellten sie ein besseres NTx-Überleben (60 % vs. 11 %) sowie bessere Nierenfunktionswerte in der Bortezomib-Gruppe fest [125]. Es erfolgte keine Unterscheidung der Patienten mit akuter und chronischer AMR. Diese Studie verdeutlicht jedoch den Nutzen vom Bortezomib in der AMR-Therapie. Weiterhin konnten ein besseres NTx-Überleben, bessere Nierenfunktionswerte und eine stärkere Reduktion

der DSA-Werte infolge einer AMR-Therapie mit PPH, Bortezomib und hochdosierter IVIg-Gabe im Vergleich zur AMR-Therapie mit PPH, Rituximab und niedrigdosierter IVIg-Gabe sowie auch mit PPH, Bortezomib und niedrigdosierter IVIg-Gabe festgestellt werden [126].

Die RITUX-ERAH-Studie ist eine große randomisierte kontrollierte Studie zur Untersuchung der AMR-Behandlung [127]. Alle 38 AMR-Patienten erhielten PPHs, IVIg und i.v. Kortikosteroide, während zusätzlich eine i.v. Injektion von entweder Rituximab (375mg/m²) oder eines Placebo-Präparates erfolgte. Nach einer Beobachtungszeit von einem Jahr wurde zwischen beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der DSAs, Nierenfunktionswerte und histologischen Veränderungen festgestellt. Die Rituximab-Gruppe wies jedoch eine stärkere Verringerung der DSA-Werte und der mikrovaskulären Inflammation auf im Vergleich zur Placebogruppe. Ein längerer Untersuchungszeitraum hätte daher wertvolle Hinweise geben können.

Die AMR-Gruppe in dieser Studie erhielt eine potente Kombinationstherapie, die keine langfristige klinische Funktionsverbesserung des NTx erzielen konnte. Stattdessen hatte diese vielschichtige NW zur Folge und stellte somit eine Gefährdung unserer Patienten dar. Vor dem Hintergrund der o. g. Studien ist daher eine individuelle Risikoanalyse vor Beginn einer AMR-Therapie empfehlenswert, sodass bei entsprechendem Risikoprofil auf Rituximab verzichtet werden könnte.

4.2 Einfluss der AMR-Therapie auf die B-Zellpopulationen und den B-Zell aktivierenden Faktor

Signifikante und langanhaltende Reduktion der zirkulierenden CD19⁺ B-Zellen nach kombinierter AMR-Therapie

Bislang stehen uns nur sehr wenige Studien zur Verfügung, welche die verschiedenen B-Zell-Subpopulationen bei gesunden, stabilen nierentransplantierten Patienten und Patienten mit humoraler Abstoßung vor und nach einer Therapie vergleichen.

In unseren Daten fiel auf, dass sowohl der prozentuale Anteil als auch die absolute Anzahl der CD19⁺ B-Zellen bei der AMR-Gruppe zum Zeitpunkt der Diagnosestellung signifikant höher war als bei der Kontrollgruppe ohne DSA-Nachweis. Dies könnte darauf hinweisen, dass eine

humorale Immunreaktion im Kontext der NTx mit einer vermehrten B-Zellaktivierung mit nachgeschalteter Produktion von B-Zellen unterschiedlicher Reifungsgrade einhergeht. Da die Werte bei der Kontrollgruppe mit DSA-Nachweis zwar geringer als die der AMR-Gruppe, jedoch höher als die der stabilen NTx-Gruppe ohne DSA-Nachweis ausfallen, kann bereits von einer Hochregulierung der B-Zell-Synthese und somit auch einer verstärkten Aktivität der humoralen Immunität ausgegangen werden. Bei gesunden nicht-transplantierten Probanden liegt mit 150-250 B-Zellen pro μl Blut eine deutlich geringere Anzahl an B-Zellen vor im Vergleich zu unseren AMR-Patienten vor Therapie ($327/\mu\text{l}$) [25][39][128].

Es konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass es nach AMR-Therapie zu einer raschen, signifikanten Reduktion der CD19⁺ B-Zellen kam, welche auch noch zwei Jahre nach BL andauerte. Diese Ergebnisse stimmen mit einer Studie von Genberg et al. überein, bei der Rituximab zur Anwendung kam [99]. Sidner et al. [38][129] haben Dialyse-Patienten ausschließlich Rituximab als Immunsuppressivum verabreicht und festgestellt, dass sogar eine einmalige Dosis von 50 mg/m^2 eine schnelle und signifikante periphere B-Zell-Reduktion bewirkt. Höhere Rituximab-Dosen ergaben keine signifikanten Unterschiede, was jedoch auf die geringe Patientenzahl von drei Teilnehmern je Gruppe oder eine geringe B-Zell-Belastung vor Therapie – im Vergleich zur AMR – zurückzuführen sein könnte. Der Nachweis, dass sowohl CD19⁺ als auch CD20⁺ Zellen nach Rituximabgabe zytometrisch stark reduziert werden [99], beweist, dass die CD20-Epitope nicht nur durch Rituximab blockiert, sondern die zirkulierenden B-Zellen signifikant eliminiert werden [38].

Patienten mit einer bestehenden chronischen AMR weisen im Vergleich zu Kontrollpatienten quantitativ signifikant mehr CD19⁺ B-Zellen auf. Dieses Ergebnis kann dazu beitragen, Patienten frühzeitig zu identifizieren, die im weiteren Verlauf ein hohes Risiko für eine AMR haben. Außerdem unterstützen die vorliegenden Ergebnisse, dass ein B-Zell-depletierendes Therapiekonzept für Patienten mit AMR eine wichtige Therapiesäule darstellt.

Signifikante Zunahme des B-Zell aktivierenden Faktors der TNF-Familie (BAFF) im peripheren Blut nach kombinierter AMR Therapie

Es fiel kein signifikanter Unterschied der sBAFF-Konzentrationen zwischen beiden Kontrollgruppen und den AMR-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung auf. Interessanterweise zeigen sich die sBAFF-Konzentrationen im weiteren Verlauf der Studie innerhalb der AMR-behandelten Patienten über 12 M signifikant ansteigend. Wie oben

beschrieben erfolgt durch Rituximab eine rasche und starke Depletion der CD19⁺ B-Zellen im peripheren Blut. Dies hat zur Folge, dass zum Ausgleich die Syntheserate zur Produktion neuer B-Zellen verstärkt abläuft. Damit verbunden erfolgt ein kompensatorischer Anstieg der sBAFF-Konzentrationen nach der Therapie, der wiederum mit einem allmählichen Anstieg der Konzentration an CD19⁺ Zellen im peripheren Blut korreliert. Da die BAFF-Konzentration 9 M nach Therapiebeginn am höchsten ausfällt und nach 12 M bereits ein geringfügiger Abfall zu beobachten ist, kann vermutet werden, dass diese zu einem späteren Zeitpunkt nicht weiter steigen. Vielmehr könnte es im späteren Verlauf zu einem weiteren Abfall der BAFF-Konzentrationen kommen, da insbesondere die Wirkung des Medikaments Rituximab abnimmt und es zu einer allmählichen Repopulation der B-Zellen kommt. Zu einem vergleichbaren Ergebnis kamen Zarkhin et al. [130] bei nierentransplantierten Kindern: So steigt die sBAFF-Konzentration nach Rituximab-Gabe in Korrelation mit der CD19⁺-B-Zell-Depletion im peripheren Blut signifikant an, wobei die höchsten Werte jedoch bereits 3 M nach Rituximab-Therapie beobachtet wurden. Nach Rückkehr der B-Zellen 12 M nach Therapiebeginn wiederum normalisierten sich auch die sBAFF-Werte. Somit stellten sie fest, dass BAFF zur Repopulation der zirkulierenden B-Zellen beiträgt und eine wichtige Rolle in der B-Zell-Homöostase spielt. Auch bei Patienten mit Thrombotisch-thrombozytopenischer Purpura (TTP) waren die sBAFF-Werte nach Rituximab-Therapie erhöht und verringerten sich daraufhin wieder infolge der B-Zell-Rückkehr [131].

Bei der Untersuchung der Biopsieschnitte von Nierentransplantaten nach Transplantatverlust infolge einer chronischen AMR haben Thauan et al. [100] eine sehr interessante Beobachtung gemacht. Rituximab konnte die zirkulierenden B-Zellen effektiv reduzieren, jedoch nicht die B-Zellen innerhalb der Transplantate. Gleichzeitig konnten erhöhte BAFF-mRNA und BAFF-Protein-Level in den Transplantaten gemessen werden, sodass es vermehrt Überlebenssignale für B-Zellen innerhalb des Nierentransplantates gibt. Dies könnte darauf hinweisen, dass zur Elimination der peripheren zirkulierenden B-Zellen eine einmalige Rituximabgabe wahrscheinlich ausreichend ist, jedoch die ortsständigen B-Zellen eventuell nur mit mehreren Rituximabzyklen verringert werden könnten. Da in dieser Studie keine ortsständigen B-Zellen im Nierentransplantat und in den sekundären Lymphorganen gemessen wurden, kann keine Aussage darüber getroffen werden, inwieweit diese durch die multimodale Therapie mit Rituximab und Bortezomib beeinflusst wurden. Die hohen Zytokinwerte für BAFF sprechen für einen starken Stimulus, junge B-Zellen nachzubilden und verbleibende B-Zellen verschiedener Reifungsgrade

in ihrem Überleben zu unterstützen, da dies bekanntermaßen BAFF-abhängig beschrieben wird [47][51][132].

Wie eingangs bereits erwähnt, kann ein hoher Anteil an löslichem und membrangebundenem BAFF im peripheren Blut sowie in den lymphatischen Organen das B-Zell-Überleben, die B-Zell-Reifung und die Differenzierung in Ak-produzierenden Plasmazellen begünstigen. Weiterhin konnte eine erhöhte Produktion von Ak [48][54] sowie von DSA [52][130] durch BAFF nachgewiesen werden. Demzufolge kann eine verstärkte Ak-vermittelte Immunreaktion auf das NTx stattfinden und schließlich zu einer verschlechterten Transplantatfunktion führen. In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass die multimodale AMR-Therapie mit Rituximab und Bortezomib die B-Zellen im peripheren Blut signifikant reduziert. Die erhöhte nachgewiesene Konzentration an sBAFF im peripheren Blut ist daher nicht überraschend. Jedoch muss auch eine entsprechend hohe Anzahl an Rezeptoren zur Verfügung stehen, an die die BAFF-Moleküle andocken können. Interessant wäre in diesem Kontext, neben der Konzentration an sBAFF auch die Konzentration an BAFF-R, BCMA und TACI zu ermitteln. So wurde bereits nachgewiesen, dass hohe Konzentrationen an membrangebundenem BAFF [48] sowie an BAFF-R [52] Risikofaktoren für Nierendysfunktionen nach NTX darstellen. Der rechtzeitige Eingriff in die immunologischen Funktionen eines Patienten mit nachgewiesener AMR und zugleich hohen BAFF-Konzentrationen könnte dabei einer Verschlechterung der Transplantatfunktion entgegenwirken. Da hohe BAFF-Konzentrationen u. a. zur verstärkten Differenzierung von Gedächtnis-B-Zellen zu Ak-produzierenden Zellen beitragen können [54], könnte der Einsatz des humanen monoklonalen Antikörpers Belimumab (Benlysta®) infolge einer Rituximab-Therapie erwogen werden. Belimumab bindet an sBAFF und ist für die Behandlung des SLE zugelassen. Bei Patienten mit SLE konnte hierunter die Anzahl von naiven B-Zellen sowie von Plasmazellen signifikant reduziert und die Auto-Ak-Produktion verringert werden [133]. Neben Belimumab als Ak gegen BAFF sei an dieser Stelle Atacicept erwähnt. Letzterer ist ein löslicher Ak gegen TACI, welcher BAFF und APRIL neutralisieren und somit Plasmazellen und die Ak-Level reduzieren kann [132].

Aus den vorliegenden Daten kann zusammengefasst werden, dass eine erhöhte sBAFF-Konzentration nach AMR-Therapie einen starken Stimulus für die Produktion von B-Zellen nach CD20-depletierender Therapie darstellen könnte. Die Korrelation der B-Zell-Depletion zu dem Anstieg der sBAFF-Konzentrationen kurz nach AMR-Therapie könnte ein Parameter sein, der die Therapieeffektivität widerspiegelt. Da die erhöhte BAFF-Konzentration nach Therapie ein

positives Überlebenssignal auf die verschiedenen B-Zellpopulationen ausübt, könnte als Rationale hierfür eine Anti-BAFF-Therapie besonders effektiv in der langanhaltenden Suppression der zirkulierenden sowie auch der ortständigen B-Zell-Populationen bis hin zu Plasmazellen bei AMR-Patienten sein.

CD19⁺CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen repopulieren schneller als CD19⁺CD27⁻IgD⁺CD38⁻ naive B-Zellen nach Rituximab- und Bortezomib-Therapie

Zum Studienbeginn konnte quantitativ ein höherer Anteil an naiven CD20⁺CD27⁻IgD⁺CD38⁻ B-Zellen im Gegensatz zu CD19⁺CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen in allen Gruppen nachgewiesen werden. Mit ca. 60-70 % aller B-Zellen des peripheren Blutes ist der Anteil der naiven B-Zellen (IgD⁺IgM⁺CD27⁻) bei gesunden nicht transplantierten Probanden ähnlich hoch wie in unserer AMR-Gruppe vor Therapie. Der Anteil der Gedächtnis-B-Zellen liegt jedoch bei Gesunden höher [25][39][43].

Bei der Auswertung des Verhältnisses zwischen naiven B-Zellen und Gedächtnis-B-Zellen zeigt sich bereits ein Monat bis hin zu einem Jahr nach AMR-Therapie eine signifikante Abnahme. Zurückzuführen ist dies auf die starke und über zwei Jahre anhaltende Reduktion vor allem der naiven B-Zell-Population nach AMR-Therapie. Die Gedächtnis-B-Zellen sind ebenfalls über zwei Jahre nach AMR-Therapie signifikant reduziert, jedoch ist deren relativer Anteil an den CD19⁺ B-Zellen nur über 3 M im Vergleich zum BL-Wert reduziert. Nach einem Jahr erreicht dieser fast vollständig den Ausgangswert vor Therapie. Somit ist auch das Verhältnis zwischen naiven B-Zellen und Gedächtnis-B-Zellen 24 M nach Therapie nicht mehr signifikant reduziert, was auf eine zunehmende Repopulation der Gedächtnis-B-Zellen zurückzuführen ist. Sidner et al. [38] zeigten nach alleiniger Rituximabtherapie bei Dialysepatienten ebenfalls eine signifikante Reduktion der Gedächtniszellen über 24 M nach Therapie. Die wiederkehrenden B-Zellen nach Therapie waren jedoch phänotypisch vorwiegend CD19⁺CD5⁺ und exprimierten kein CD27. So entspricht die Häufigkeit der dort beschriebenen naiven (CD19⁺CD5⁺) und Gedächtnis-B-Zellen (CD19⁺CD27⁺) im peripheren Blut ein Jahr nach Rituximab-Therapie in etwa der eines 10-jährigen Kindes, sodass die B-Zell-Repopulation wahrscheinlich die fetale Ontogenese widerspiegeln könnte [38]. Ähnliche Ergebnisse wurden in einer Studie erzielt, in der Patienten mit TTP eine Rituximab-Therapie erhielten. Nach vollständiger B-Zell-Depletion bildeten sich über viele Jahre vorwiegend naive B-Zellen im peripheren Blut, wohingegen die

Frequenz der unswitched und switched Gedächtnis-B-Zellen unterhalb des vorherigen Niveaus blieb [131].

Während Rituximab in den oben genannten Studien langanhaltende inhibitorische Effekte vor allem auf die Repopulation der Gedächtnis-B-Zellen zu haben scheint, kann bereits ein Jahr nach unserer AMR-Kombinationstherapie eine zunehmende Rückkehr von zirkulierenden Gedächtnis-B-Zellen beobachtet werden. Es ist jedoch anzumerken, dass sich der weitaus größere Anteil an Gedächtnis-B-Zellen in sekundären lymphatischen Geweben und im Knochenmark aufhält [25][29][38]. Weiterhin ist aufgefallen, dass die absolute Anzahl der zirkulierenden Gedächtnis-B-Zellen bei der AMR-Gruppe vor Therapie signifikant höher als bei der Kontrollgruppe ohne DSA-Nachweis ist und somit bereits eine erhöhte Belastung durch diese Population vorliegt. Basierend auf unseren vorliegenden Daten scheint eine einmalige Gabe von Rituximab keine nachhaltige Depletion der Gedächtniszellen im peripheren Blutbild in Patienten mit AMR erzielen zu können. Hierfür können die gewebsständigen Gedächtnis-B-Zellen verantwortlich gemacht werden, die sich einer Therapie entziehen und im Rahmen einer Immunreaktivierung in das periphere Blut auswandern, wo sie möglicherweise in Plasmablasten und antikörperproduzierende Plasmazellen übergehen. Hierbei könnte wiederum eine schnelle Hochregulierung von B-Zell-aktivierenden Zytokinen wie z. B. BAFF von entscheidender Bedeutung sein [54].

IgD⁺ non class-switched CD19⁺CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen werden deutlich effektiver durch die AMR-Therapie beeinflusst als IgD⁻ class-switched Gedächtnis-B-Zellen

Nach Unterscheidung der Gedächtnis-B-Zellen bezüglich ihrer IgD-Expression, konnte in dieser Studie eine interessante Beobachtung gemacht werden. Bereits ein Jahr nach AMR-Therapie ist eine deutliche Repopulation der IgD⁻ class-switched Gedächtniszellen zu erkennen, während der relative Anteil der IgD⁺ non class-switched Gedächtniszellen noch zwei Jahre nach Therapie signifikant reduziert bleiben. Weiterhin gibt es zwischen sechs und 18 Monaten nach AMR-Therapie signifikant mehr IgD⁻ als IgD⁺ Gedächtniszellen. Dies deutet insgesamt darauf hin, dass die reiferen IgD⁻ Gedächtnis-B-Zellen nach Immunglobulin-Klassenwechsel nicht vollständig von der multimodalen AMR-Therapie erfasst und im weiteren Verlauf nachgebildet werden können. Weiterhin ist aufgefallen, dass die Kontrollgruppe ohne DSA eine signifikant niedrigere Anzahl an IgD⁺ Gedächtnis-B-Zellen aufweist als die AMR-Patienten vor Therapie.

Die Funktionen der Gedächtnis-B-Zellen beinhalten sowohl die Antikörperproduktion als auch Ak-unabhängige Aufgaben wie die Zytokin- und Chemokinsynthese sowie Antigenpräsentation [45]. Es ist jedoch noch ungeklärt, inwiefern sich die Gedächtniszellen ohne Klassenwechsel von denen mit Klassenwechsel in ihrer Funktion unterscheiden. In vitro konnte bereits festgestellt werden, dass beide Populationen in der Lage sind Antikörper zu bilden [43]. IgD⁻ Gedächtniszellen können nach ihrem Klassenwechsel Immunglobuline unterschiedlicher Isotypen (IgM, -G und -A [45]) produzieren und somit spezifischer auf die als fremd erkannten Antigene reagieren. Möglicherweise könnten die zirkulierenden class-switched Gedächtnis-B-Zellen verstärkt zum NTx wandern und dort einen größeren Schaden anrichten als Gedächtnis-B-Zellen ohne Klassenwechsel. Diese Vermutung kann in Anbetracht unserer nicht zufrieden stellenden klinischen Ergebnisse sowie aufgrund der folgenden Studie aufgestellt werden. Zarkhin et. al. [134] haben nierentransplantierte Kinder nach einer akuten Rejektion mit Rituximab behandelt. Dabei stellten sie fest, dass Patienten, bei denen im weiteren Verlauf eine signifikante Reduktion der class-switched (IgD⁻) Gedächtnis-B-Zellen sowie ein Anstieg der naiven B-Zellen festgestellt wurden, tendenziell längere Transplantat-Überlebensraten haben. Möglicherweise stellt insbesondere die relativ schnelle Repopulierung der Gedächtniszellen mit Klassenwechsel nach Rituximab-Therapie eine besondere Gefährdung für das NTx dar.

Doch warum erholen sich in unserer Studie die Gedächtnis-B-Zellen mit Klassenwechsel schneller von der multimodalen AMR-Therapie als jene ohne Klassenwechsel? Vermutlich erfolgt die Reaktivierung und Vermehrung dieser reiferen B-Zell-Population besonders schnell, weil sich im Rahmen der AMR bereits ein entsprechend großer Pool an reifen Gedächtnis-B-Zellen in den sekundären Lymphorganen entwickelt hat.

CD27-IgD⁻ Doppelt negative B-Zellen (DN-Zellen) repopulieren innerhalb von zwei Jahren nach AMR-Therapie auf ihr Ausgangsniveau

Die Rolle der DN-Zellen sowie deren Ursprung und Beziehung zu den CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen ist bisher nur unzureichend geklärt. Während Gedächtnis-B-Zellen innerhalb der Keimzentren und mithilfe von T-Zell-B-Zell-Interaktionen eine hohe Rate an somatischen Hypermutationen durchlaufen, treten diese Mutationen mit einer eher geringen Frequenz in den DN-Zellen auf [45][46][135]. Aus diesem Grund könnten die DN-Zellen ohne die Hilfe von T-Zellen oder CD40-CD40L-Interaktionen entstehen [135]. So ist es möglich, dass sie aus einer extrafollikulären Immunantwort hervorgehen oder aber das Produkt einer unvollständigen

Keimzentrumsreaktion sind [45][136]. Weiterhin wurde bereits festgestellt, dass die DN-Zellen IgG, IgA oder IgM exprimieren [135]. Aufgrund der Fähigkeit des Isotypenwechsels und der Antigen-Affinitätssteigerung erscheint eine Einordnung dieser Zellen in die Gruppe der Gedächtnis-B-Zellen als sinnvoll. Zudem ist der Oberflächen-Phänotyp der DN-Zellen dem der Gedächtniszellen sehr ähnlich [136]. Bei gesunden Patienten stellen die DN-Zellen ca. $\leq 5\%$ aller B-Zellen des peripheren Blutes dar [46], während diese bei SLE-Patienten deutlich höher liegen [45][136] und somit vermutlich infolge einer anhaltenden Stimulation des Immunsystems vermehrt auftreten [135]. Mit einer Frequenz von 9 % aller B-Zellen ist der Anteil der DN-Zellen in unserer AMR-Gruppe vor Therapie relativ hoch. Weiterhin konnte genauso wie bei den Gedächtniszellen eine signifikant höhere Anzahl an DN-B-Zellen bei der AMR-Gruppe vor Therapie im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne DSA-Nachweis festgestellt werden, sodass auch hier eine erhöhte Vorbelastung innerhalb der AMR-Gruppe vorliegt. Wird der relative Anteil betrachtet, konnte ähnlich den class-switched Gedächtnis-B-Zellen nach AMR-Therapieregime zunächst eine signifikante Reduktion der DN-Population und daraufhin trotz B-Zell-depletierender Therapie bereits nach einem Jahr eine schnelle Repopulierung beobachtet werden. Fecteau et al. haben in ihrer Arbeit DN-B-Zellen im menschlichen peripheren Blut untersucht und stellten die Vermutung auf, dass es sich dabei um kurzlebige Gedächtnis-B-Zellen handeln könnte [46]. Welche immunologische Funktion diese Population ausübt und ob sie in der Lage ist, sich zu Plasmazellen zu differenzieren und zur Ak-Bildung beizutragen, ist jedoch noch weitgehend ungeklärt [45]. Es bleibt die Frage offen, ob diese Zellpopulation insbesondere auf Antigene des fremden Nierentransplantats reagiert. Möglicherweise könnten die DN-Zellen aufgrund des erfolgten Klassenwechsels und der zumindest schwach ausgeprägten somatischen Hypermutation eine erste schnelle und gleichzeitig relativ spezifische Reaktion im Rahmen der humoralen Immunantwort hervorrufen. Somit könnte der Frequenzanstieg von DN-Zellen nach Therapie im peripheren Blutbild aufgrund ihrer niedrigen Aktivierungsschwelle gegenüber Antigenen mit der Folge einer schnelleren Proliferation begründet liegen. Im Vergleich dazu benötigen die in den Keimzentren entstehenden Gedächtnis-B-Zellen zunächst eine adäquate T-Zell-Hilfe [137]. Trotz vieler Unklarheiten kann die relativ schnelle Repopulation der DN-Zellen als kritisch erachtet werden. So wurde in Untersuchungen von Patienten mit SLE festgestellt, dass das vermehrte Auftreten der DN-Zellen signifikant mit krankheitsspezifischen Autoantikörpern sowie Nephritis korreliert [136]. Zarkhin et. al. [134] konnten wiederum Hinweise darauf geben, dass ein hoher Anteil an DN-Zellen nach Rituximab-Therapie mit einer schlechteren Transplantatfunktion bei Patienten mit akuter NTx-Rejektion einhergeht.

Weiterhin ist anzumerken, dass eine exaktere Bestimmung der DN-Zellen durch eine IgG- bzw. IgA-Positivität sowie durch die Färbung von Rhodamine 123 oder Farbstoffe zur Detektion von Mitochondrien möglich ist [45]. Möglicherweise ist unsere Phänotypisierung der DN-Zellen zu ungenau, sodass auch andere B-Zell-Arten unerwünschterweise erfasst wurden.

In unserer Kohorte zeigt sich nach AMR-Therapie ein unbefriedigendes Transplantatüberleben von 60 % nach drei Jahren. Vor dem Hintergrund der möglichen negativen Auswirkungen der DN-Zellen sowie der class-switched Gedächtnis-B-Zellen könnte eine Wiederholung der Rituximab-Therapie von wichtiger Bedeutung für das Langzeitüberleben des Transplantats sein. Dadurch könnten diese beiden Subpopulationen, die sich zuvor in sekundären Lymphorganen und dem NTx aufhielten, effektiver depletiert werden. So erfolgt auch bei autoimmunen Erkrankungen wie der Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) eine mehrfache Rituximabinfusion in der Induktionstherapie und zusätzlich wird dieses in der Erhaltungstherapie alle 6 M erneut verabreicht [138].

CD19⁺CD20⁻CD27⁺CD38⁺ Plasmazellen im peripheren Blut werden nur kurzfristig durch die AMR-Therapie reduziert

Die Plasmazellen nehmen eine entscheidende Rolle in der Ak-vermittelten Abstoßung ein, da sie die für das Transplantat schädlichen DSA produzieren. Mit weniger als einer Plasmazelle pro μl Blut handelt es sich bei allen drei Gruppen um sehr niedrige Werte. So konnten im peripheren Blut gesunder Erwachsener 1 bis 5 Plasmazellen/ μl ermittelt werden [25][39], während Patienten mit aktiver SLE sogar durchschnittlich 6,6 Plasmazellen je μl Blut aufweisen [128]. Auch der prozentuale Anteil der Plasmazellen von den zirkulierenden B-Zellen ist in dieser Studie bei den AMR-Patienten zum BL-Zeitpunkt mit 0,09 % deutlich geringer als bei gesunden Erwachsenen (1-3 %) [25][39]. Die stabile Kontrollgruppe ohne DSA-Nachweis weist interessanterweise einen signifikant höheren relativen Anteil an Plasmazellen auf als die AMR-Gruppe vor Therapie. Es handelt sich jedoch noch immer um sehr niedrige Werte (0,43 % vs. 0,09 %).

Eine signifikante Reduktion der Plasmazellen war 1 und 3 M nach AMR-Therapie erkennbar. Diese Reduktion der Plasmazellen kann zum einen auf deren direkte Zerstörung zurückzuführen sein. Zum anderen ist jedoch auch bekannt, dass Plasmazellen aus Gedächtnis-B-Zellen oder naiven B-Zellen entstehen. So kann vermutet werden, dass die verringerte Anzahl der Plasmazellen in unserer Studie u. a. oder aber v. a. durch die Zerstörung von deren Vorläuferzellen verursacht wurde. Die Therapiemaßnahmen IVIg, PPH, Steroide und Rituximab

können reife Plasmazellen nicht reduzieren [40][42][97][92]. Daher kann eine direkte Zerstörung der Plasmazellen nur durch Bortezomib erwartet werden. Die Wirkung ist eine Stunde nach Bortezomibgabe am stärksten und hält drei bis vier Tage an [41]. Danach kommt es zu einer raschen Repopulation der Plasmazellen [41][139]. Eine Messung der peripheren Plasmazellen kurz nach der Therapie – z. B. 5, 10 und 15 Tage nach letzter Bortezomibgabe – hätte daher in der vorliegenden Studie weitere interessante Ergebnisse liefern können. Da jedoch eine potente Kombinationstherapie angewandt wurde, sind wir von einem stärkeren Langzeiteffekt bezüglich der Plasmazell-Reduktion ausgegangen, welcher sich jedoch nicht bestätigt hat. Für die verhältnismäßig schnelle Repopulation der zirkulierenden Plasmazellen spricht auch deren über 24 M nach AMR-Therapie signifikant erhöhte relative Anteil an den CD 19⁺ B-Zellen. Doch handelt es sich bei den CD19⁺CD20⁻CD27⁺CD38⁺ B-Zellen eher um Plasmablasten oder um Plasmazellen? Es wird angenommen, dass im peripheren Blut eher neu entstandene Plasmablasten detektiert werden können [25]. Diese Plasmablasten haben spezifische Rezeptoren für die Chemokine CXCL9 und CXCL12, um vom sekundären Lymphgewebe zu den Überlebensnischen im Knochenmark, der Milz, im MALT oder in chronisch entzündetes Gewebe zu wandern [24][34][35]. Dabei stehen die Plasmablasten in Konkurrenz mit den langlebigen Plasmazellen, die sich bereits in den Überlebensnischen aufhalten [25]. Die meisten zirkulierenden Plasmablasten sterben bereits innerhalb einer kurzen Zeit, da sie die langlebigen Plasmazellen nicht aus ihren Nischen verdrängen können [25]. Wenn dies jedoch gelingt, reifen die PB zu langlebigen Plasmazellen heran und die verdrängten Plasmazellen zirkulieren im peripheren Blut, um eine neue Überlebensnische zu finden [39] oder gehen in die Apoptose über [26][31]. So können reife Plasmazellen vermutlich nur dann im peripheren Blut nachweisbar sein, wenn sie das Knochenmark, sekundäre Lymphorgane oder die Mukosa aufgrund einer Aktivierung des Immunsystems verlassen haben [25]. Um die Plasmablasten von den Plasmazellen zu unterscheiden, wurden diese bezüglich ihrer HLA-DR-Expression untersucht. Hierbei ist aufgefallen, dass mit 60-80 % die meisten zirkulierenden Plasmablasten bzw. Plasmazellen HLA-DR⁺ sind. Es wurde bereits berichtet, dass neu entstandene Plasmablasten eine hohe HLA-DR-Expression haben, während die reifen Plasmazellen des Knochenmarks nur geringfügig HLA-DR exprimieren [34][35]. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei unserer HLA-DR⁺ Population vorwiegend um neu entstandene noch teilungsfähige Plasmablasten handeln könnte. Daher werden im Folgenden die HLA-DR⁺ Zellen als Plasmablasten (PB) und die HLA-DR⁻ Zellen als Plasmazellen (PZ) bezeichnet. So weist die AMR-Gruppe zum BL-Zeitpunkt signifikant mehr HLA-DR⁺ PB als HLA-DR⁻ PZ auf. Eine signifikante Reduktion der

PB konnte nur einen Monat nach Therapiebeginn nachgewiesen werden. Die PZ hingegen sind 1, 3 und 12 M nach BL signifikant reduziert, wobei zusätzlich signifikante Unterschiede zwischen den PB und PZ 3 und 12 M nach AMR-Therapie vorliegen. So müsste unsere AMR-Therapie eine stärkere Wirkung auf die zirkulierenden PZ haben als auf die unreiferen PB. Hierbei muss jedoch einschränkend erwähnt werden, dass die peripheren Plasmablasten und Plasmazellen nicht eindeutig allein mithilfe ihrer HLA-Expression unterschieden werden können, da bereits festgestellt wurde, dass ca. 60 % der CD138⁺ langlebigen Plasmazellen im Knochenmark HLA-Kl. II exprimieren [39]. So könnte auch ein Teil der HLA-DR⁺ Population zu den langlebigen Plasmazellen gehören, die sich zuvor in Überlebensnischen aufgehalten haben und in die Blutbahn verdrängt wurden.

In dieser Studie wurden ausschließlich die HLA_DR⁺ und HLA_DR⁻ Plasmazellen des peripheren Blutes untersucht, welche jedoch nur einen kleinen Anteil der Plasmazellen des menschlichen Körpers widerspiegeln. Weiterhin ist es möglich, dass viele dieser zirkulierenden Plasmazellen aufgrund fehlender Überlebenssignale keine Überlebensnischen finden und zeitnah in die Apoptose eintreten. Eine weitaus größere Rolle spielen die langlebigen Plasmazellen, die sich vorwiegend im Knochenmark aufhalten [10][26][31]. Die anti-HLA-Ak werden am ehesten von langlebigen ausdifferenzierten Plasmazellen im Knochenmark und der Milz produziert [140]. Die Untersuchung langlebiger Plasmazellen mittels Knochenmarkaspiration und nachfolgender immunhistologische CD138-Färbung könnte daher aufschlussreiche Ergebnisse liefern. So konnte sowohl in Tierversuchen [110][113] als auch bei hochsensibilisierten [141] sowie AMR-Patienten [98] nach Bortezomib-Therapie eine deutliche Abnahme der CD138⁺ Plasmazellen des Knochenmarks festgestellt werden.

In der vorliegenden Studie stellte sich die CD138-Färbung zur Bestimmung der reifen Plasmazellen des peripheren Blutes als ungeeignet heraus. Möglicherweise können die CD138⁺ zirkulierenden Plasmazellen besser mittels eines anderen Studiendesigns abgegrenzt werden, wie eine Studie von Caraux et al. belegt [39].

4.3 Kurzfristige Reduktion der Spender-spezifischen Antikörper

Ein wichtiges Ziel der antihumoralen Therapie ist die langanhaltende Verringerung bzw. Elimination der DSA. Dieses Ziel konnte in der vorliegenden Studie jedoch nicht erreicht werden. Fünf von acht Patienten sind ein Jahr nach AMR-Therapie als DSA-Responder einzustufen. Weiterhin konnte eine signifikante Verringerung der DSAsum-Werte 3 M nach Therapiebeginn erreicht werden, die jedoch nicht über ein Jahr anhielt. Insgesamt ist der erzielte DSA-Rückgang nicht zufrieden stellend. Nur bei einem AMR-Patienten konnte ein Jahr nach Therapie eine Entfernung seiner DSA unterhalb der Cutoff-Grenze von 500 MFI erreicht werden. Die späte AMR geht mit einem vermehrten Auftreten von de novo DSA einher [81][91][119][142]. Die Erkenntnis, dass die späte AMR zumeist mit DSA gegen HLA-Kl.-II-Antigene vergesellschaftet ist [37][80][86][91], können wir bestätigen, da alle DSA-positiven AMR-Patienten eine späte Form der AMR mit de novo DSA der Kl. II hatten. Dies könnte auch die Ursache für die schlechten Ergebnisse trotz Bortezomib-Therapie in unserer Studie sein. Ak gegen die HLA-Klasse II sprechen schlechter auf eine AMR-Therapie mit Bortezomib an als Ak gegen die HLA-Klasse I [37][91][123]. Auch bei der Betrachtung der DSAm_{ax}-Werte ist aufgefallen, dass diese ausschließlich der HLA-Klasse-II angehören. Weiterhin konnte in dieser Studie nachgewiesen werden, dass generell eine hohe Anzahl an HLA-MM sowie auch ein Spenderalter von über 40 Jahren vor NTx das Risiko für die Entstehung von DSA und somit auch einer AMR nach NTx erhöht. Die vier AMR-Patienten mit terminalem NTx-Versagen hatten ein HLA-MM von ≥ 5 und mindestens je zwei verschiedene DSA entwickelt. Bei Betrachtung der DSA-Werte der AMR-Patienten mit und ohne NTx-Versagen fallen jedoch keine signifikanten Unterschiede auf.

Zwei AMR-Patienten wurden trotz der fraglichen DSA-Positivität aufgrund der klaren AMR-assoziierten Histologie mit C4d-Positivität als solche eingestuft. Eine Absorption der zirkulierenden Ak durch das NTx könnte erklären, warum C4d-Ablagerungen nachgewiesen, jedoch nicht ausreichend DSA im peripheren Blut detektiert werden konnten [80][82]. Deshalb empfehlen wir insbesondere bei grenzwertigen MFI-Konzentrationen eine humorale Rejektion nicht auszuschließen, sondern vielmehr engmaschige Kontrollen durchzuführen.

In mehreren Fallberichten konnte bei zeitgleicher Therapie mit Bortezomib, Rituximab, PPH's, IVIg und/oder hochdosierten Kortikosteroiden eine Reduktion der DSA-Level nachgewiesen werden [92][98][143]. Bei näherer Betrachtung dieser Berichte ist jedoch aufgefallen, dass die

behandelten Patienten zumeist eine akute frühe Form der AMR hatten und die Fallzahl nur sehr gering war. Beim Vergleich der DSA-Werte nach AMR-Therapie mit und ohne Rituximab führte die zusätzliche Gabe von Rituximab zu keinen besseren Ergebnissen [120]. Es ist jedoch möglich, dass eine mehrfache Bortezomibgabe über die Reduktion von Plasmazellen eine bessere Wirkung auf die DSA-Reduktion entfalten könnte. Anlass zu dieser Theorie gibt eine Studie von Everly et al. [92], in der sechs NTx-Patienten mit einer gemischten AMR und ACR untersucht wurden. Nachdem bei diesen Patienten vorangegangene Therapiemaßnahmen einschließlich PPHs, Rituximab, ATG und IVIg keine Besserung erzielen konnten, wurden sie mit einer viermaligen Bortezomib-Injektion therapiert. Dies resultierte bei allen Patienten in einer sofortigen Aufhebung der Abstoßungsreaktion, einer signifikanten und langanhaltenden Reduktion der DSA-Werte sowie einer Verbesserung des histologischen Bildes und der klinischen NTx-Funktion.

Die AMR-Patienten weisen vor Therapiebeginn eine hohe DSA-Belastung auf, welche nicht langfristig durch die multimodale AMR-Therapie verringert werden konnte und mitverantwortlich für die geringe NTx-Überlebensrate von 60 % sein könnte. Die zirkulierenden peripheren HLA-DR⁻ PZ sind zwar über ein Jahr nach BL signifikant reduziert, jedoch scheinen bezüglich der DSA-Produktion auch die HLA-DR⁺ PB sowie die ortsständigen Plasmazellen eine wesentliche Rolle zu spielen. Hinsichtlich der Bedeutung Spender-spezifischer Antikörper bei der Entstehung der AMR sollten alle ambulanten Patienten ein- bis zweimal jährlich auf die Entstehung von DSA getestet werden. Es ist bekannt, dass die DSA bereits viele Monate vor einer histologisch nachweisbaren und klinischen Verschlechterung der NTx-Funktion detektiert werden können [16][144]. Wenn frühzeitig neu aufgetretene DSA festgestellt und im Verlauf beobachtet werden, so kann mittels Charakterisierung der betroffenen Patienten ein besseres Verständnis über die Zusammenhänge der AMR aufgebaut werden. Da die AMR-Gruppe dieser Studie – im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen – demografisch insbesondere durch die hohe Anzahl an HLA-MM aufgefallen ist, sollte diese bei der Auswahl zwischen Empfänger und Spender eines Nierentransplantats möglichst gering ausfallen. Es sollte vorbeugend v. a. auf eine möglichst hohe Übereinstimmung bezüglich der HLA-Kl. II geachtet werden. So könnte man das Risiko für eine zukünftige AMR verringern.

4.4 Keine Änderung der protektiven Antikörper gegen Mumps, Masern und Röteln

Neben den zirkulierenden Plasmazellen und den DSA stellen die protektiven IgG-Ak gegen MMR unseren dritten Biomarker zur Beurteilung der Effektivität unserer AMR-Therapie dar. Die Halbwertszeit von IgG-Antikörpern beträgt nur einige Wochen, sodass nach einer Impfung kontinuierlich die Antigen-spezifischen Antikörper von langlebigen Plasmazellen produziert werden müssen [25][35]. Da sich diese durch unsere AMR-Therapie nicht verringert haben, kann vermutet werden, dass die langlebigen ortsständigen Plasmazellen in den Überlebensnischen, welche nachweislich für die kontinuierliche Synthese der o. g. protektiven Ak zuständig sind [24][32], nicht ausreichend auf die AMR-Therapie ansprechen. Dies könnte wiederum erklären, weshalb keine Elimination der DSA durch unsere AMR-Therapie, sondern lediglich eine kurzfristige DSAsum-Reduktion erreicht werden konnte. Vermutlich erfolgt die DSA-Synthese bei der späten AMR überwiegend durch diese reifen langlebigen Plasmazellen, wohingegen die DSA bei der frühen AMR vor allem von kurzlebigen Plasmablasten produziert werden, welche sensibler auf die Bortezomib-Therapie reagieren [95]. So scheint die späte Form schlechter auf Bortezomib anzusprechen als die frühe AMR, weil erstere vermehrt langlebige Plasmazellen aufweist und damit verbunden für höhere DSA-Level sorgt [37][91][145]. In einer Studie von Everly et. al. wurden stabile NTx-Patienten mit einer Lebendspende untersucht, die eine Kombinationstherapie aus Bortezomib und PPH's erhielten und deren protektive Ak-Werte gegen Masern und Tetanus trotz DSA-Reduktion ebenfalls unverändert blieben [146].

Da AMR-Patienten ein chronisch entzündetes NTx in sich tragen, kann vermutet werden, dass sowohl eine gesteigerte Synthese der Ak-produzierenden Plasmazellen erfolgt als auch ein gesteigertes Angebot an Überlebensnischen herrscht. So wurde bereits in anderen Studien darauf hingewiesen, dass in chronisch entzündetem Gewebe neue zelluläre Nischen entstehen könnten, die Plasmazellen anlocken [22][26]. Aufgrund der oben formulierten Annahme, dass die späte AMR oft erst spät diagnostiziert wird, können außerdem viele Monate vergehen, in denen eine große Anzahl neuer spezifischer langlebiger Plasmazellen entstanden sind und alte Plasmazellen von ihren Überlebensnischen verdrängen konnten, bis es zur Einleitung einer Antirejektionstherapie kommt [37]. Demzufolge können auch vermehrt DSA produziert werden, sodass eine besonders potente Medikation erforderlich ist [37]. Die Entfernung zirkulierender Ak durch PPH hat eine gesteigerte Ak-Produktion durch Plasmazellen sowie eine erhöhte

metabolische Aktivität der Gedächtnis-B-Zellen zur Folge, woraus wiederum eine erhöhte Sensitivität für Proteasom-Inhibition durch Bortezomib resultiert [143][146]. Dieser Effekt kann jedoch nur kurzfristig vorhanden sein. Wir schlussfolgern, dass unsere angewandte AMR-Therapie für die späte AMR keine ausreichende Wirksamkeit zur langfristigen Reduktion der DSA-Werte und der Plasmazellen besitzt. Möglicherweise kann der Einsatz von mehreren Bortezomib-Zyklen zu besseren Ergebnissen führen. So wurde bei Patienten mit SLE eine Reduktion der protektiven Impftiter beobachtet, nachdem diese mit mehreren Bortezomib-Zyklen behandelt wurden [139]. Everly et al. [92] haben darauf hingewiesen, dass aufgrund der guten Verträglichkeit von Bortezomib mehr als nur ein Bortezomib-Zyklus im Rahmen der AMR-Therapie verabreicht werden kann, um bessere Therapieergebnisse zu erzielen. So konnte bereits eine Bortezomib-Gabe von bis zu vier Zyklen in einigen Studien erfolgreich durchgeführt werden [37][139]. Weiterhin wurde über die erfolgreiche Anwendung einer hochdosierten Bortezomibgabe von 1,5 mg/m² bei einer refraktären AMR berichtet, bei der eine Therapie mit der üblichen Bortezomib-Dosis zuvor keinen Erfolg zeigte [92]. Wenn jedoch höhere Konzentrationen bzw. mehr Zyklen des Proteasom-Inhibitors Bortezomib verabreicht werden, muss immer auch die individuelle Toleranz-Schwelle beachtet werden.

Die BORTEJECT-Studie ist eine randomisierte Placebo-kontrollierte Doppelblindstudie, welche die Auswirkungen einer Bortezomib-Therapie auf Patienten mit später AMR untersuchte [97][147]. Hierbei wurden entweder zwei Bortezomib-Zyklen (n=21) oder ein Placebo-Präparat (n=23) verabreicht. Nach zwei Jahren gab es jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bezüglich der GFR- und Proteinurie-Werte, des NTx-Überlebens, der DSA-Werte und der Biopsie-Ergebnisse. Es wurde weiterhin eine erhöhte gastrointestinale und hämatologische Toxizität infolge der Bortezomib-Therapie beobachtet. Die Autoren vermuten daher, dass Patienten mit später AMR nicht von einer Bortezomib-Therapie profitieren. Hierbei ist anzumerken, dass die AMR-Patienten nicht zusätzlich mit z. B. Rituximab, PPH oder IVIg behandelt wurden, welche die Wirkung von Bortezomib eventuell hätten verbessern können. Dafür konnte jedoch der alleinige klinische Effekt von Bortezomib in diesem Zusammenhang beschrieben werden [148].

An dieser Stelle soll auch auf die Möglichkeit einer Therapie mit Proteasom-Inhibitoren der nächsten Generation (Carfilzomib, Delanzomib, Oprozomib, Ixazomab) eingegangen werden [95][139].

Ein anderer interessanter Therapieansatz ist die Behandlung einer akuten AMR mit PPH's, IVIg und Cyclophosphamid, wobei ein NTx-Überleben von 77 % nach einem Jahr beobachtet wurde [149]. Die Ergebnisse bezüglich NTx-Überleben, Nierenfunktion und DSA-Rückgang scheinen beim kombinierten Therapieprotokoll bestehend aus Rituximab und Bortezomib anstelle von Cyclophosphamid ähnlich zu sein.

Nicht unerwähnt soll eine Studie von Viglietti et al. [150] sein, in der ein bedeutsames Prognosemodell mit hoher Genauigkeit im Rahmen der Therapie von Patienten mit akuter AMR entwickelt wurde. Hierbei wurden 278 Patienten mit Steroiden, PPHs, IVIg und Rituximab behandelt. Zum Zeitpunkt der Diagnose sind die GFR-Werte, die interstitielle Fibrose/tubuläre Atrophie und auch neu entstandene DSA wichtige Parameter zur Einschätzung der Prognose. Drei Monate nach Therapie hingegen sind der Anstieg der GFR-Werte sowie die Abnahme der peritubulären Kapillaritis und der DSA-Werte entscheidende Prädiktoren für ein gutes und langanhaltendes Therapieergebnis. Dieses Vorhersagemodell kann sehr hilfreich in der individuellen Einschätzung des Therapiebedarfes bei Patienten mit einer AMR sein. So könnten frühzeitig solche Patienten identifiziert werden, welche nicht auf die o. g. konventionelle AMR-Therapie ansprechen und daher eine potentere Immunsuppression benötigen [148].

4.5 Grenzen der vorliegenden Studie

Die bislang verfügbaren Studien zur Therapie der AMR sind gekennzeichnet durch kleine heterogene Patientengruppen, was wiederum auf das relativ seltene Auftreten dieser Abstoßungsreaktion zurückzuführen ist. So ist auch unsere Studie durch eine kleine Patientenzahl von zehn AMR-Patienten gekennzeichnet, sodass statistisch signifikante Ergebnisse mit Vorsicht betrachtet werden müssen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie sollten daher eher deskriptiv sein. Weiterhin fällt sowohl in der Definition der AMR als auch in der Therapie eine große Heterogenität auf. Der Vergleich mit anderen Studien fällt somit nicht leicht und muss mit entsprechender Sorgfalt erfolgen. Zur Untersuchung der AMR-Therapie sind größere prospektive, randomisierte, standardisierte und kontrollierte Studien erforderlich.

Durch die gleichzeitige Einnahme vieler verschiedener Immunsuppressiva ist es schwierig, die Wirkung des einzelnen Immunsuppressivums zu analysieren, da es vielseitige Interaktionen geben könnte. So muss in Erwägung gezogen werden, dass durch Anwendung mehrerer PPHs im

Rahmen der Therapie einige Medikamente wie z. B. Rituximab und Bortezomib zum Teil entfernt wurden und diese somit weniger Wirkung entfalten konnten [91]. Eventuell hätte man diesem Risiko durch größere Abstände zwischen PPH und Rituximab- bzw. Bortezomibgabe entgegenwirken können.

Bei dem Vergleich zwischen den Untersuchungsergebnissen verschiedener Autoren sollten die Methoden weitestgehend einheitlich sein. So konnten aus den Protokollen der veröffentlichten Studien Unterschiede in der Aufbereitung der Lymphozyten festgestellt werden. Auch die Analysemethoden können in unterschiedlichen Ausmaßen variieren. Zur Detektion der verschiedenen B-Zell-Populationen mittels Durchflusszytometrie werden zahlreiche Oberflächenmoleküle herangezogen. Wir haben unsere Studie auf acht Oberflächenmarker begrenzt, wobei jedoch andere Marker wie z. B. CD5, CD10, CD23, CD45, CD81 oder CD86 ebenso hilfreich bei der Bestimmung der verschiedenen B-Zell-Populationen sind und andere Ergebnisse zeigen können.

Grundsätzlich können pathologische Zustände wie Infektionen, Entzündungen und Tumore einen Anstieg der Lymphozyten – und somit auch verschiedener B-Zell-Populationen – verursachen. Umgekehrt können akute Stresssituationen sowie akute Infektionskrankheiten zu einer Lymphozytopenie führen. Obwohl solche Ereignisse miterfasst wurden, ist es einerseits schwierig, deren Auswirkungen auf unsere Studienergebnisse zu beschreiben. Andererseits können unsere Studienteilnehmer auch an nicht-diagnostizierten, aber durchaus vorhandenen pathologischen Veränderungen erkrankt sein.

Bei der Wahl der Immunsuppressiva sollten Parameter wie Patientenalter, Zeit zwischen NTx und Diagnose der AMR sowie histologischer Grad der Transplantatschädigung beachtet werden. Bei einer sehr späten AMR, alten Patienten und einer bereits stark ausgeprägten Transplantatschädigung könnte der Einsatz von Rituximab und Bortezomib mehr Schaden als Nutzen mit sich bringen. Eine kombinierte potente Anti-Rejektionstherapie wie in unserer Studie sollte daher keinesfalls als Standardmaßnahme bei AMR-Diagnose empfohlen, sondern auf erfolgversprechende Patienteneinzelfälle beschränkt bleiben. In der vorliegenden Studie wurde nur eine Therapiekombination für alle AMR-Patienten angewandt, sodass kein Vergleich verschiedener Therapiemöglichkeiten erfolgen konnte. Daher sind multizentrische Studien unerlässlich, um aussagekräftige Ergebnisse mit einer hohen Fallzahl zu erzielen. So könnte durch die Zusammenarbeit mit anderen Kliniken die Wirkung und optimale Dosis verschiedener – konventioneller sowie neuartiger – AMR-Therapiekombinationen untersucht werden.

Insbesondere unter Berücksichtigung der finanziellen Aspekte und der schädlichen NW sollte der Nutzen kostenintensiver Immunsuppressiva reevaluiert werden. Eine Standardisierung des Studienablaufs stellt hierbei eine große Herausforderung dar, jedoch sollten die Kriterien der AMR-Diagnose, eine Mindestanzahl an AMR-Patienten und Kontrollpatienten, die Beobachtungszeit und das Therapie-Regime möglichst eindeutig definiert und identische Methoden zur DSA-Bestimmung angewandt werden.

4.6 Zusammenfassung

Die humorale Rejektion – insbesondere die späte chronische AMR – stellt eine schwer therapierbare Abstoßungsform dar. Aufgrund ihrer schlechten Prognose ist deren schnellstmögliche Diagnose und Therapieumstellung von großer Bedeutung. Infolge zu großer Kontrollintervalle und möglicher Incompliance wird eine späte AMR oftmals erst spät erkannt, obwohl sie bereits Wochen oder gar Monate vorher hätte diagnostiziert werden können. Um bessere Therapieergebnisse zu erzielen, sollte verstärkt auf die Compliance insbesondere junger Patienten eingegangen werden. Andererseits sollte eine regelmäßige DSA-Bestimmung bei NTx-Patienten mit hohem HLA-MM stattfinden. Vorbeugend empfehlen wir zudem, bei der Auswahl zwischen Empfänger und Spender eines Nierentransplantats auf eine möglichst hohe Übereinstimmung insbesondere der HLA-Kl. II zu achten.

Da wir Patienten mit einer humoralen Abstoßung untersucht haben, stehen die Plasmazellen und die von ihnen produzierten spenderspezifischen Antikörper im Mittelpunkt der Betrachtung. So bestand die Kombinationstherapie aus dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib, welcher insbesondere die Plasmazellen in ihrer Anzahl reduzieren soll, sowie Rituximab, welches die B-Zell-Vorstufen der Plasmazellen angreift. Weiterhin kann mithilfe von Plasmapheresen und IVIg eine Reduktion der DSA erfolgen. Aufgrund der Interaktion zwischen B- und T-Zellen sowie einer häufigen gemischten humoralen und zellulären Rejektion war auch eine hochdosierte Steroidgabe in der Kombinationstherapie enthalten. Trotz dieser intensiven Immunsuppression ist die NTx-Überlebensrate mit 60% nicht zufrieden stellend.

Unsere umfangreiche durchflusszytometrische Analyse konnte detaillierte Einblicke in die Wirkung unserer AMR-Therapie auf die verschiedenen B-Zell-Populationen im peripheren Blut liefern. So konnte die starke und langanhaltende Reduktion der zirkulierenden CD19⁺ B-Zellen

nach AMR-Therapie nachgewiesen werden, welche kompensatorisch mit erhöhten sBAFF-Werten einhergeht. AMR-Patienten sind durch ein großes Reservoir verschiedenartig spezialisierter B-Zellen gekennzeichnet und benötigen daher eine besonders potente und vielseitige AMR-Therapie. In der vorliegenden Studie konnte eine erhöhte Belastung der AMR-Patienten durch CD19⁺ B-Zellen sowie Gedächtnis-B-Zellen und DN-Zellen festgestellt werden. Aufgrund der nur kurzfristigen depletierenden Wirkung unserer multimodalen AMR-Therapie auf die zirkulierenden Class-switched Gedächtnis-B-Zellen, DN-Zellen und Plasmazellen, könnte eine Untersuchung der entsprechenden gewebsständigen B-Zell-Populationen zusätzliche wertvolle Hinweise geben. In Anbetracht der Tatsache, dass es sich bei neun von zehn AMR-Patienten um eine späte chronische AMR handelte und ausgeprägte histologische NTx-Schäden festgestellt werden konnten, kann vermutet werden, dass vermehrt neue langlebige Plasmazellen entstanden sind, die sich in den Überlebensnischen des Knochenmarks, der Milz oder im Nierentransplantat aufhalten und somit resistenter gegen eine Immunsuppression mit Proteasom-Inhibitoren sind als kurzlebige und zirkulierende Plasmazellen. Die schlechten Therapieergebnisse könnten somit auf eine unzureichende Reduktion reifer Plasmazellen zurückzuführen sein, welche anti-HLA-Ak produzieren und somit die Ursache der AMR darstellen. Da wir weder die DSA noch die Ak gegen MMR langfristig durch unsere AMR-Therapie beeinflussen konnten, kann dieser Rückschluss gezogen werden. Dementsprechend könnte die Anwendung von drei oder gar vier Bortezomibzyklen bessere Ergebnisse erzielen als nur ein Zyklus. Wenn es gelingt, diese langlebigen Plasmazellen effektiver zu eliminieren, könnte ebenso eine deutlichere Abnahme der schädlichen DSA-Titer erreicht werden, die ansonsten kontinuierlich von diesen hergestellt werden. Dies wiederum kann eine deutliche Reduktion der Transplantatschädigung zur Folge haben. Dennoch muss auf die Gefahr einer Übertherapie und nachfolgenden schweren Nebenwirkungen hingewiesen werden.

Trotz zahlreicher klinischer Studien stellt die Therapie der humoralen Rejektion die Nephrologen und Transplantationsmediziner noch immer vor eine große Herausforderung. Die Therapieansätze sind vielfältig, aber in ihrer Wirkung noch nicht zufriedenstellend. Insbesondere zur Untersuchung der seltenen späten chronischen AMR empfehlen wir multizentrische randomisierte standardisierte und kontrollierte Studien, um in Zukunft bessere Langzeitergebnisse zu erzielen.

5 Literaturverzeichnis

- [1] Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, Held PJ, Port FK, “Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant.” *N. Engl. J. Med.*, vol. 341, no. 23, pp. 1725–30, Dec. 1999.
- [2] Lefaucheur C, Loupy A, Vernerey D, Duong-Van-Huyen J-P, Suberbielle C, Anglicheau D, Vérine J, Beuscart T, Nochy D, Bruneval P, Charron D, Delahousse M, Empana J-P, Hill G S, Glotz D, Legendre C, Jouven X, “Antibody-mediated vascular rejection of kidney allografts: a population-based study.” *Lancet*, vol. 381, no. 9863, pp. 313–9, Jan. 2013.
- [3] Kaposztas Z, Podder H, Mauiyyedi S, Illoh O, Kerman R, Reyes M, Pollard V, Kahan, B D, “Impact of rituximab therapy for treatment of acute humoral rejection.” *Clin. Transplant.*, vol. 23, no. 1, pp. 63–73, 2009.
- [4] Garcia GG, Harden P, Chapman J, “The global role of kidney transplantation,” *The Lancet*, vol. 379, no. 9820. pp. e36–e38, 2012.
- [5] Brakemeier S, Taxeidi SI, Dürr M, Hofmann J, Schmidt D, Bachmann F, Gaedeke J, Budde K, “Clinical outcome of norovirus infection in renal transplant patients,” *Clin. Transplant.*, Jul. 2016.
- [6] Matas AJ, Gillingham KJ, Humar A, Kandaswamy R, Sutherland DER, Payne WD, Dunn TB, Najarian JS, “2202 kidney transplant recipients with 10 years of graft function: what happens next?,” *Am. J. Transplant*, vol. 8, no. 11, pp. 2410–9, Nov. 2008.
- [7] Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, Guild WR, “Landmark article Jan 28, 1956: Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. By John P. Merrill, Joseph E. Murray, J. Hartwell Harrison, and Warren R. Guild.” *JAMA*, vol. 251, no. 19, pp. 2566–71, May 1984.
- [8] Malvezzi P, Rostaing L, “The safety of calcineurin inhibitors for kidney-transplant patients,” *Expert Opin. Drug Saf.*, vol. 14, no. 10, pp. 1531–46, Oct. 2015.
- [9] OPTN, “<https://optn.transplant.hrsa.gov/data/view-data-reports/national-data/#>.”
- [10] Murphy K, Weaver C, *Janeway’s Immunobiology, 9th edition*. 2016.
- [11] “https://www.eurotransplant.org/cms/index.php?page=pat_germany” p. Über Eurotransplant.
- [12] Samuel U, “https://www.eurotransplant.org/cms/index.php?page=annual_reports” p. Annual Reports | Eurotransplant.
- [13] Glander P, Budde K, Schmidt D, Fuller TF, Giessing M, Neumayer H-H, Liefeldt L, “The ‘blood group O problem’ in kidney transplantation--time to change?,” *Nephrol. Dial. Transplant*, vol. 25, no. 6, pp. 1998–2004, Jun. 2010.
- [14] Bodmer WF, “Paul Ichiro Terasaki (1929-2016): Inventor of the microcytotoxicity assay and pioneer tissue typer,” *HLA*, vol. 87, no. 5, pp. 333–7, May 2016.
- [15] Banas B, Breidenbach T, *Organspende und Transplantationsmedizin XXS pocket*. Börm Bruckmeier, 2011.
- [16] Colvin RB, Smith RN, “Antibody-mediated organ-allograft rejection,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 5, no. 10, pp. 807–17, Oct. 2005.
- [17] Terasaki PI, “A personal perspective: 100-year history of the humoral theory of transplantation,” *Transplantation*, vol. 93, no. 8, pp. 751–6, Apr. 2012.
- [18] Cai J, Qing X, Tan J, Terasaki PI, “Humoral theory of transplantation: some hot topics,” *Br. Med. Bull.*, vol. 105, pp. 139–55, Jan. 2013.
- [19] Schütt C, Bröker B, *Grundwissen Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2011.

- [20] Quezada SA, Jarvinen LZ, Lind EF, Noelle RJ, “CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity.,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 22, pp. 307–28, Jan. 2004.
- [21] Schneider P, MacKay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer JL, Holler N, Ambrose C, Lawton P, Bixler S, Acha-Orbea H, Valmori D, Romero P, Werner-Favre C, Zubler RH, Browning JL, Tschopp J, “BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth.,” *J. Exp. Med.*, vol. 189, no. 11, pp. 1747–56, Jun. 1999.
- [22] Fairfax KA, Kallies A, Nutt SL, Tarlinton DM, “Plasma cell development: from B-cell subsets to long-term survival niches.,” *Semin. Immunol.*, vol. 20, no. 1, pp. 49–58, Feb. 2008.
- [23] Nagasawa T, “Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development.,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 6, no. 2, pp. 107–16, Feb. 2006.
- [24] Kunkel EJ, Butcher EC, “Plasma-cell homing.,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3, no. 10, pp. 822–9, Oct. 2003.
- [25] Perez-Andres M, Paiva B, Nieto WG, Caraux A, Schmitz A, Almeida J, Vogt RF, Marti GE, Rawstron AC, Van Zelm MC, Van Dongen JJM, Johnsen HE, Klein B, Orfao A, “Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic.,” *Cytometry B. Clin. Cytom.*, vol. 78 Suppl 1, pp. S47-60, Jan. 2010.
- [26] Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, Inamine A, Smith KGC, Dörner T, Hiepe F, “Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell.,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 6, no. 10, pp. 741–50, Oct. 2006.
- [27] Johnsen HE, Bergkvist KS, Schmitz A, Kjeldsen MK, Hansen SM, Gaihede M, Nørgaard MA, Bæch J, Grønholdt M-L, Jensen FS, Johansen P, Bødker JS, Bøgsted M, Dybkær K, “Cell of origin associated classification of B-cell malignancies by gene signatures of the normal B-cell hierarchy.,” *Leuk. Lymphoma*, vol. 55, no. 6, pp. 1251–60, Jun. 2014.
- [28] Allen CDC, Okada T, Cyster JG, “Germinal-center organization and cellular dynamics.,” *Immunity*, vol. 27, no. 2, pp. 190–202, Aug. 2007.
- [29] Tangye SG, Tarlinton DM, “Memory B cells: effectors of long-lived immune responses.,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 39, no. 8, pp. 2065–75, Aug. 2009.
- [30] Tangye SG, Avery DT, Deenick EK, Hodgkin PD, “Intrinsic differences in the proliferation of naive and memory human B cells as a mechanism for enhanced secondary immune responses.,” *J. Immunol.*, vol. 170, no. 2, pp. 686–94, Jan. 2003.
- [31] Tokoyoda K, Zehentmeier S, Chang H-D, Radbruch A, “Organization and maintenance of immunological memory by stroma niches.,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 39, no. 8, pp. 2095–9, Aug. 2009.
- [32] Stegall MD, Dean PG, Gloor J, “Mechanisms of alloantibody production in sensitized renal allograft recipients.,” *Am. J. Transplant*, vol. 9, no. 5, pp. 998–1005, May 2009.
- [33] González-García I, Rodríguez-Bayona B, Mora-López F, Campos-Caro A, Brieva JA, “Increased survival is a selective feature of human circulating antigen-induced plasma cells synthesizing high-affinity antibodies.,” *Blood*, vol. 111, no. 2, pp. 741–9, Jan. 2008.
- [34] Mei HE, Yoshida T, Sime W, Hiepe F, Thiele K, Manz RA, Radbruch A, Dörner T, “Blood-borne human plasma cells in steady state are derived from mucosal immune responses.,” *Blood*, vol. 113, no. 11, pp. 2461–9, Mar. 2009.
- [35] Odendahl M, Mei H, Hoyer BF, Jacobi AM, Hansen A, Muehlinghaus G, Berek C, Hiepe F, Manz R, Radbruch A, Dörner T, “Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response.,” *Blood*, vol. 105, no. 4, pp. 1614–21, Feb. 2005.
- [36] Mix E, Goertsches R, Zett UK, “Immunoglobulins--basic considerations.,” *J. Neurol.*, vol. 253 Suppl, pp. V9-17, Sep. 2006.
- [37] Walsh RC, Brailey P, Girnita A, Alloway RR, Shields AR, Wall GE, Sadaka BH, Cardi M, Tevar A, Govil A, Mogilishetty G, Roy-Chaudhury P, Woodle ES, “Early and late acute

antibody-mediated rejection differ immunologically and in response to proteasome inhibition.,” *Transplantation*, vol. 91, no. 11, pp. 1218–26, Jun. 2011.

[38] Sidner RA, Book BK, Agarwal A, Bearden CM, Vieira CA, Pescovitz MD, “In vivo human B-cell subset recovery after in vivo depletion with rituximab, anti-human CD20 monoclonal antibody.,” *Hum. Antibodies*, vol. 13, no. 3, pp. 55–62, Jan. 2004.

[39] Caraux A, Klein, B, Paiva B, Bret C, Schmitz A, Fuhler GM, Bos NA, Johnsen HE, Orfao A, Perez-Andres M, “Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138+ plasma cells.,” *Haematologica*, vol. 95, no. 6, pp. 1016–20, Jun. 2010.

[40] Lucas JG, Co JP, Nwaogwugwu UT, Dosani I, Sureshkumar KK, “Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: an update.,” *Expert Opin. Pharmacother.*, vol. 12, no. 4, pp. 579–92, Mar. 2011.

[41] Kim M, Martin ST, Townsend KR, Gabardi S, “Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: a review of pathophysiology, diagnosis, and treatment options.,” *Pharmacotherapy*, vol. 34, no. 7, pp. 733–44, Jul. 2014.

[42] Montgomery RA, Cozzi E, West LJ, Warren DS, “Humoral immunity and antibody-mediated rejection in solid organ transplantation.,” *Semin. Immunol.*, vol. 23, no. 4, pp. 224–34, Aug. 2011.

[43] Klein U, Rajewsky K, Küppers R, “Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells.,” *J. Exp. Med.*, vol. 188, no. 9, pp. 1679–89, Nov. 1998.

[44] Avery DT, Ellyard JI, Mackay F, Corcoran LM, Hodgkin PD, Tangye SG, “Increased expression of CD27 on activated human memory B cells correlates with their commitment to the plasma cell lineage.,” *J. Immunol.*, vol. 174, no. 7, pp. 4034–42, Apr. 2005.

[45] Sanz I, Wei C, Lee FE-H, Anolik J, “Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells.,” *Semin. Immunol.*, vol. 20, no. 1, pp. 67–82, Feb. 2008.

[46] Fecteau JF, Côté G, Néron S, “A new memory CD27-IgG+ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation.,” *J. Immunol.*, vol. 177, no. 6, pp. 3728–36, Sep. 2006.

[47] Mackay F, Browning JL, “BAFF: a fundamental survival factor for B cells.,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 2, no. 7, pp. 465–75, Jul. 2002.

[48] Xu H, He X, Liu Q, Chen Y, Zhu Y, Shi D, Zhang X, “The abnormal high expression of B cell activating factor belonging to TNF superfamily (BAFF) and its potential role in kidney transplant recipients.,” *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 5, no. 6, pp. 465–70, Dec. 2008.

[49] Xu H, He X, Sun J, Shi D, Zhu Y, Zhang X, “The expression of B-cell activating factor belonging to tumor necrosis factor superfamily (BAFF) significantly correlated with C4D in kidney allograft rejection.,” *Transplant. Proc.*, vol. 41, no. 1, pp. 112–6, 2008.

[50] Huard B, Arlettaz L, Ambrose C, Kindler V, Mauri D, Roosnek E, Tschopp J, Schneider P, French LE, “BAFF production by antigen-presenting cells provides T cell co-stimulation.,” *Int. Immunol.*, vol. 16, no. 3, pp. 467–75, Mar. 2004.

[51] Batten M, Groom J, Cachero TG, Qian F, Schneider P, Tschopp J, Browning JL, Mackay F, “BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes.,” *J. Exp. Med.*, vol. 192, no. 10, pp. 1453–66, Nov. 2000.

[52] Thibault-Espitia A, Foucher Y, Danger R, Migone T, Pallier A, Castagnet S, G-Gueguen C, Devys A, C-Gautier A, Giral M, Soullillou J-P, Brouard S, “BAFF and BAFF-R levels are associated with risk of long-term kidney graft dysfunction and development of donor-specific antibodies.,” *Am. J. Transplant*, vol. 12, no. 10, pp. 2754–62, Oct. 2012.

- [53] Yan M, Brady JR, Chan B, Lee WP, Hsu B, Harless S, Cancro M, Grewal IS, Dixit VM, “Identification of a novel receptor for B lymphocyte stimulator that is mutated in a mouse strain with severe B cell deficiency.” *Curr. Biol.*, vol. 11, no. 19, pp. 1547–52, Oct. 2001.
- [54] Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI, Ambrose C, Bixler SA, Thien M, Brink R, Mackay F, Hodgkin PD, Tangye SG, “BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells.” *J. Clin. Invest.*, vol. 112, no. 2, pp. 286–97, Jul. 2003.
- [55] Groom J, Kalled SL, Cutler AH, Olson C, Woodcock SA, Schneider P, Tschopp J, Cachero TG, Batten M, Wheway J, Mauri D, Cavill D, Gordon TP, Mackay CR, Mackay F, “Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren’s syndrome.” *J. Clin. Invest.*, vol. 109, no. 1, pp. 59–68, Jan. 2002.
- [56] Mariette X, Roux S, Zhang J, Bengoufa D, Lavie F, Zhou T, Kimberly R, “The level of BLyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjögren’s syndrome.” *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 62, no. 2, pp. 168–71, Feb. 2003.
- [57] Holländer GA, Barthlott T, *Immunologie: Grundlagen für Klinik und Praxis*. Elsevier, Urban & Fischer, 2006.
- [58] Halleck F, Duerr M, Waiser J, Huber L, Matz M, Brakemeier S, Liefeldt L, Neumayer H-H, Budde K, “An evaluation of sirolimus in renal transplantation.” *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, vol. 8, no. 10, pp. 1337–56, Oct. 2012.
- [59] Vincenti F, Rostaing L, Grinyo J, Rice K, Steinberg S, Gaitte L, Moal M-C, Mondragon-Ramirez GA, Kothari J, Polinsky MS, Meier-Kriesche H-U, Munier S, Larsen CP, “Belatacept and Long-Term Outcomes in Kidney Transplantation.” *N. Engl. J. Med.*, vol. 374, no. 4, pp. 333–43, Jan. 2016.
- [60] Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vitko S, Nashan B, Gürkan A, Margreiter R, Hugo C, Grinyó JM, Frei U, Vanrenterghem Y, Daloze P, Halloran PF, “Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation.” *N. Engl. J. Med.*, vol. 357, no. 25, pp. 2562–75, Dec. 2007.
- [61] Oray M, Abu Samra K, Ebrahimiadib N, Meese H, Foster CS, “Long-term side effects of glucocorticoids.” *Expert Opin. Drug Saf.*, vol. 15, no. 4, pp. 457–65, 2016.
- [62] Haller MC, Royuela A, Nagler EV, Pascual J, Webster AC, “Steroid avoidance or withdrawal for kidney transplant recipients.” *Cochrane database Syst. Rev.*, no. 8, p. CD005632, 2016.
- [63] Lee R-A, Gabardi S, “Current trends in immunosuppressive therapies for renal transplant recipients.” *Am. J. Health. Syst. Pharm.*, vol. 69, no. 22, pp. 1961–75, Nov. 2012.
- [64] Budde K, Dürr M, Liefeldt L, Neumayer H-H, Glander P, “Enteric-coated mycophenolate sodium.” *Expert Opin. Drug Saf.*, vol. 9, no. 6, pp. 981–94, Nov. 2010.
- [65] Sollinger HW, “Mycophenolates in transplantation.” *Clin. Transplant.*, vol. 18, no. 5, pp. 485–92, Oct. 2004.
- [66] Calne RY, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, Craddock GN, Pentlow BD, Rolles K, “Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors.” *Lancet (London, England)*, vol. 2, no. 8104–5, pp. 1323–7, Dec. 1978.
- [67] Budde K, Becker T, Arns W, Sommerer C, Reinke P, Eisenberger U, Kramer S, Fischer W, Gschaidmeier H, Pietruck F, “Everolimus-based, calcineurin-inhibitor-free regimen in recipients of de-novo kidney transplants: an open-label, randomised, controlled trial.” *Lancet (London, England)*, vol. 377, no. 9768, pp. 837–47, Mar. 2011.
- [68] Webster AC, Lee VWS, Chapman JR, Craig JC, “Target of rapamycin inhibitors (sirolimus and everolimus) for primary immunosuppression of kidney transplant recipients: a systematic review and meta-analysis of randomized trials.” *Transplantation*, vol. 81, no. 9, pp. 1234–48, May 2006.

- [69] Mjörnstedt L, Sørensen SS, von Zur Mühlen B, Jespersen B, Hansen JM, Bistrup C, Andersson H, Gustafsson B, Undset LH, Fagertun H, Solbu D, Holdaas H, “Improved renal function after early conversion from a calcineurin inhibitor to everolimus: a randomized trial in kidney transplantation.” *Am. J. Transplant*, vol. 12, no. 10, pp. 2744–53, Oct. 2012.
- [70] Budde K, Lehner F, Sommerer C, Reinke P, Arns W, Eisenberger U, Wüthrich RP, Mühlfeld A, Heller K, Porstner M, Veit J, Paulus E-M, Witzke O, “Five-year outcomes in kidney transplant patients converted from cyclosporine to everolimus: the randomized ZEUS study.” *Am. J. Transplant*, vol. 15, no. 1, pp. 119–28, Jan. 2015.
- [71] Budde K, Lehner F, Sommerer C, Arns W, Reinke P, Eisenberger U, Wüthrich RP, Scheidl S, May C, Paulus E-M, Mühlfeld A, Wolters HH, Pressmar K, Stahl R, Witzke O, ZEUS Study Investigators, “Conversion from cyclosporine to everolimus at 4.5 months posttransplant: 3-year results from the randomized ZEUS study.” *Am. J. Transplant*, vol. 12, no. 6, pp. 1528–40, Jun. 2012.
- [72] Budde K, Zeier M, Witzke O, Arns W, Lehner F, Guba M, Jacobi J, Kliem V, Reinke P, Hauser IA, Vogt B, Stahl R, Rath T, Duerr M, Paulus E-M, May C, Porstner M, Sommerer C, “Everolimus with cyclosporine withdrawal or low-exposure cyclosporine in kidney transplantation from Month 3: a multicentre, randomized trial,” *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 32, no. 6, pp. 1060–1070, Jun. 2017.
- [73] Liefeldt L, Brakemeier S, Glander P, Waiser J, Lachmann N, Schönemann C, Zukunft B, Illigens P, Schmidt D, Wu K, Rudolph B, Neumayer H-H, Budde K, “Donor-specific HLA antibodies in a cohort comparing everolimus with cyclosporine after kidney transplantation.” *Am. J. Transplant*, vol. 12, no. 5, pp. 1192–8, May 2012.
- [74] Brakemeier S, Kannenkeril D, Dürr M, Braun T, Bachmann F, Schmidt D, Wiesener M, Budde K, “Experience with belatacept rescue therapy in kidney transplant recipients,” *Transpl. Int.*, vol. 29, no. 11, pp. 1184–1195, Nov. 2016.
- [75] Mauiyyedi S, Colvin RB, “Humoral rejection in kidney transplantation: new concepts in diagnosis and treatment.” *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, vol. 11, no. 6, pp. 609–18, Nov. 2002.
- [76] Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF, Campbell PM, Cecka MJ, Cosyns J-P, Demetris AJ, Fishbein MC, Fogo A, Furness P, Gibson IW, Glotz D, Hayry P, Hunsickern L, Kashgarian M, Kerman R, Magil AJ, Montgomery R, Morozumi K, Nিকেleit V, Randhawa P, Regele H, Seron D, Seshan S, Sund S, Trpkov K, “Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection.” *Am. J. Transplant*, vol. 3, no. 6, pp. 708–14, Jun. 2003.
- [77] Lefaucheur C, Nochy D, Hill GS, Suberbielle-Boissel C, Antoine C, Charron D, Glotz D, “Determinants of poor graft outcome in patients with antibody-mediated acute rejection.” *Am. J. Transplant*, vol. 7, no. 4, pp. 832–41, Apr. 2007.
- [78] Venetz JP, Pascual M, “New treatments for acute humoral rejection of kidney allografts.” *Expert Opin. Investig. Drugs*, vol. 16, no. 5, pp. 625–33, May 2007.
- [79] Faguer S, Kamar N, Guilbeaud-Frugier C, Fort M, Modesto A, Mari A, Ribes D, Cointault O, Lavayssière L, Guitard J, Durand D, Rostaing L, “Rituximab therapy for acute humoral rejection after kidney transplantation.” *Transplantation*, vol. 83, no. 9, pp. 1277–80, May 2007.
- [80] Colvin RB, “Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis.” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 18, no. 4, pp. 1046–56, Apr. 2007.
- [81] Dörje C, Midtvedt K, Holdaas H, Naper C, Strøm EH, Øyen O, Leivestad T, Aronsen T, Jenssen T, Flaa-Johnsen L, Lindahl JP, Hartmann A, Reisæter AV, “Early versus late acute antibody-mediated rejection in renal transplant recipients.” *Transplantation*, vol. 96, no. 1, pp. 79–84, Jul. 2013.

- [82] Mauiyyedi S, Pelle PD, Saidman S, Collins AB, Pascual M, Tolkoff-Rubin NE, Williams WW, Cosimi AA, Schneeberger EE, Colvin RB, “Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries.” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 12, no. 3, pp. 574–82, Mar. 2001.
- [83] Gloor J, Stegall MD, “Sensitized renal transplant recipients: current protocols and future directions.” *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 6, no. 5, pp. 297–306, May 2010.
- [84] Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B, Hidalgo LG, Famulski K, Matas A, Halloran PF, “Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence.” *Am. J. Transplant*, vol. 12, no. 2, pp. 388–99, Feb. 2012.
- [85] Haas M, “An updated Banff schema for diagnosis of antibody-mediated rejection in renal allografts.” *Curr. Opin. Organ Transplant.*, vol. 19, no. 3, pp. 315–22, Jun. 2014.
- [86] 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.” *Am. J. Transplant*, vol. 9, no. 11, pp. 2520–31, Nov. 2009.
- [87] Lefaucheur C, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, Nochy D, Andrade J, Antoine C, Gautreau C, Charron D, Glotz D, “Clinical relevance of preformed HLA donor-specific antibodies in kidney transplantation.” *Contrib. Nephrol.*, vol. 162, pp. 1–12, Jan. 2009.
- [88] Lachmann N, Terasaki PI, Budde K, Liefeldt L, Kahl A, Reinke P, Pratschke J, Rudolph B, Schmidt D, Salama A, Schönemann C, “Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts.” *Transplantation*, vol. 87, no. 10, pp. 1505–13, May 2009.
- [89] Bartel G, Schwaiger E, Böhmig GA, “Prevention and treatment of alloantibody-mediated kidney transplant rejection.” *Transpl. Int.*, vol. 24, no. 12, pp. 1142–55, Dec. 2011.
- [90] Burton SA, Amir N, Asbury A, Lange A, Hardinger KL, “Treatment of antibody-mediated rejection in renal transplant patients: a clinical practice survey.” *Clin. Transplant.*, vol. 29, no. 2, pp. 118–23, Feb. 2015.
- [91] Gupta G, Abu Jawdeh BG, Racusen LC, Bhasin B, Arend LJ, Trollinger B, Kraus E, Rabb H, Zachary AA, Montgomery R, Alachkar N, “Late antibody-mediated rejection in renal allografts: outcome after conventional and novel therapies.” *Transplantation*, vol. 97, no. 12, pp. 1240–6, Jun. 2014.
- [92] Everly MJ, Everly JJ, Susskind B, Brailey P, Arend LJ, Alloway RR, Roy-Chaudhury P, Govil A, Mogilishetty G, Rike AH, Cardi M, Wadih G, Tevar A, Woodle ES, “Bortezomib provides effective therapy for antibody- and cell-mediated acute rejection.” *Transplantation*, vol. 86, no. 12, pp. 1754–61, Dec. 2008.
- [93] Archdeacon P, Chan M, Neuland C, Velidedeoglu E, Meyer J, Tracy L, Cavaille-Coll M, Bala S, Hernandez A, Albrecht R, “Summary of FDA antibody-mediated rejection workshop.” *Am. J. Transplant*, vol. 11, no. 5, pp. 896–906, May 2011.
- [94] Halloran PF, Bromberg JS, Fairchild RL, Feng S, Kaplan B, Barr ML, O'Grady J, Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group, “KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients.” *Am. J. Transplant*, vol. 9 Suppl 3, pp. S1-155, Nov. 2009.
- [95] Ejaz NS, Alloway RR, Halleck F, Dürr M, Budde K, Woodle ES, “Review of bortezomib treatment of antibody-mediated rejection in renal transplantation.” *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 21, no. 17, pp. 2401–18, Dec. 2014.
- [96] Tanriover B, Wright SE, Foster SV, Roush KS, Castillo-Lugo JA, Fa K, Levy FL, Mejia A, “High-dose intravenous immunoglobulin and rituximab treatment for antibody-mediated rejection after kidney transplantation: a cost analysis.” *Transplant. Proc.*, vol. 40, no. 10, pp. 3393–6, Dec. 2008.

- [97] Eskandary F, Bond G, Schwaiger E, Kikic Z, Winzer C, Wahrmann M, Marinova L, Haslacher H, Regele H, Oberbauer R, Böhmig GA, “Bortezomib in late antibody-mediated kidney transplant rejection (BORTEJECT Study): study protocol for a randomized controlled trial.” *Trials*, vol. 15, p. 107, Jan. 2014.
- [98] Perry DK, Burns JM, Pollinger HS, Amiot BP, Gloor JM, Gores GJ, Stegall MD, “Proteasome inhibition causes apoptosis of normal human plasma cells preventing alloantibody production.” *Am. J. Transplant*, vol. 9, no. 1, pp. 201–9, Jan. 2009.
- [99] Genberg H, Hansson A, Wernerson A, Wennberg L, Tydén G, “Pharmacodynamics of rituximab in kidney allotransplantation.” *Am. J. Transplant*, vol. 6, no. 10, pp. 2418–28, Oct. 2006.
- [100]Thaunat O, Patey N, Gautreau C, Lechaton S, Fremeaux-Bacchi V, Dieu-Nosjean M-C, Cassuto-Viguier E, Legendre C, Delahousse M, Lang P, Michel J-B, Nicoletti A, “B cell survival in intragraft tertiary lymphoid organs after rituximab therapy.” *Transplantation*, vol. 85, no. 11, pp. 1648–53, Jun. 2008.
- [101]Schrezenmeier E, Budde K, Staeck O, Lehner L, Duerr M, Khadzhynov D, Dörner T, Halleck F, “Incidence of Infectious Disease and Malignancies After Rituximab Therapy in Kidney Transplant Recipients: Results From a Cohort in Germany,” *Transplant. Proc.*, vol. 49, no. 10, pp. 2269–2273, Dec. 2017.
- [102]Adams J, “The proteasome: a suitable antineoplastic target.” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, no. 5, pp. 349–360, May 2004.
- [103]Meister S, Schubert U, Neubert K, Herrmann K, Burger R, Gramatzki M, Hahn S, Schreiber S, Wilhelm S, Herrmann M, Jäck H-M, Voll RE, “Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition.” *Cancer Res.*, vol. 67, no. 4, pp. 1783–92, Feb. 2007.
- [104]Adams J, “The proteasome: structure, function, and role in the cell.” *Cancer Treat. Rev.*, vol. 29 Suppl 1, pp. 3–9, May 2003.
- [105]Kloetzel PM, Ossendorp F, “Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation.” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 16, no. 1, pp. 76–81, Feb. 2004.
- [106]Goldberg AL, Cascio P, Saric T, Rock KL, “The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides.” *Mol. Immunol.*, vol. 39, no. 3–4, pp. 147–64, Oct. 2002.
- [107]Groettrup M, Schmidtke G, “Selective proteasome inhibitors: modulators of antigen presentation?” *Drug Discov. Today*, vol. 4, no. 2, pp. 63–71, Feb. 1999.
- [108]Obeng EA, Carlson LM, Gutman DM, Harrington WJ, Lee KP, Boise LH, “Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells.” *Blood*, vol. 107, no. 12, pp. 4907–16, Jun. 2006.
- [109]Woodle ES, Walsh RC, Alloway RR, Girnita A, Brailey P, “Proteasome inhibitor therapy for antibody-mediated rejection.” *Pediatr. Transplant.*, vol. 15, no. 6, pp. 548–56, Sep. 2011.
- [110]Neubert K, Meister S, Moser K, Weisel F, Maseda D, Amann K, Wiethe C, Winkler TH, Kalden JR, Manz RA, Voll RE, “The proteasome inhibitor bortezomib depletes plasma cells and protects mice with lupus-like disease from nephritis.” *Nat. Med.*, vol. 14, no. 7, pp. 748–55, Jul. 2008.
- [111]Nencioni A, Schwarzenberg K, Brauer KM, Schmidt SM, Ballestrero A, Grünebach F, Brossart P, “Proteasome inhibitor bortezomib modulates TLR4-induced dendritic cell activation.” *Blood*, vol. 108, no. 2, pp. 551–8, Jul. 2006.
- [112]Calame KL, Lin K-I, Tunyaplin C, “Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells.” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 21, pp. 205–30, Jan. 2003.

- [113]Khodadadi L, Cheng Q, Alexander T, Sercan-Alp Ö, Klotsche J, Radbruch A, Hiepe F, Hoyer BF, Taddeo A, “Bortezomib Plus Continuous B Cell Depletion Results in Sustained Plasma Cell Depletion and Amelioration of Lupus Nephritis in NZB/W F1 Mice.,” *PLoS One*, vol. 10, no. 8, p. e0135081, 2015.
- [114]Taddeo A, Khodadadi L, Voigt C, Mumtaz IM, Cheng Q, Moser K, Alexander T, Manz RA, Radbruch A, Hiepe F, Hoyer BF, “Long-lived plasma cells are early and constantly generated in New Zealand Black/New Zealand White F1 mice and their therapeutic depletion requires a combined targeting of autoreactive plasma cells and their precursors.,” *Arthritis Res. Ther.*, vol. 17, p. 39, 2015.
- [115]Schmidt N, Alloway RR, Walsh RC, Sadaka B, Shields AR, Girnita AL, Hanseman DJ, Woodle ES, “Prospective evaluation of the toxicity profile of proteasome inhibitor-based therapy in renal transplant candidates and recipients.,” *Transplantation*, vol. 94, no. 4, pp. 352–61, Aug. 2012.
- [116]Loupy A, Haas M, Solez K, Racusen L, Glotz D, Seron D, Nankivell BJ, Colvin RB, Afrouzian M, Akalin E, Alachkar N, Bagnasco S, Becker JU, Cornell L, Drachenberg C, Dragun D, de Kort H, Gibson IW, Kraus ES, Lefaucheur C, Legendre C, Liapis H, Muthukumar T, Nickleit V, Orandi B, Park W, Rabant M, Randhawa P, Reed EF, Roufosse C, Seshan SV, Sis B, Singh HK, Schinstock C, Tambur A, Zeevi A, Mengel M, “The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology.,” *Am. J. Transplant*, vol. 17, no. 1, pp. 28–41, Jan. 2017.
- [117]Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, Feldman HI, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F, Greene T, Coresh J, “A new equation to estimate glomerular filtration rate.,” *Ann. Intern. Med.*, vol. 150, no. 9, pp. 604–12, May 2009.
- [118]Inker LA, Schmid CH, Tighiouart H, Eckfeldt JH, Feldman HI, Greene T, Kusek JW, Manzi J, Van Lente F, Zhang YL, Coresh J, Levey AS, CKD-EPI Investigators, “Estimating glomerular filtration rate from serum creatinine and cystatin C.,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 367, no. 1, pp. 20–9, Jul. 2012.
- [119]Mengel M, Sis B, Haas M, Colvin RB, Halloran PF, Racusen LC, Solez K, Cendales L, Demetris AJ, Drachenberg CB, Farver CF, Rodriguez ER, Wallace WD, Glotz D, “Banff 2011 Meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection.,” *Am. J. Transplant*, vol. 12, no. 3, pp. 563–70, Mar. 2012.
- [120]Waiser J, Duerr M, Schönemann C, Rudolph B, Wu K, Halleck F, Budde K, Lachmann N, “Rituximab in Combination With Bortezomib, Plasmapheresis, and High-Dose IVIG to Treat Antibody-Mediated Renal Allograft Rejection,” *Transplant. Direct*, vol. 2, no. 8, p. e91, Aug. 2016.
- [121]Sun Q, Liu Z-H, Ji S, Chen J, Tang Z, Zeng C, Zheng C, Li L-S, “Late and early C4d-positive acute rejection: different clinico-histopathological subentities in renal transplantation.,” *Kidney Int.*, vol. 70, no. 2, pp. 377–83, Jul. 2006.
- [122]Péfaur J, Díaz P, Panace R, Salinas P, Fiabane A, Quinteros N, Chea R, Naranjo E, Wurgaft A, Beltran E, Elgueta S, Wegmann ME, Gajardo JG, Contreras L, “Early and late humoral rejection: a clinicopathologic entity in two times.,” *Transplant. Proc.*, vol. 40, no. 9, pp. 3229–36, Nov. 2008.
- [123]Walsh RC, Alloway RR, Girnita AL, Woodle ES, “Proteasome inhibitor-based therapy for antibody-mediated rejection,” *Kidney Int.*, vol. 81, no. 11, pp. 1067–74, Jun. 2012.
- [124]Lerut E, Kuypers DR, Verbeken E, Cleutjens J, Vlaminck H, Vanrenterghem Y, Van Damme B, “Acute rejection in non-compliant renal allograft recipients: a distinct morphology.,” *Clin. Transplant.*, vol. 21, no. 3, pp. 344–51, 2007.
- [125]Waiser J, Budde K, Schütz M, Liefeldt L, Rudolph B, Schönemann C, Neumayer H-H, Lachmann N, “Comparison between bortezomib and rituximab in the treatment of antibody-

mediated renal allograft rejection.,” *Nephrol. Dial. Transplant*, vol. 27, no. 3, pp. 1246–51, Mar. 2012.

[126]Lachmann N, Duerr M, Schönemann C, Pruß A, Budde K, Waiser J, Budde K, Waiser J, “Treatment of Antibody-Mediated Renal Allograft Rejection: Improving Step by Step,” *J. Immunol. Res.*, vol. 2017, pp. 1–9, 2017.

[127]Sautenet B, Blancho G, Büchler M, Morelon E, Toupance O, Barrou B, Ducloux D, Chatelet V, Moulin B, Freguin C, Hazzan M, Lang P, Legendre C, Merville P, Mourad G, Mousson C, Pouteil-Noble C, Purgus R, Rerolle J-P, Sayegh J, Westeel P-F, Zaoui P, Boivin H, Le Gouge A, Lebranchu Y, “One-year Results of the Effects of Rituximab on Acute Antibody-Mediated Rejection in Renal Transplantation: RITUX ERAH, a Multicenter Double-blind Randomized Placebo-controlled Trial.,” *Transplantation*, vol. 100, no. 2, pp. 391–9, Feb. 2016.

[128]Mei HE, Hahne S, Redlin A, Hoyer BF, Wu K, Baganz L, Lisney AR, Alexander T, Rudolph B, Dörner T, “Plasmablasts with a mucosal phenotype contribute to plasmacytosis in SLE.,” *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)*, Jun. 2017.

[129]Vieira CA, Agarwal A, Book BK, Sidner RA, Bearden CM, Gebel HM, Roggero AL, Fineberg NS, Taber T, Kraus MA, Pescovitz MD, “Rituximab for reduction of anti-HLA antibodies in patients awaiting renal transplantation: 1. Safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics.,” *Transplantation*, vol. 77, no. 4, pp. 542–8, Feb. 2004.

[130]Zarkhin V, Li L, Sarwal MM, “BAFF may modulate the rate of B-cell repopulation after rituximab therapy for acute renal transplant rejection.,” *Transplantation*, vol. 88, no. 10, pp. 1229–30, Nov. 2009.

[131]Becerra E, Scully MA, Leandro MJ, Heelas EO, Westwood J-P, De La Torre I, Cambridge G, “Effect of rituximab on B cell phenotype and serum B cell-activating factor levels in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura.,” *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 179, no. 3, pp. 414–25, Mar. 2015.

[132]Hiepe F, Radbruch A, “Plasma cells as an innovative target in autoimmune disease with renal manifestations.,” *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 12, no. 4, pp. 232–40, Apr. 2016.

[133]Stohl W, Hiepe F, Latinis KM, Thomas M, Scheinberg MA, Clarke A, Aranow C, Wellborne FR, Abud-Mendoza C, Hough DR, Pineda L, Migone T-S, Zhong ZJ, Freimuth WW, Chatham WW, BLISS-52 Study Group, BLISS-76 Study Group, “Belimumab reduces autoantibodies, normalizes low complement levels, and reduces select B cell populations in patients with systemic lupus erythematosus.,” *Arthritis Rheum.*, vol. 64, no. 7, pp. 2328–37, Jul. 2012.

[134]Zarkhin V, Lovelace PA, Li L, Hsieh S-C, Sarwal MM, “Phenotypic evaluation of B-cell subsets after rituximab for treatment of acute renal allograft rejection in pediatric recipients.,” *Transplantation*, vol. 91, no. 9, pp. 1010–8, May 2011.

[135]Buffa S, Bulati M, Pellicanò M, Dunn-Walters DK, Wu Y-C, Candore G, Vitello S, Caruso C, Colonna-Romano G, “B cell immunosenescence: different features of naive and memory B cells in elderly,” *Biogerontology*, vol. 12, no. 5, pp. 473–483, Oct. 2011.

[136]Wei C, Anolik J, Cappione A, Zheng B, Pugh-Bernard A, Brooks J, Lee E-H, Milner ECB, Sanz I, “A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus.,” *J. Immunol.*, vol. 178, no. 10, pp. 6624–33, May 2007.

[137]Liu Y, Gong Y, Qu C, Zhang Y, You R, Yu N, Lu G, Huang Y, Zhang H, Gao Y, Gao Y, Guo X, “CD32b expression is down-regulated on double-negative memory B cells in patients with Hashimoto’s thyroiditis,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 440, pp. 1–7, Jan. 2017.

[138]Calich AL, Puéchal X, Pugnet G, London J, Terrier B, Charles P, Mouthon L, Guillevin L, French Vasculitis Study Group, “Rituximab for induction and maintenance therapy in

granulomatosis with polyangiitis (Wegener's). Results of a single-center cohort study on 66 patients.," *J. Autoimmun.*, vol. 50, pp. 135–41, May 2014.

[139]Alexander T, Sarfert R, Klotsche J, Kühl AA, Rubbert-Roth A, Lorenz H-M, Rech J, Hoyer BF, Cheng Q, Waka A, Taddeo A, Wiesener M, Schett G, Burmester G-R, Radbruch A, Hiepe F, Voll RE, "The proteasome inhibitor bortezomib depletes plasma cells and ameliorates clinical manifestations of refractory systemic lupus erythematosus.," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 74, no. 7, pp. 1474–8, Jul. 2015.

[140]Ellyard JI, Avery DT, Phan TG, Hare NJ, Hodgkin PD, Tangye SG, "Antigen-selected, immunoglobulin-secreting cells persist in human spleen and bone marrow.," *Blood*, vol. 103, no. 10, pp. 3805–12, May 2004.

[141]Diwan TS, Raghavaiah S, Burns JM, Kremers WK, Gloor JM, Stegall MD, "The impact of proteasome inhibition on alloantibody-producing plasma cells in vivo.," *Transplantation*, vol. 91, no. 5, pp. 536–41, Mar. 2011.

[142]Hidalgo LG, Campbell PM, Sis B, Einecke G, Mengel M, Chang J, Sellares J, Reeve J, Halloran PF, "De novo donor-specific antibody at the time of kidney transplant biopsy associates with microvascular pathology and late graft failure.," *Am. J. Transplant*, vol. 9, no. 11, pp. 2532–41, Nov. 2009.

[143]Walsh RC, Everly JJ, Brailey P, Rike AH, Arend LJ, Mogilishetty G, Govil A, Roy-Chaudhury P, Alloway RR, Woodle ES, "Proteasome inhibitor-based primary therapy for antibody-mediated renal allograft rejection.," *Transplantation*, vol. 89, no. 3, pp. 277–84, Feb. 2010.

[144]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*, vol. 7, no. 4, pp. 864–71, Apr. 2007.

[145]Woodle ES, Alloway RR, Girnita A, "Proteasome inhibitor treatment of antibody-mediated allograft rejection.," *Curr. Opin. Organ Transplant.*, vol. 16, no. 4, pp. 434–8, Aug. 2011.

[146]Everly MJ, Terasaki PI, Hopfield J, Trivedi HL, Kaneku H, "Protective immunity remains intact after antibody removal by means of proteasome inhibition.," *Transplantation*, vol. 90, no. 12, pp. 1493–8, Dec. 2010.

[147]Eskandary F, Regele H, Baumann L, Bond G, Kozakowski N, Wahrmann M, Hidalgo LG, Haslacher H, Kaltenecker CC, Aretin M-B, Oberbauer R, Posch M, Staudenherz A, Handisurya A, Reeve J, Halloran PF, Böhmig GA., "A Randomized Trial of Bortezomib in Late Antibody-Mediated Kidney Transplant Rejection," *J. Am. Soc. Nephrol.*, p. ASN.2017070818, Dec. 2017.

[148]Budde K, Dürr M, "Any Progress in the Treatment of Antibody-Mediated Rejection?," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 29, no. 2, pp. 350–352, Feb. 2018.

[149]Waiser J, Duerr M, Budde K, Rudolph B, Wu K, Bachmann F, Halleck F, Schönemann C, Lachmann N, "Treatment of Acute Antibody-Mediated Renal Allograft Rejection with Cyclophosphamide.," *Transplantation*, p. 1, Dec. 2016.

[150]Viglietti D, Loupy A, Aubert O, Bestard O, Van Huyen J-PD, Taupin J-L, Glotz D, Legendre C, Jouven X, Delahousse M, Kamar N, Lefaucheur C, "Dynamic Prognostic Score to Predict Kidney Allograft Survival in Patients with Antibody-Mediated Rejection.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 29, no. 2, pp. 606–619, Feb. 2018.

VI Eidesstaatliche Versicherung

„Ich, Luisa Klaus, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung zu Mechanismen und Therapie der humoralen Rejektion an Patienten nach Nierentransplantation“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des **ICMJE** -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s. o.) und werden von mir verantwortet. Es gibt keine Publikationen zu dieser Dissertation.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum: 21.03.2018

Unterschrift:

VII Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

VII Danksagung

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. Klemens Budde und insbesondere meinem Betreuer Herr Dr. Michael Dürr, der mich während der Datenerhebung und Erstellung der Dissertation tatkräftig unterstützt und viel Geduld bewiesen hat. Unsere zahlreichen Treffen haben mir viele hilfreiche Anregungen und Denkanstöße gegeben.

Ferner bedanke ich mich bei Katharina Fabritius, Christine Lorkowski und Marco Mai, die mir während der experimentellen Phase meiner Doktorarbeit stets mit einem offenen Ohr und viel Kompetenz zur Seite standen und immer für eine freundliche Atmosphäre sorgten.

Herrn Dr. Nils Lachmann danke ich für die ausgezeichnete und akribische Hilfe bei der Interpretation der Spender-spezifischen Antikörper.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder sowie meinen Freunden. Ohne deren mühevollen Geduld, stetige Motivation und gelegentlich durchaus erholsame Ablenkung hätte mir in dieser manchmal durchaus beschwerlichen Zeit ein solcher Arbeitsumfang niemals gelingen können.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei meinem Ehemann Stefan Klaus bedanken. Seine liebevolle Unterstützung, Anteilnahme und sein Verständnis während der Zeit meines Studiums und der Arbeit an meiner Dissertation gaben mir viel Kraft und trugen maßgeblich zum Erfolg dieser Dissertation bei.