

Die Assoziation zwischen donorspezifischen HLA-Antikörpern und der  
koronaren Transplantatvaskulopathie nach pädiatrischer Herztransplantation

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Jonas Jenovai  
aus Gießen

Gießen 2016

Aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
unter Leitung von Prof. Dr. med. Gregor Bein

1. Gutachter: Prof. Dr. Gregor Bein

2. Gutachter: Prof. Dr. Veronika Grau

Tag der Disputation: 24.05.2016

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>7</b>
1.1 Klinische Aspekte der Herztransplantation .....	7
1.2 Alloreaktivität und Abstoßung von Herztransplantaten .....	13
1.2.1 Transplantationsimmunologische Grundlagen .....	13
1.2.2 Das HLA-System .....	13
1.2.3 Die Pathophysiologie der Abstoßungsreaktion.....	18
1.2.4 Formen und klinische Einteilung von Abstoßungsprozessen .....	23
1.3 Die koronare Transplantatvaskulopathie .....	26
1.3.1 Epidemiologie und prognostische Bedeutung .....	26
1.3.2 Ätiopathogenese und Morphologie .....	28
1.3.3 Möglichkeiten und Limitationen in Diagnostik und Therapie.....	31
1.3.4 Besonderheiten bei pädiatrischen Patienten.....	34
1.4 HLA-Antikörpermonitoring nach Herztransplantation.....	35
1.4.1 Pathophysiologische Mechanismen von HLA-Antikörpern .....	35
1.4.2 Methoden zur Messung von HLA-Antikörpern.....	37
1.4.3 Die Studienlage zur Beziehung zwischen HLA-Antikörpern und der CAV .....	43
1.5 Ausgangssituation und Fragestellung.....	45

<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>47</b>
2.1 Studienprotokoll .....	47
2.1.1 Probengewinnung und Präanalytik .....	47
2.1.2 Studiendesign und Datenerhebung.....	48
2.2 Methoden.....	50
2.2.1 Vorbereitung und Lagerung der Blutproben.....	50
2.2.2 LCT .....	50
2.2.3 Luminex®.....	54
2.3 Statistische Auswertung.....	56
2.4 Reagenzien und Geräte .....	57
<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>58</b>
3.1 Basisdaten des Patientenkollektivs .....	58
3.2 Koronarangiographische Prävalenz der CAV .....	59
3.3 Ergebnisse der Antikörperdiagnostik .....	61
3.3.1 LCT .....	61
3.3.2 Luminex.....	61
3.4 Zusammenhang zwischen HLA-Antikörpern und der CAV.....	65
3.4.1 Luminex-Screening und LCT .....	65
3.4.2 Donorspezifische Antikörper .....	66

3.5	Basisdaten und weitere klinische Endpunkte in Abhängigkeit von HLA-Antikörper- und Koronargefäßstatus.....	70
3.6	Validierung und Testeigenschaften des Luminex® in der CAV-Diagnostik .....	73
3.6.1	Beziehung zwischen MFI, vPRA und der CAV .....	73
3.6.2	ROC-Analyse und Testeigenschaften des Luminex bei verschiedenen Cutoffs .....	75
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>78</b>
4.1	Charakterisierung des Studienkollektivs .....	78
4.1.1	Basisdaten.....	78
4.1.2	Prävalenz von HLA-Antikörpern und der CAV.....	79
4.1.3	Vergleich der Basisdaten der Fall- und Kontrollpatienten.....	80
4.2	HLA-Antikörper als pathophysiologisches Element der CAV .....	82
4.3	HLA-Antikörperdetektion durch die Luminex®-Technologie und deren Testeigenschaften als Biomarker in der CAV-Diagnostik.....	88
4.4	Ausblick.....	93
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNGEN.....</b>	<b>95</b>
5.1	Englische Zusammenfassung/Abstract.....	95
5.2	Deutsche Zusammenfassung .....	96

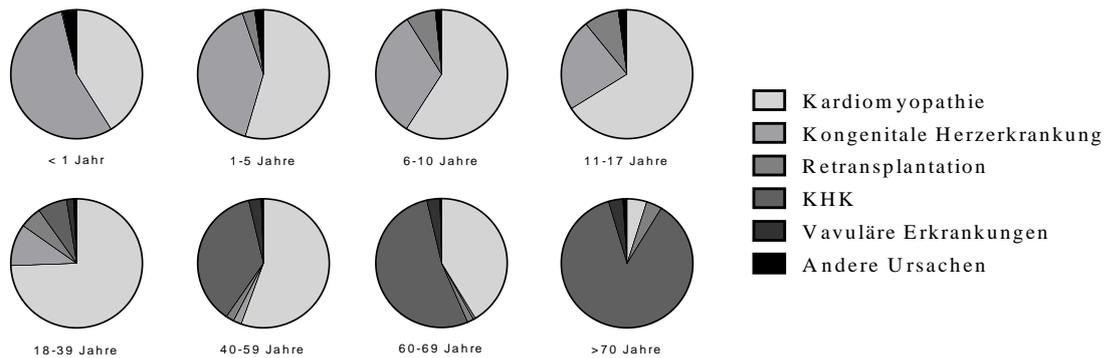
<b>6. ANHANG</b> .....	<b>97</b>
6.1 Abkürzungsverzeichnis .....	97
6.2 Abbildungsverzeichnis.....	99
6.3 Tabellenverzeichnis.....	101
6.4 Literaturverzeichnis .....	102
6.5 Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation.....	117
6.6 Publikationsverzeichnis .....	118
6.7 Danksagungen .....	119

# 1 Einleitung

## 1.1 Klinische Aspekte der Herztransplantation

Im Jahre 1967 erfolgte durch ein südafrikanisches Ärzteteam zum ersten Mal in der Geschichte eine erfolgreiche Herztransplantation (HTx) beim Menschen [1]. Trotz dieses bahnbrechenden Erfolgs überlebte der Patient nur 18 Tage, und folgende Versuche sollten ähnlich schlechte Resultate erbringen, sodass der Durchbruch der HTx als etablierte Therapieoption für terminale Herzerkrankungen zunächst ausblieb [2]. Im Zuge zahlreicher Fortschritte in der Transplantationsmedizin stieg die Zahl der Herztransplantationen stetig an und wurde allein im Jahr 2012 weltweit mehr als 4000-mal durchgeführt [3].

**Epidemiologie** Epidemiologische Angaben zur HTx können neben regionalen Unterschieden je nach Quelle voneinander abweichen, da nicht alle Transplantationszentren in übergreifenden Datenbanken organisiert sind und oft auf unterschiedliche Fallzahlen zurückgegriffen wird. Die im Jahr 1967 gegründete Stiftung Eurotransplant organisiert die Vermittlung und den Transport von Spenderorganen in acht europäischen Ländern, darunter auch in der Bundesrepublik Deutschland. Im Eurotransplant-Raum wurden demnach im Jahre 2013 insgesamt 566 Herzen transplantiert, von denen etwas mehr als die Hälfte auf Deutschland entfielen. Pädiatrische Patienten machen etwa 10 % aller Fälle aus, während die Mehrheit zwischen 18 und 65 Jahre alt ist. Über 65-Jährige repräsentieren etwas unter 6 % aller Fälle [3]. Die Indikation zur HTx kann sich aus vielen Grunderkrankungen ableiten, welche eine terminale Herzinsuffizienz zur Folge haben. Diesen liegt eine ausgeprägte Altersabhängigkeit zugrunde (s. Abbildung 1).



**Abbildung 1 Häufigkeit der zur HTx führenden Grunderkrankungen innerhalb einzelner Altersgruppen nach [4, 5]**

KHK = Koronare Herzkrankheit

Während kongenitale Herzerkrankungen und die Kardiomyopathie im jüngeren Alter dominieren, gewinnt mit steigendem Alter die Koronare Herzkrankheit (KHK) an Bedeutung. Kontraindikationen zur HTx können Begleiterkrankungen (z. B. fortgeschrittene Nieren-, Lungen oder Lebererkrankungen, floride Infektion, erhöhter pulmonaler Gefäßwiderstand), psychosomatische Faktoren (z. B. aktive Suchterkrankung, Malcompliance) oder Systemerkrankungen (z. B. nicht heilbare Malignome, Amyloidose) darstellen [6, 7].

**Organallokation** Eines der grundlegenden Probleme von Organtransplantationen aller Art ist das deutliche Missverhältnis zwischen Bedarf und Angebot von Spenderorganen. Laut Jahresbericht von Eurotransplant standen im Jahr 2013 566 erfolgreich durchgeführte Herztransplantationen einer zum Jahresende 1250 Patienten umfassenden Warteliste mit 1035 Neuanmeldungen gegenüber [8]. Ursächlich für den Mangel an Spenderherzen ist vor allem die mangelnde Spendebereitschaft der Bevölkerung. Um die knappen Spenderorgane optimal einem passenden Empfänger zukommen zu lassen, ist gemäß Transplantationsgesetz eine Organallokation nach Erfolgsaussicht, Dringlichkeit und nach dem Prinzip der Chancengleichheit festgeschrieben [9]. Die Vermittlung thorakaler Organe ist in Deutschland durch Eurotransplant geregelt [10]. Nach einer detaillierten Evaluation durch eine interdisziplinäre Transplantationskonferenz des behandelnden Zentrums wird die Entscheidung über die Aufnahme auf die Warteliste getroffen und dem Patient eine Dringlichkeitsstufe zugewiesen.

Der Algorithmus, nach dem die Organallokation erfolgt, ordnet alle Patienten auf der Warteliste nach mehreren Kriterien in eine Rangfolge ein:

1. Selektion geeigneter Patienten nach Blutgruppenkompatibilität
2. Selektion nach Größen- und Gewichtsverhältnis (+/- 15 %)
3. Selektion nach Dringlichkeit (mitunter Kinder vor Erwachsenen)
4. Berücksichtigung der Wartezeit
5. Berücksichtigung der Ischämiezeit
6. Bevorzugung hochimmunisierter Patienten

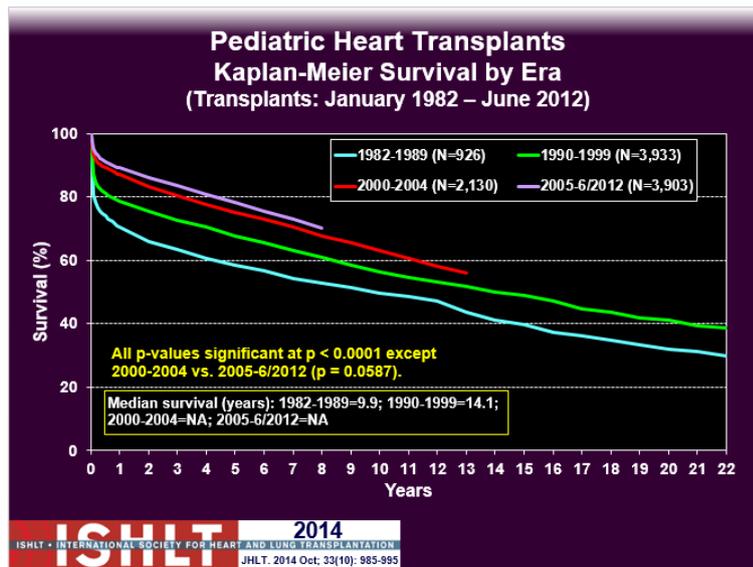
Im Gegensatz zur Nierentransplantation wird die Allokation von Spenderherzen durch mehrere Umstände kompliziert. Zunächst führt die fehlende Option der Lebendspende zu einem wesentlich geringeren Organangebot. Der hohe Anteil von Patienten im hochdringlichen Status auf der Warteliste (66,4 % vs. <1 %) und die hohe Wartelistenmortalität (17,8 % vs. 5,2 %) verdeutlichen, dass die HTx oft unaufschiebbar ist. Diese wird angesichts der Wartelistenmortalität bei pädiatrischen Wartelistenpatienten umso deutlicher, da deren Grunderkrankungen häufig fulminant verlaufen (Säuglinge 32 % vs. 1-10-Jährige 20 % vs. 11-16-Jährige 15 %) [11]. Weiterhin fehlt es an Organersatzverfahren mit ähnlicher Effizienz und Verfügbarkeit wie zum Beispiel die Hämodialyse bei terminaler Niereninsuffizienz [12].

Aus technischen und logistischen Gründen kann ein prospektives Abgleichen der Gewebeverträglichkeit zwischen Spender und Empfänger nicht im Vorfeld erfolgen. Obwohl die positiven Auswirkungen einer guten Gewebeverträglichkeit auf den Transplantationserfolg wissenschaftlich belegt werden konnten, wird diese, anders als bei der Nierentransplantation, bei der Vermittlung von Spenderherzen an geeignete Empfänger nicht berücksichtigt und die Bestimmung der Gewebemerkmale nicht gefordert [13, 14]. Viele Autoren beklagen darüber hinaus, dass das Beurteilen der Gewebemerkmale durch eine mangelnde Standardisierung erschwert sei [15, 16].

Die ohnehin geringe Wahrscheinlichkeit, ein histokompatibles Organ zu erhalten, wird durch die vergleichsweise kurze Ischämiezeit thorakaler Organe (vier bis sechs Stunden) weiter gesenkt. Besonders bei Kindern ist zudem die Größe des Organs wegen anatomischer Umstände ein wichtiger Allokationsfaktor.

**Immunsuppression und Komorbidität** Um den langfristigen Erfolg nach einer gelungenen Transplantation sicherzustellen, bedarf es einer lebenslangen Immunsuppression und einer effektiven, interdisziplinären Nachsorge. In der Mehrzahl wird die Immunsuppression in Form einer Kombinationsbehandlung aus zwei verschiedenen Substanzen durchgeführt [17]. Die Dosierung gestaltet sich häufig als schwierig, da einerseits aufgrund dosisabhängiger Nebenwirkungen der Immunsuppressiva eine geringe Dosis angestrebt werden sollte, andererseits bei Unterdosierung aber das Risiko einer Abstoßung steigt. Die wünschenswerte selektive Suppression alloreaktiver Lymphozyten ist mit den derzeitigen Präparaten nicht möglich, sodass mit unspezifischen Nebenwirkungen auf andere Zellen und Organe zu rechnen ist. Ein großer Teil der Komorbidität nach HTx wird durch Nebenwirkungen der Immunsuppressiva verursacht und umfasst infektiöse, metabolische, kardiovaskuläre, neurologische, dermatologische, renale, muskuloskeletale, maligne sowie psychosoziale Erkrankungen. Einige der am häufigsten beobachteten Komorbiditäten stellen zudem klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren dar und sind besonders im Langzeitverlauf prognostisch relevant. Die Prävalenz der arteriellen Hypertonie beträgt ein Jahr nach Transplantation bereits je nach Altersgruppe etwa 50-75 %. Ebenfalls häufig und prognostisch relevant sind Nierenfunktionsstörungen, welche nach fünf Jahren bis zu 52 % betreffen [5]. Die häufigsten nach HTx zu beobachtenden Stoffwechselstörungen umfassen den Diabetes mellitus (5-37 %) sowie die Hyperlipidämie (26 %) [18-20]. Kortikosteroide, Tacrolimus und Cyclosporin A stellen nicht nur die wichtigsten diabetogenen Medikamente dar, sondern werden auch als kausaler Faktor in der Entstehung der arteriellen Hypertonie und Nierenschäden nach HTx angesehen [21, 22].

**Überlebensraten nach HTx** Infolge medizinischer, technischer und pharmakologischer Verbesserungen weist die HTx inzwischen beachtliche Ergebnisse auf. Erhebungen der *International Society for Heart and Lung Transplantation* (ISHLT) an mehr als 100.000 Patienten zwischen 1982 und 2012 zufolge leben ein Jahr nach der Transplantation noch 82 %, nach fünf Jahren 69 %, nach 10 Jahren 53 % und nach 20 Jahren noch 23 % aller Patienten [3]. Aus Abbildung 2 geht hervor, dass die beobachteten Verbesserungen in erster Linie auf einem gestiegenen Kurzzeitüberleben basieren. Der parallele Verlauf der Kurven impliziert, dass die Mortalitätsraten im Langzeitverlauf für die einzelnen Epochen unverändert geblieben sind.



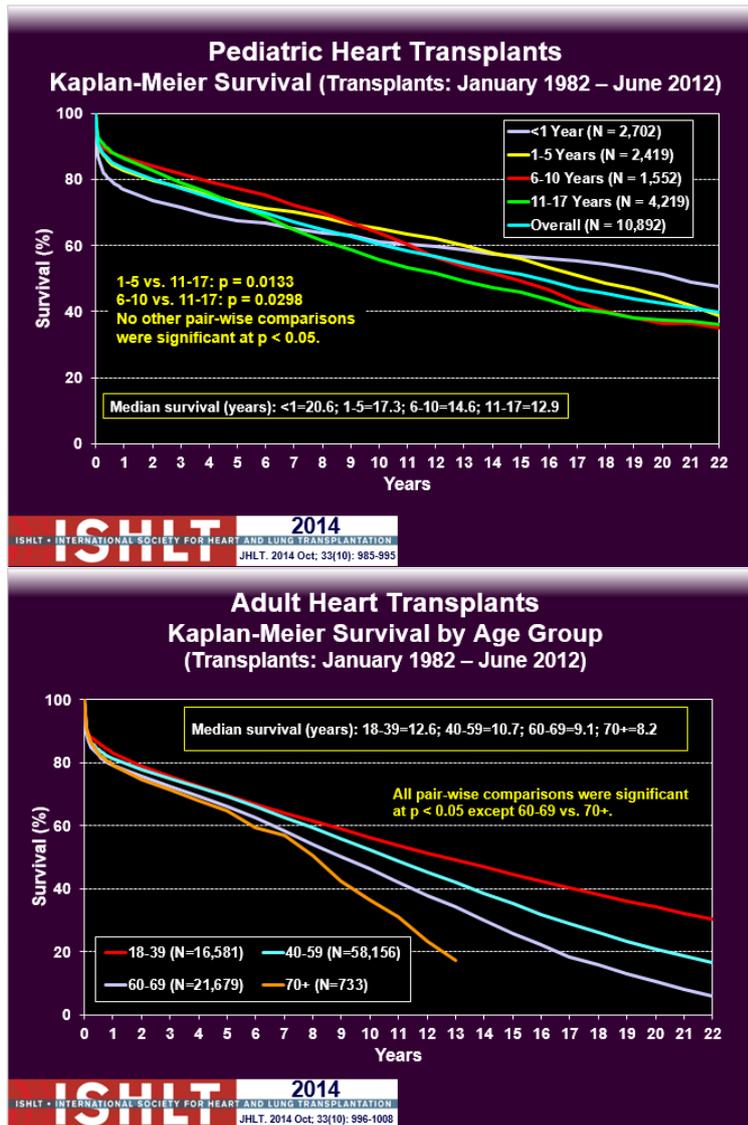
**Abbildung 2 Überlebensraten nach HTx in Abhängigkeit des Zeitraums der Transplantation nach [3]**

Bildmaterial mit freundlicher Genehmigung von Amanda Rowe, International Society for Heart and Lung Transplantation, Addison, USA.

Weiterhin hat das Alter zum Zeitpunkt der HTx einen signifikanten Einfluss auf die Überlebensraten. Der Vergleich der Überlebensraten erwachsener und pädiatrischer Patienten lässt erkennen, dass HTx-Patienten umso länger überleben, je jünger sie zum Zeitpunkt der Transplantation sind (s. Abbildung 3).

Die Häufigkeiten der unterschiedlichen Todesursachen bei HTx-Patienten sind in erster Linie von der seit der Transplantation vergangenen Zeit abhängig, sodass manche charakteristisch in der Frühphase auftreten und später seltener werden, während andere die Mortalität in der Spätphase dominieren. In den ersten drei Jahren sind Infektionen und akutes Graftversagen für die meisten Tode ursächlich, wohingegen drei bis fünf Jahre nach Transplantation maligne Erkrankungen, Nierenversagen und die koronare Transplantatvaskulopathie (engl. *cardiac allograft vasculopathy*, CAV) an Bedeutung gewinnen [20]. Auch die Inzidenz des chronischen Graftversagens als Todesursache wird bei Erwachsenen und vor Allem bei Kindern im Langzeitverlauf immer häufiger. Da die CAV jedoch ultimativ zum Versagen des Allografts führt und eine klinische Differenzierung häufig schwierig ist, bestehen zwischen Tod durch CAV und Tod durch Graftversagen wahrscheinlich größere Schnittmengen [17]. Die Anteile einzelner Faktoren an der Mortalität nach HTx scheinen sich im Verlauf der Zeit verändert zu haben.

Mehrere retrospektive Studien einzelner Zentren deuten darauf hin, dass die Mortalitätsrate der akuten Abstoßung deutlich abgenommen hat, während die der CAV im Wesentlichen unverändert geblieben ist [25-27]. Damit stellt sie nach wie vor den wichtigsten Langzeitüberleben limitierenden Faktor nach HTx dar [19, 28, 29].



**Abbildung 3 Vergleich der Überlebensraten pädiatrischer und erwachsener Patienten gruppiert nach Alter zum Zeitpunkt der HTx nach [23, 24]**

Bildmaterial mit freundlicher Genehmigung von Amanda Rowe, International Society for Heart and Lung Transplantation, Addison, USA.

## 1.2 Alloreaktivität und Abstoßung von Herztransplantaten

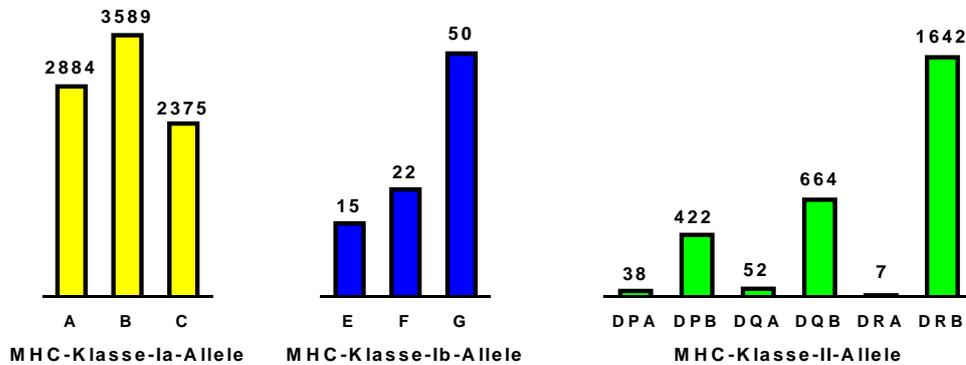
### 1.2.1 Transplantationsimmunologische Grundlagen

Im Unterschied zur syngenen Transplantation führt eine Transplantation zwischen genetisch unterschiedlichen Individuen (allogene Transplantation) zu einer gegen das Transplantat gerichteten Immunantwort des Wirtsorganismus, der Abstoßungsreaktion. Den Grundstein für die Annahme, dass dem Absterben von allogem Gewebe in einem fremden Organismus ein immunologischer Prozess zugrunde liegt, legten Gibson und Medawar im Jahre 1943. Indem sie Probanden zwei Hauttransplantate desselben Spenders zu unterschiedlichen Zeitpunkten verpflanzten, konnten sie zeigen, dass das zuletzt transplantierte Stück Haut wesentlich schneller abgestoßen wurde als das erste. Aus dieser Beobachtung schlossen sie, dass dem Transplantatsterben eine Immunisierung des Empfängerorganismus gegen körperfremde Isoantigene des Spenders vorausging [30]. Das Ziel der Abstoßungsreaktion sind allogene Zellen und Gewebe, welche allogene Antigene tragen und deshalb vom Empfängerorganismus potenziell als fremd erkannt werden können. Obwohl mehrere, die Gewebeverträglichkeit beeinflussende Antigene bekannt sind, sind die Proteine des humanen Leukozytenantigen-Systems (engl. *human leukocyte antigen*, HLA) neben den Blutgruppenantigenen der bedeutsamste und klinisch wichtigste Fokus der Alloimmunantwort gegen solide Organtransplantate [48].

### 1.2.2 Das HLA-System

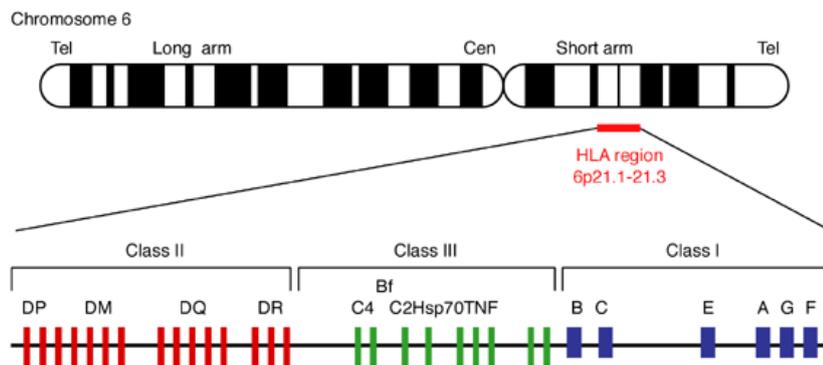
**Entdeckung** Der Entdeckung der HLA-Moleküle voraus ging die Erforschung von sogenannten Leukozytenagglutininen, einer Gruppe von Antikörpern, die eine Agglutination weißer Blutkörperchen verursachen [31]. Erste Hinweise, dass es sich um Allo- und nicht, wie erst vermutet, Autoantikörper handelt, lieferte Amos im Jahre 1953 aus Agglutinationsassays mit Mäuseleukozyten [32, 33]. Jean Dausset unterstrich diese Vermutung, als er 1954 entdeckte, dass solche Antikörper durch Bluttransfusionen induzierbar waren und gegen ein bestimmtes Leukozytenantigen mit einer bestimmten Frequenz in der Population gerichtet waren. Dieses Antigen taufte er *Mac*, heute HLA-A2 genannt, und definierte damit das erste HLA-Merkmal [34, 35].

Seit Dausset das erste Leukozytenantigen benannte, ist die Zahl bekannter serologisch definierter HLA-Antigene auf eine Zahl von 155 gestiegen, und mithilfe molekular-genetischer Methoden konnten bis heute über 12.000 HLA-Allele typisiert werden (s. Abbildung 4).



**Abbildung 4 Polymorphismus der einzelnen HLA-Klassen und -Loci nach [36]**

**Genetik** Die HLA-Antigene sind das Produkt einer hochpolymorphen und polygenen Genregion, dem Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. *major histocompatibility complex*, MHC). Der MHC ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 lokalisiert (6p21.1-6p21.3) und hat eine Länge von etwa 4.000 Kilobasenpaaren ( $4 \times 10^6$  Nukleotide) [38, 48]. Eine schematische Darstellung der Struktur des MHC gibt Abbildung 5.



**Abbildung 5 Genkarte des MHC auf Chromosom 6 nach [37]**

Bildmaterial mit freundlicher Genehmigung von Kalpana Sharma, Cambridge University Press, Cambridge, Großbritannien.

Die am telomeren Ende liegende Genregion der HLA-Klasse-I-Merkmale beinhaltet die Gene für die  $\alpha$ -Ketten der drei *klassischen* HLA-Klasse I-Loci A, B und C sowie die Gene weiterer, *nichtklassischer* HLA-Klasse I-Merkmale. Die  $\beta$ -Kette der HLA-Klasse I-Merkmale besteht aus dem monomorphen  $\beta$  2-Mikroglobulin, welches auf Chromosom

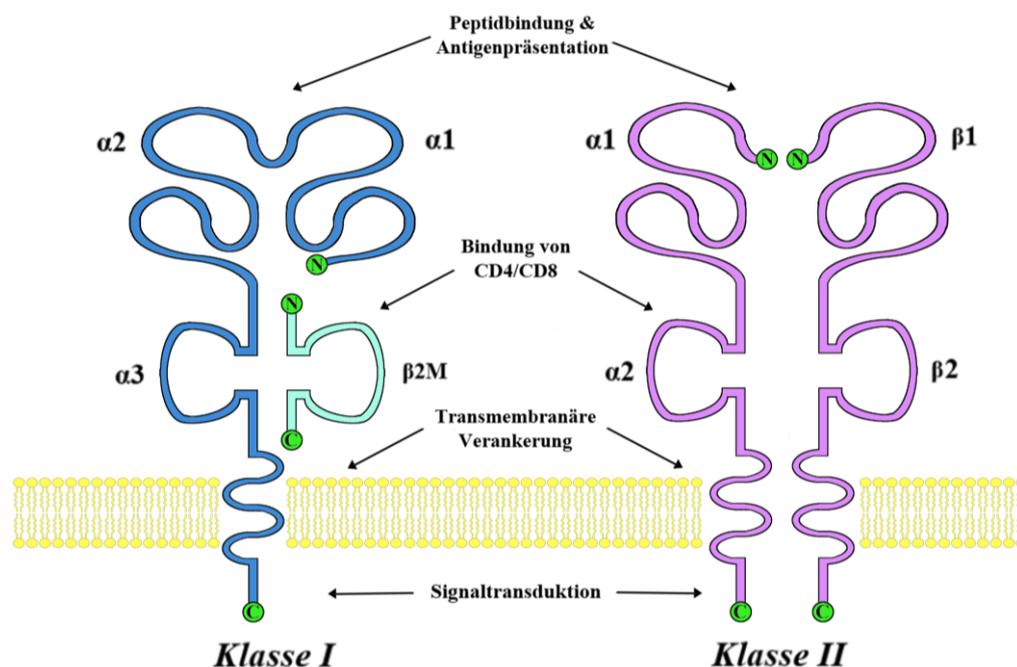
15 kodiert ist. In direkter Nachbarschaft finden sich die *Klasse I-artigen Gene* für die *HLA class I chain-related antigens A* und *B*, kurz MICA und MICB. Weiter in Richtung Zentromer liegen die Gene der sogenannten MHC-Klasse III, welche für eine Reihe immunsystemrelevanter Proteine wie beispielsweise den Tumornekrosefaktor, Komplementfaktoren und diverse Zytokine kodieren. Am zentromeren Ende des MHC liegen die Gene der HLA-Klasse II. Die Anzahl der Genloci dieser Region hängt vom jeweiligen Haplotyp ab. Die exprimierten HLA-Klasse II-Gene codieren für Paare aus jeweils einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette für die HLA-Merkmale DQ und DP sowie für ein Paar aus einer  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ -Ketten für das HLA-Merkmal DR.

Das Vorhandensein von drei Klasse I-Genen und drei (oder vier) Klasse II-Genen auf mütterlichem und väterlichem Chromosom 6 bezeichnet man als Polygenie. Der extreme Polymorphismus in den Nukleinsäuresequenzen der einzelnen MHC-Gene führt zu einer großen Zahl unterschiedlicher genetischer Varianten, sogenannten Allelen, für jeden Locus (s. Abbildung 4). Weil die meisten Menschen deshalb für die HLA-Merkmale beider Klassen heterozygot sind, exprimieren die Zellen eines Individuums sechs verschiedene HLA-Klasse I-Moleküle und, abhängig vom Haplotyp, mindestens sechs verschiedene HLA-Klasse II-Moleküle [38, 48].

**Molekülstruktur** Die HLA-Moleküle der Klasse I und II teilen einige Gemeinsamkeiten bezüglich ihrer dreidimensionalen Struktur und ihres heterodimeren Aufbaus, zeigen aber innerhalb ihrer Unterregionen einige Unterschiede. Eine schematische Darstellung der Struktur der HLA-Moleküle ist durch Abbildung 6 gegeben.

Das HLA-Klasse I-Molekül besteht aus einer etwa 45 Kilodalton (kDa) schweren  $\alpha$ -Kette, deren Aminosäuresequenz analog zu ihrem Genlocus hochpolymorph ist, und einer kleineren, nichtkovalent gebundenen leichteren Kette, dem monomorphen  $\beta$ 2-Mikroglobulin. Die  $\alpha$ -Kette besteht aus drei Domänen, von N-terminal bis C-terminal  $\alpha$ 1-3 benannt. Während der allelische Polymorphismus der HLA-Moleküle vor allem in der  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Domäne lokalisiert ist, ist die Aminosäuresequenz der  $\alpha$ 3-Domäne hochkonserviert. Durch die primäre und sekundäre Proteinstruktur der  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Domäne wird ein Spalt gebildet, welcher das zu präsentierende Antigen bindet. Die  $\alpha$ 3-Domäne vermittelt die Bindung des  $\beta$ 2-Mikroglobulins, die Interaktion mit Corezeptoren der T-Zellen, die Verankerung in der Zellmembran und die Signaltransduktion ins Zellinnere. Das  $\beta$ 2-Mikroglobulin durchspannt die Membran nicht.

Im Unterschied zu HLA-Klasse I-Molekülen sind HLA-Moleküle der Klasse II Strukturen bestehend aus einer etwa 33-35 kDa schweren  $\alpha$ - und einer 26-29 kDa schweren  $\beta$ -Kette. Beide Ketten werden in zwei Domänen unterteilt. Die N-terminale  $\alpha$ 1- und  $\beta$ 1-Domäne bilden den extrazellulären Anteil, welcher analog zum Klasse I-Molekül die Peptidbindungsstelle bildet und die variablen, je nach Allel unterschiedlichen Aminosäurepositionen beinhaltet. Eine Ausnahme bildet die  $\alpha$ 1-Domäne von HLA-DR, die im Vergleich wenig Polymorphismus zeigt. Die zweite Domäne der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten vermittelt analog zur  $\alpha$ 3-Domäne von HLA-Klasse I-Molekülen die Interaktion mit T-Zellen, die transmembranäre Verankerung und die Signaltransduktion [38, 48].



**Abbildung 6 Struktur und Funktion der HLA-Moleküle nach [38]**

**Nomenklatur** Die Charakterisierung von HLA-Merkmalen begann mit serologischen Methoden und wurde mit der Entwicklung molekulargenetischer Methoden weitestgehend durch diese ersetzt. Der Goldstandard für die serologische Gewebetypisierung ist der Lymphozytotoxizitätstest (engl. *lymphocytotoxicity test*, LCT), welcher die HLA-Merkmale über ihre Reaktivität mit HLA-antikörperhaltigen Seren definiert. Unterschiedliche HLA-Merkmale, welche durch gemeinsame Epitope Kreuzreaktivitäten mit eigentlich spezifischen Antikörpern zeigen, fasst man in sogenannte *cross reactive epitope groups* zusammen, welche sogar locusübergreifend vorkommen können.

Um dieser Tatsache gerecht zu werden, werden Feinmerkmale (engl. *split* bzw. *private antigen*) von Hauptmerkmalen (engl. *broad* bzw. *public antigen*) unterschieden. Feinmerkmale lassen sich serologisch *per definitionem* nicht weiter aufschlüsseln.

Hier sei die Nomenklatur serologischer HLA-Antigene anhand des Merkmals HLA-A25(10) erklärt. Die Angabe beginnt immer mit dem Präfix HLA, gefolgt von einem Bindestrich und der Angabe des Genlocus des entsprechenden Antigens (hier A). Es folgt die entsprechende *split*- beziehungsweise *private*-Spezifität (hier 25), durch Klammern gekennzeichnet folgt die Angabe der *broad*- beziehungsweise *public*-Spezifität (hier (10)). Die molekulargenetische Nomenklatur enthält darüber hinaus Informationen über die spezifische Aminosäuresequenz eines Allels [38, 48].

**Physiologische Bedeutung** Obwohl die HLA-Antigene wie bereits beschrieben im Rahmen von Transplantationsexperimenten entdeckt wurden, liegt ihre primäre Funktion in der Initiation der adaptiven Immunantwort sowie der Vermittlung der Toleranz des Immunsystems gegenüber körpereigenem Gewebe und Zellen.

HLA-Moleküle der Klasse I werden konstitutiv auf allen kernhaltigen Zellen des Körpers in unterschiedlichem Umfang exprimiert und mit Peptiden aus intrazellulär synthetisiertem Protein beladen. Somit präsentiert jede zur Proteinsynthese fähige Zelle dem Immunsystem ein Abbild der von ihr hergestellten Proteine auf körpereigenen, autologen HLA-Molekülen. Dieser Mechanismus schützt den Menschen vor allem vor Infektionen, bei denen befallene Zellen durch die Präsentation von viralem oder bakteriellem Antigen von CD8-positiven, zytotoxischen T-Lymphozyten (engl. cytotoxic T-lymphocytes, CTL) erkannt und lysiert werden können. Ähnlich verläuft auch die Bekämpfung transformierter, maligner Zellen.

Klasse II-HLA-Moleküle präsentieren hingegen frei im Extrazellulärraum vorkommende Antigene. Sie werden konstitutionell vor allem von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (engl. *antigen presenting cell*, APC) wie beispielsweise Makrophagen, dendritischen Zellen oder B-Lymphozyten präsentiert, welche extrazelluläre Pathogene internalisieren und in Peptidfragmente proteolysieren. Nach der Bildung des Komplexes aus HLA-Klasse II-Molekül und Antigen erfolgen der Transport und die Expression auf der Zelloberfläche. Dort werden sie von CD4-positiven T-Helferzellen erkannt.

Ausmaß und Verteilung der Expression sind dynamisch und können durch mehrere Faktoren beeinflusst werden. Während Infektionen mit bestimmten Viren die HLA-Expression zu supprimieren vermögen, kommt es zum Beispiel im Rahmen von Infektionen, Ischämie und Transplantatabstoßungen zur Hochregulation der HLA-Genprodukte. Eine Antigenerkennung durch T-Lymphozyten kann darüber hinaus nur erfolgen, wenn dieses auf autologen HLA-Molekülen präsentiert wird. Dieses als HLA-Restriktion bezeichnete Phänomen ermöglicht es Körperzellen, sich vor dem Immunsystem als zum Körper zugehörig auszuweisen und eine T-Zellantwort gegen Autoantigene zu verhindern [48].

### 1.2.3 Die Pathophysiologie der Abstoßungsreaktion

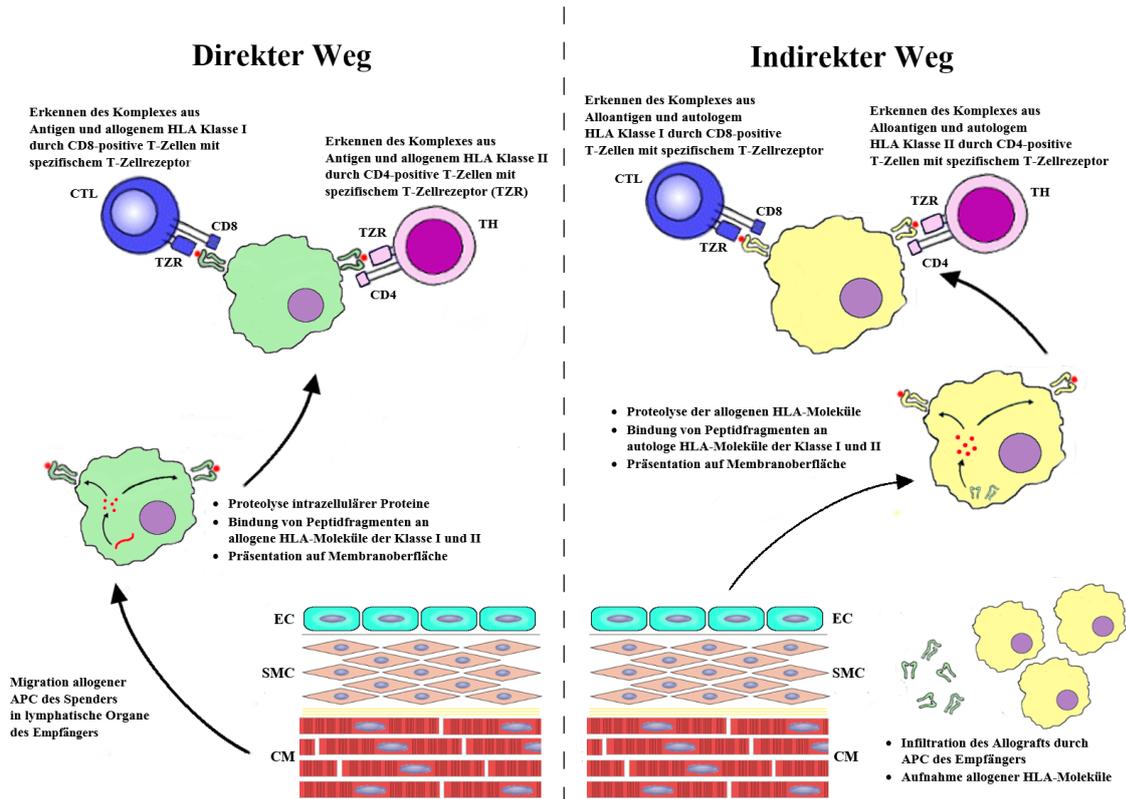
Die Abstoßungsreaktion und die ihr zugrundeliegenden Mechanismen sind trotz des heutigen Wissensstands nicht hinreichend geklärt, jedoch wird sie als wesentliche Leistung des adaptiven Immunsystems gesehen. Der Einleitung einer T-zell-vermittelten, alloantigenspezifischen Organabstoßung geht allerdings eine initiale Transplantatschädigung voraus.

***Ischämie, Reperfusion und das angeborene Immunsystem*** Bereits mit dem Hirntod des Donors werden Veränderungen im Graft initiiert, welche Einfluss auf die Abstoßungsreaktion haben [39]. Durch die Hypoxie während der Ischämiezeit kommt es zu nekrotischen und apoptotischen Zelluntergängen, zur Anhäufung verschiedener Metabolite und zur Bildung großer Mengen freier Radikale nach der Reperfusion. Im Sinne einer unspezifischen *Response-to-Injury*-Reaktion folgt die Aktivierung des allogenen Endothels, welches nun Zytokine (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 und andere) sezerniert und verstärkt HLA- und Adhäsionsmoleküle exprimiert. Zusätzlich reagiert es mit einer Steigerung der Permeabilität und Thrombogenität sowie einer Deregulation des Vasotonus. Dieser Pathomechanismus führt zur Adhärenz und Infiltration des Grafts mit Zellen des angeborenen Immunsystems, welche durch unspezifische Rezeptoren ein Gefahrensignalmuster (*engl. Danger Associated Molecular Pattern, DAMP*) erkennen, aktiviert werden und ihrerseits Sauerstoffradikale und Zytokine sezernieren und die Entzündungsreaktion weiter augmentieren [40-42]. Phänotypische Veränderungen des aktivierten Endothels machen es zur Zielstruktur des Komplement-systems, dessen Endprodukte weitere Entzündungszellen und APC rekrutieren und die entzündliche Reaktion im Allograft verstärken [43-45].

Ischämie, Reperfusion, Zellen des angeborenen Immunsystems und das Komplement führen so bereits kurz nach der Organimplantation zu einer erhöhten Immunogenität des Allografts. Damit werden die Einleitung einer adaptiven Immunantwort und konsekutive Abstoßungsreaktionen begünstigt [40, 46, 47]. Diese wird in erster Linie von den T- und B-Lymphozyten vermittelt.

**Antigenerkennung durch T-Zellen** Mittels Genrekombination und somatischer Mutation entsteht ein großes Repertoire an T-Zellrezeptoren mit unterschiedlicher Spezifität. *In vivo* kann das Erkennen eines bestimmten Alloantigens durch Lymphozyten mit einem spezifischen Rezeptor auf drei Wegen erfolgen. Zunächst durch das Erkennen von intakten, vom Donor stammenden HLA-Molekülen auf aktivierten APC des Donors (direkter Weg), durch das Erkennen proteolysierter Donor-HLA-Bestandteile auf autologen HLA-Molekülen durch aktivierte APC des Empfängers (indirekter Weg) oder durch den Transfer intakter HLA-Moleküle des Spenders auf APC des Empfängers (semidirekter Weg).

Die Grundlage des direkten Wegs der Antigenerkennung bilden sogenannte *donor passenger leukocytes*, antigenpräsentierende Zellen des Donors, welche nach der Transplantation aus dem Graft migrieren und über die Lymphstrombahn in Lymphknoten des Empfängers einwandern. Diese können T-Zellen des Empfängers, welche einen entsprechenden spezifischen T-Zellrezeptor tragen, mithilfe kostimulatorischer Moleküle (z. B. CD80, CD86 und CD58) direkt aktivieren und zur klonalen Expansion bringen. Da die T-Zellen bei der direkten Antigenerkennung intakte, allogene HLA-Moleküle des Spenders erkennen, stellt dieser eine Ausnahme von der bereits beschriebenen HLA-Restriktion dar [48]. Bei der indirekten Alloantigenerkennung erfolgt die Aktivierung der T-Zellen durch APC des Empfängers. Über Phago- oder Pinozytose werden HLA-Moleküle des Spenderorgans von den APC aufgenommen, proteolytisch verdaut und die entstehenden Peptidfragmente anschließend auf autologen HLA-Molekülen der Klasse II in Anwesenheit kostimulatorischer Moleküle präsentiert. Beim semidirekten Weg nehmen APC des Empfängers allogene HLA-Klasse I-Moleküle des Spenders auf und präsentieren diese anschließend in intakter Form auf ihrer Oberfläche [49]. Somit bildet er eine Kombination aus direkter und indirekter Antigenerkennung. Die Relevanz des semidirekten Wegs *in vivo* ist bis dato jedoch unbekannt [50]. In Abbildung 7 sind der direkte und der indirekte Weg der Antigenerkennung schematisch dargestellt.



**Abbildung 7 Direkte und indirekte Antigenerkennung durch T-Zellen nach [48, 50]**

Allogene APC und HLA-Moleküle: grün, autologe APC und HLA-Moleküle: gelb.

APC = Antigenpräsentierende Zelle (engl. antigen presenting cell), CD = Cluster of Differentiation, CM = Kardiomyozyt (engl. cardiomyocyte), CTL = Zytotoxischer T-Lymphozyt (engl. cytotoxic T lymphocyte), EC = Endothelzelle (engl. endothelial cell), HLA =humanes Leukozytenantigen (engl. human leukocyte antigen), SMC = glatte Muskelzelle (engl. smooth muscle cell), TH = T-Helferzelle, TZR = T-Zellrezeptor.

**Zelluläre Abstoßungsmechanismen** CTL bilden eine wesentliche Komponente der akuten zellulären Rejektion [6]. Besonders in der frühen Phase nach Transplantation führt das Emigrieren der *donor passenger leukocytes* zu einer direkten Erkennung der allogeneren HLA-Klasse I-Peptidkomplexe und folgender Aktivierung. Kommt es zum Kontakt mit HLA-Klasse I-tragenden Zielzellen im Graft, wird durch die Degranulation der CTL der Inhalt zytotoxischer Vesikel freigesetzt. Durch zytotoxische Proteine (Perforin, Granzym), den Fas/FasL-Signalweg und Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, welche die Apoptose der Zielzelle auslösen. Die indirekte Antigenerkennung durch CD8-positive CTL wird durch die Präsentation extrazellulären Donorantigens auf autologen HLA-Klasse I-Molekülen durch APC des Empfängers ermöglicht (engl. *cross presentation*) [55].

Da CTL ihre Effektorfunktionen an den Zellen des Allografts jedoch nur nach einer direkten Antigenerkennung entfalten können, ist die indirekte Antigenerkennung durch CTL klinisch vermutlich irrelevant [50, 56].

Die Rolle von CD4-positiven Zellen in der Organabstoßung ist durch ihre vielfältigen Funktionen als Helfer- und Effektorzelle komplex. Aktivierte T-Helferzellen zeichnen sich unter anderem durch die Produktion von IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF- $\alpha$  aus. Hierdurch werden Makrophagen und antigenspezifische CTL zunächst angezogen und aktiviert, wodurch eine zelluläre Immunreaktion vom verzögerten Typ nach Coombs und Gell entsteht (engl. *delayed type hypersensitivity*). Durch zytotoxische und lytische Enzyme, freie Radikale und inflammatorische Zytokine (IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  und andere) werden Zellen und Gewebe direkt geschädigt und phänotypische Veränderungen induziert. Die gesteigerte Expression von HLA-Molekülen auf den Zellen des Allografts führt zur direkten Antigenerkennung durch weitere, alloantigenspezifische CD4- und CD8-positiv T-Zellen. Makrophagen nehmen zusätzlich vermehrt Alloantigen auf und ermöglichen so eine indirekte Antigenerkennung durch andere T-Helferzellen. Neben CTL werden auch B-Zellen über IL-2 aus den T-Helferzellen zur Expansion angeregt. Mit deren Antikörpersynthese wird die humorale Abstoßung eingeleitet. Neben ihrer Helferfunktion konnten Pietra et al. in murinen Modellen auch direkte Effektorfunktionen von T-Helferzellen in der akuten Abstoßung zeigen [57].

Die Kapazität der Parenchym- und Endothelzellen, direkt antigenerkennende T-Zellen zu aktivieren, wird mangels Expression kostimulatorischer Moleküle als eher gering eingeschätzt. Daher sistiert der direkte Weg vermutlich einige Wochen nach der Transplantation durch das Verschwinden der *donor passenger leukocytes* [50, 51]. Aus diesem Grund nehmen die Inzidenz und Bedeutung der akuten Abstoßung im Verlauf deutlich ab [19]. Hingegen ist die Präsentation von Spenderantigen über den indirekten Weg durch APC des Empfängers ein im Verlauf nach HTx stetig stattfindender Prozess. Ähnlich wie bei Autoimmunerkrankungen kommt es ebenso im Transplantationsverlauf zu einer Amplifikation der Immunantwort. Gewebeschäden, beispielsweise durch Ischämie und Reperfusion oder akute zelluläre Abstoßungen (engl. *acute cellular rejection*, ACR), führen zum Freiwerden großer Mengen der verschiedenen Spender-HLA-Antigene. APC können diese nach Aufnahme und Prozessierung anderen alloreaktiven T-Zellen präsentieren, sodass sich die Immunantwort auf andere HLA-Antigene beider Klassen des Spenders ausweitet (*intermolecular spreading*). Weiterhin können im Rahmen der proteolytischen Fragmentierung innerhalb APC viele

verschiedene Epitope eines HLA-Moleküls präsentiert und zum Fokus weiterer Lymphozyten werden (*intramolecular spreading*) [52-54]. Die Persistenz der Epitope auf den Zellen des Allografts führt vermutlich zu persistierender Alloimmunität gegen eine wachsende Anzahl von Epitopen [52, 53]. Aus genannten Gründen vermutet man, dass der indirekte Weg maßgeblich in der chronischen Abstoßung involviert ist [51].

**Humorale Mechanismen** B-Lymphozyten zeichnen sich durch das Tragen eines spezifischen B-Zell-Rezeptors aus. Dieser ist ein membranständiges Immunglobulin, dem transmembranäre Signalproteine angelagert sind. Nach der Bindung an das entsprechende Epitop eines Antigens erfolgen die rezeptorvermittelte Endozytose des Antigen-Antikörper-Komplexes und die proteolytische Fragmentierung. Als APC kann die B-Zelle anschließend das Antigen im HLA- Klasse II-Komplex präsentieren. Über ihren antigenspezifischen T-Zellrezeptor erfolgt die indirekte Antigenerkennung durch T-Helferzellen, welche die nötige Kostimulation der B-Zelle vermitteln. Dies bezeichnet man als *linked recognition*. Es folgen die klonale Expansion, die Differenzierung zur Plasmazelle und die Produktion von Alloantikörpern. Da während der Proteolyse unterschiedliche Peptidfragmente entstehen können, werden mehr und mehr T- und B-Zellklone gegen unterschiedliche Epitope desselben und anderer HLA-Merkmale des Spenders aktiviert (intra- und intermolekulare Epitoperweiterung, engl. *epitope spreading*). So entsteht im Verlauf ein polyklonales Antikörperrepertoire. Die Antikörpersynthese einer B-Zelle gegen das spezifische Antigen beginnt immer mit der Bildung von IgM. Im Verlauf findet ein Isotypenwechsel zu IgG statt, dem Isotyp mit der höchsten Konzentration im Blutserum [48]. Pathophysiologische Mechanismen von HLA-Antikörpern werden in Kapitel 1.4 besprochen.

#### 1.2.4 Formen und klinische Einteilung von Abstoßungsprozessen

Der korrekten Klassifikation von Abstoßungsprozessen bei HTx-Patienten kommt aufgrund therapeutischer und prognostischer Konsequenzen eine große Bedeutung zu. Trotzdem wird die pathophysiologische Rolle einiger immunologischer Abstoßungsmechanismen unterschiedlich beurteilt, und Diagnosekriterien und die Klassifikation werden häufig nicht standardisiert gehandhabt. Nach dem zeitlichen Auftreten unterscheidet man klinisch die hyperakute, die akute und die chronische Abstoßung. Die Besprechung der chronischen Abstoßung, welche sich am Herztransplantat in Form der CAV manifestiert, erfolgt in Kapitel 1.3.

**Hyperakute Abstoßung** Die hyperakute Abstoßung ist eine Form der humoralen Abstoßung und wird durch präformierte, komplementbindende Blutgruppen- oder HLA-Antikörper verursacht. Letztere entstehen durch sensibilisierende Ereignisse wie Schwangerschaft, Bluttransfusionen, frühere Transplantate oder die Therapie mit Kreislaufunterstützungssystemen. Sie führt innerhalb von Minuten bis Stunden nach Reperfusion zu disseminierter intravasaler Blutgerinnung und zum thrombotischen Verschluss der Gefäße des Allografts. Die Prognose ist äußerst schlecht, jedoch ist die hyperakute Abstoßung heutzutage selten [6, 58, 59].

**Akute Abstoßung** Die akute Abstoßung kann in eine akute zelluläre und akute humorale Form eingeteilt werden. Beide manifestieren sich am häufigsten in Form einer akuten Graftdysfunktion in den ersten Tagen und Monaten nach Transplantation, können aber theoretisch jederzeit auftreten. Tabelle 1 stellt die aktuellen Versionen der in Europa und Nordamerika verbreiteten ISHLT-Klassifikationen gegenüber [59, 61].

Wesentliche Komponenten der ACR sind Infiltrate durch CD4- und CD8-positive Lymphozyten sowie Makrophagen. Die Diagnose wird anhand histopathologischer Kriterien gestellt. Hierzu zählen unter anderem der Nachweis multifokaler kardiomyozytärer Schädigungen sowie Ödeme, Hämorrhagien und vaskuläre Inflammation (s. Abbildung 8).

Ebenso wie die hyperakute Abstoßung ist die akute humorale Abstoßung (engl. *antibody mediated rejection*, AMR) das Resultat von komplementaktivierenden Antikörpern. Histopathologische Kriterien sind unter anderem Endothelschädigung und -aktivierung, Infiltration von Makrophagen bis hin zu Ödemen, Hämorrhagien und dem Bild einer Vaskulitis.

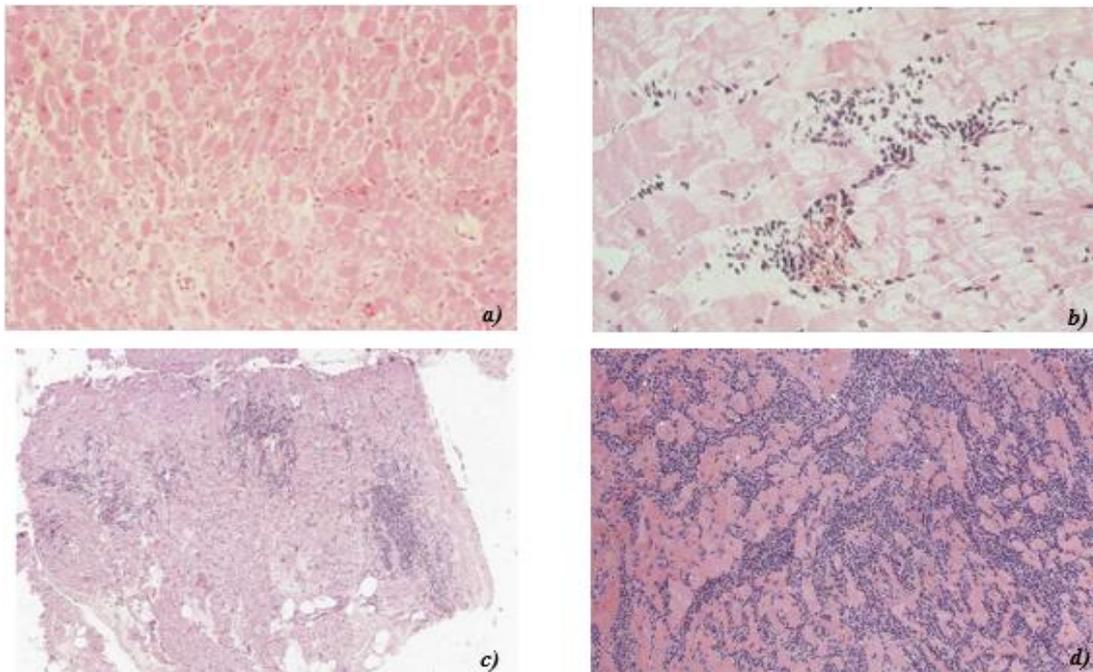
Als Marker für die AMR wird häufig C4d, ein Komplementspaltprodukt, immunhistochemisch nachgewiesen (s. Abbildung 9). Trotz des gehäufteten Auftretens bei Patienten mit donorspezifischen HLA-Antikörpern werden diese nicht mehr zur Diagnose gefordert. Mischformen aus akuter zellulärer und humoraler Form kommen in etwa 25 % der Fälle vor [60]. Beide Entitäten sind in der Regel reversibel und heilen je nach Schweregrad vollständig aus.

Klassifikation der akuten zellulären Abstoßung	Klassifikation der akuten antikörpervermittelten Abstoßung
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>0R, keine ACR</b></li> <li>• <b>1R, milde ACR</b> Interstitielle und/oder peri-vaskuläre Infiltrate, ≤ 1 Fokus myozytärer Schädigung</li> <li>• <b>2R, moderate ACR</b> ≥2 Foci mit zellulärer Infiltration und myozytärer Schädigung</li> <li>• <b>3R, schwere ACR</b> Diffuse Infiltration und multifokale myozytäre Schädigung ±Ödem ±Hämorrhagie ±Vaskulitis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>pAMR0, keine pathologische AMR</b></li> <li>• <b>pAMR1, Verdacht auf AMR</b> Isolierte histologische oder immunpathologische Zeichen</li> <li>• <b>pAMR2, pathologische AMR</b> Kombinierte histologische und immunpathologische Zeichen</li> <li>• <b>pAMR3, schwere pathologische AMR</b> Interstitielle Hämorrhagie, kapilläre Fragmentation, Zellinfiltrate, Ödem</li> </ul>

**Tabelle 1 Klassifikation der akuten zellulären und akuten humoralen Abstoßung nach HTx nach [59, 61]**

*ACR = Akute zelluläre Abstoßung (engl. acute cellular rejection)*

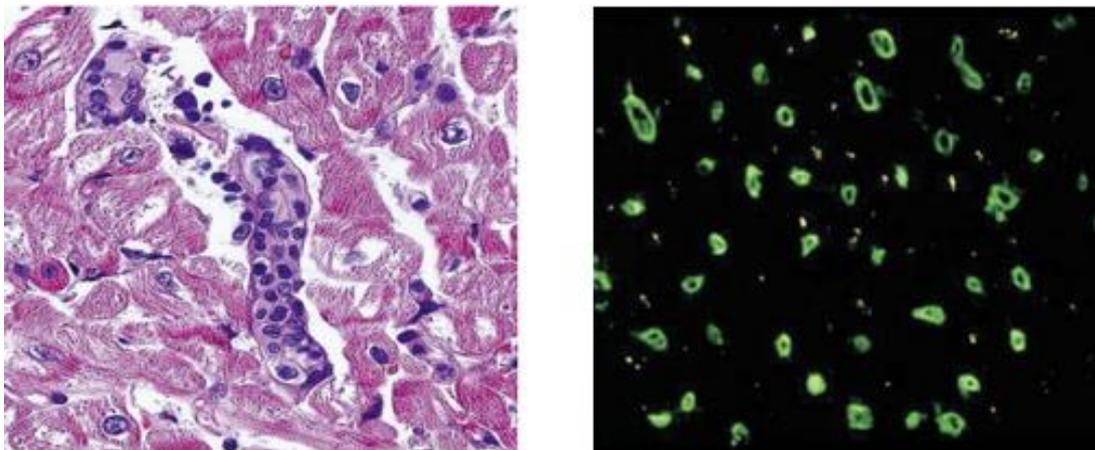
*AMR = Antikörpervermittelte Abstoßung (engl. antibody mediated rejection)*



**Abbildung 8 Histologische Befunde der akuten zellulären Abstoßung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) nach [61]**

Bildmaterial mit freundlicher Genehmigung von Elsevier Science, Amsterdam, Niederlande.

- a) Grad 0R, normale Endomyokardbiopsie ohne Anzeichen einer zellulären Infiltration
- b) Grad 1R, perivaskuläre und interstitielle Infiltrate ohne Zeichen myokardialer Schädigung
- c) Grad 2R, Übersichtsaufnahme mit drei Foci zellulärer Infiltration und normalem Myokard
- d) Grad 3R, diffuse destruktive Infiltration mit Beeinträchtigung der Myozyten und Unterbrechung der normalen Architektur



**Abbildung 9 Histologische und immunpathologische Befunde bei akuter humoraler Abstoßung nach [61]**

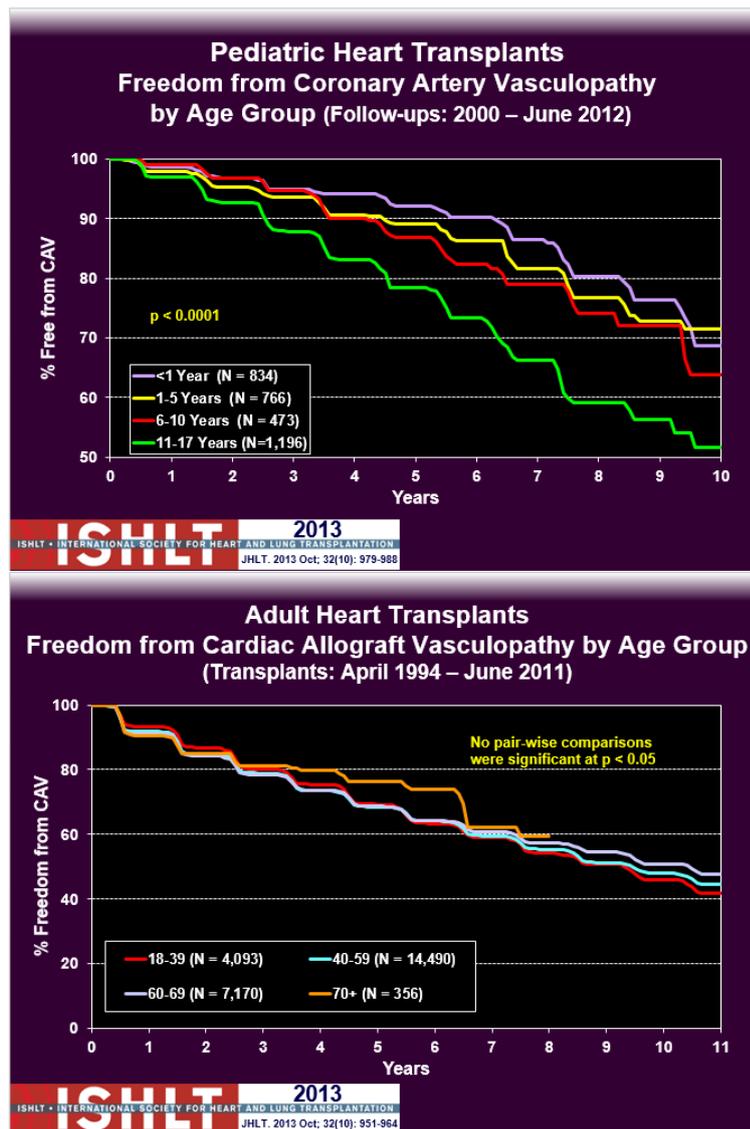
Bildmaterial mit freundlicher Genehmigung von Elsevier Science, Amsterdam, Niederlande.

- Links: Hämatoxylin-Eosin-Färbung: Intravaskuläre Infiltrate und Endothelzellschwellung  
Rechts: C4d-Immunfluoreszenz mit deutlicher Färbung der quer geschnittenen Kapillaren

## 1.3 Die koronare Transplantatvaskulopathie

### 1.3.1 Epidemiologie und prognostische Bedeutung

In Kapitel 1.1 wurde bereits verdeutlicht, dass sich die verbesserten Überlebensraten nach HTx insbesondere durch Verbesserungen in der Frühphase nach Transplantation erklären, während die Mortalitätsraten im Langzeitverlauf hingegen relativ unverändert geblieben sind. Im Gegensatz zur ACR zeigt sich die Prävalenz der CAV zudem über die Jahre hinweg konstant [26, 62, 63]. Die genaue epidemiologische Erfassung der CAV wird durch mehrere Faktoren kompliziert, sodass sich Häufigkeitsangaben einzelner Zentren teilweise deutlich unterscheiden. Erst internationale Datenbanken erlaubten die Betrachtung größerer Stichproben. Eine weitere Ursache liegt in der Koronarangiographie, der wohl am weitesten verbreiteten Methode zur Diagnosestellung. Diese gilt zwar als Goldstandard in der Diagnostik, aber bekanntermaßen wird aufgrund der geringen Sensitivität die Häufigkeit der CAV angiographisch unterschätzt. Die Morphologie und Lokalisation der CAV-Läsionen, wie in Tabelle 2 besprochen, führen dazu, dass diese klinisch meist stumme Erkrankung gerade in frühen Stadien unerkannt bleibt [29, 64, 65]. Darüber hinaus fehlt es an einer internationalen und zentrumsübergreifenden Systematik zu Nomenklatur und Klassifikation, und Klassifikationssysteme wie der ISHLT-CAV-Score werden von vielen Zentren nicht übernommen. Die Häufigkeit der CAV unterscheidet sich ähnlich wie die Überlebensraten nach HTx je nach betrachteter Altersgruppe (s. Abbildung 10). Die kumulative Prävalenz bei Erwachsenen beträgt nach einem Jahr 8 %, nach fünf Jahren 30 %, und etwa 50 % nach 10 Jahren, während sie zu entsprechenden Zeitpunkten bei pädiatrischen Patienten in 3 %, 15 % und 35 % vorliegt [4, 5].



**Abbildung 10 Prävalenz der CAV bei pädiatrischen (oben) und erwachsenen (unten) Patienten subgruppiert nach Alter zum Zeitpunkt der HTx nach [4, 5]**

Bildmaterial mit freundlicher Genehmigung von Amanda Rowe, International Society for Heart and Lung Transplantation, Addison, USA.

Innerhalb von 5 Jahren nach Diagnosestellung führt die CAV bei etwa 50 % der betroffenen Patienten zum Versagen des Herztransplantats [4]. Mit etwa 50 % ist die CAV weiterhin der häufigste Grund für eine Retransplantation [66]. Obwohl diese die einzige definitive Therapie darstellt, wird sie aufgrund der schlechten Ergebnisse und des herrschenden Organmangels nur selten eingesetzt. Sowohl unter Kindern als auch erwachsenen HTx-Patienten stellt die CAV damit die häufigste Todesursache im Langzeitverlauf dar [20, 67].

### 1.3.2 Ätiopathogenese und Morphologie

**Risikofaktoren** Obwohl die Pathogenese der CAV bis dato nicht vollständig verstanden ist, wird ein multifaktorieller Prozess angenommen, auf den immunologische und nichtimmunologische Risikofaktoren Einfluss nehmen können. Studien zu Ausmaß und Relevanz einzelner beschriebener Risikofaktoren liefern allerdings teils widersprüchliche Ergebnisse. Als nichtimmunologische Risikofaktoren gelten neben den klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren (Adipositas, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, Nikotinabusus, hohes Alter) auch Länge und Ausmaß von Ischämie und Reperfusionsschaden sowie Infektionen durch das Zytomegalievirus [6, 68-71]. Sowohl das Alter des Empfängers bei Transplantation (s. Abbildung 10) als auch das Alter des Donors gelten als Risikofaktor. Zudem können präexistente Läsionen im Rahmen einer KHK im Spenderherz eine sich entwickelnde CAV aggravieren [72].

Dass der CAV-Befall die Gefäßanastomose als Grenze zwischen Spender- und Empfängergewebe streng respektiert, legt einen Einfluss immunologischer Faktoren nahe. Die Bedeutung stattgehabter ACR als Risikofaktor für die Entwicklung einer CAV scheint strittig [6, 16, 73-75]. Obwohl klinische Assoziationen zwischen der AMR, HLA-Antikörpern und der CAV beschrieben sind, wird die Beteiligung der humoralen Immunantwort von einigen Forschungsgruppen bezweifelt [76]. Eine detaillierte Erläuterung der HLA-Antikörper als Risikofaktor erfolgt in Kapitel 1.4. Während die HLA-Kompatibilität signifikant mit der Überlebensrate korreliert, ist allerdings weniger klar, ob HLA-*Mismatches* einen unabhängigen, kausalen Risikofaktor für die CAV darstellen [77]. Lediglich HLA-*Mismatches* am DR-Locus wurden in der Vergangenheit mit der CAV in Verbindung gebracht [15]. Studien von Gao et al. konnten hingegen keinen Einfluss der HLA-Kompatibilität auf die Inzidenz der CAV beobachten [73].

**Pathophysiologie und Morphologie** Bis dato ist die Pathophysiologie der CAV nicht gänzlich verstanden. Eine zentrale und strittige Frage ist, ob zelluläre oder humorale Immunmechanismen im Vordergrund stehen und ob eine kausale Beziehung besteht. Dass sich CAV-Läsionen im Tiermodell in lymphozytendefizienten Organempfängern durch passiven Transfer von HLA-Antikörpern induzieren lassen, legt allerdings eine kausale Bedeutung dieser Antikörper nahe [78]. Eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie scheinen das allogene Endothel und die vaskulären SMC zu spielen, welche durch antigenunabhängige und antigenabhängige Reize einer chronischen

Schädigung ausgesetzt sind und in der Folge inflammatorische proliferative Veränderungen im Sinne einer sogenannten *Response-to-Injury*-Reaktion durchmachen.

Die mögliche Assoziation der CAV zu vorausgegangenen akuten Abstoßungsereignissen wird von vielen Autoren so interpretiert, dass erste proinflammatorische Prozesse an Gefäßen und Parenchym die Immunogenität des Grafts erhöhen und freigesetztes Alloantigen die Aufnahme und indirekte Präsentation durch aktivierte APC des Empfängers begünstigen. Aus Makrophagen, Natürlichen Killerzellen (NK) und T-Zellen stammendes IFN- $\gamma$ , welches im Rahmen akuter Abstoßungen ausgeschüttet wird, wird für die Induktion der HLA-Expression und eine Begünstigung chronischer vaskulärer Rejektionsprozesse verantwortlich gemacht. Durch die kontinuierliche Infiltration durch APC und die inter- und intramolekulare Ausbreitung auf andere antigene Determinanten im Rahmen des *epitope spreading* resultiert vermutlich eine andauernde indirekte Antigenerkennung durch polyklonale CD4-positive T-Helferzellen. Diese rekrutieren fortlaufend Makrophagen, NK-Zellen und CD8-positive CTL und führen zu deren Proliferation und Aktivierung. Durch direkt zellschädigende Mechanismen und als wichtige Quelle von Zytokinen (IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  etc.) führen die infiltrierenden Zellen zu einer *delayed type hypersensitivity*-Reaktion. Auf diese Weise kommt es zu einer chronisch inflammatorischen Schädigung und Aktivierung von Endothel und vaskulären SMC [46, 50, 52, 79]. T-Helferzellen initiieren weiterhin die humorale Immunantwort. Anders als bei der hyperakuten und akuten AMR sind vermutlich auch komplementunabhängige Mechanismen von HLA-Antikörpern involviert. Deren pathophysiologische Mechanismen werden in Kapitel 1.4 erläutert. Beide stellen ein weiteres inflammatorisch-proliferatives Signal für Endothel und SMC dar und führen zur Rekrutierung und Stimulation weiterer T-Zellen und Makrophagen. Durch die chronifizierende, sich ausweitende zelluläre und humorale Immunantwort kommt es zur repetitiven Schädigung und einer Akkumulation von den oben genannten Zytokinen und Wachstumsfaktoren (PDGF, FGF, IGF-1, HBGF, EGF, TGF- $\beta$ ). In der Folge entstehen ein persistierender Proliferationsreiz und fortlaufende Reparaturvorgänge, durch die ein umfassendes Gefäßremodelling ausgelöst wird [80-82].

Obwohl synonym für CAV auch der Begriff „Transplantatarteriosklerose“ verwendet wird, zeigen sich einige morphologische Unterschiede zur „gewöhnlichen“ Arteriosklerose der Koronargefäße (s. Tabelle 2).

<b>Merkmal</b>	<b>Koronare Herzkrankheit</b>	<b>CAV</b>
<b>Gefäßbefall</b>	Epikardiale Arterien	Epikardiale und intramurale Arterien, Venen, Kapillaren
<b>Lokalisation</b>	Meist proximal, nahe Bifurkationen	Disseminierter Gefäßbefall, proximal und distal
<b>Stenosierung</b>	Exzentrisch, fokal	Konzentrisch, diffus
<b>Zeitlicher Verlauf</b>	Jahre	Monate
<b>Kalzifikation</b>	Regelmäßig	Selten
<b>Intima</b>	Defekt	Intakt
<b>Atherome</b>	Charakterisch	nicht obligat, aber häufig
<b>Inflammation</b>	Auf Intima beschränkt	Transmurale Vaskulitis

**Tabelle 2 Morphologische Unterschiede zwischen der Koronaren Herzkrankheit und der CAV nach [6]**

Kennzeichnendes Merkmal der CAV ist die konzentrische fibromuskuläre Intimahyperplasie, auch Neointima genannt [6, 83, 84]. Im Verlauf wandern Progenitorzellen des Empfängers in die Läsionen ein, sodass die Neointima zu einer Chimäre aus SMC und Endothel von Donor und Empfänger wird [85, 86]. Fakultativ finden sich im Sinne einer Endothelitis weiterhin subendotheliale Makrophagen und T-Zellen, die sowohl CD4- als auch CD8-positiv sind [83, 87]. Entzündliche Infiltrate werden regelmäßig auch in Media und Adventitia gefunden, sodass das histologische Bild einer, in manchen Fällen nekrotisierenden, Vaskulitis entsteht [84].

Während die Lumeneinengung durch die hyperplastische Neointima die frühe Phase dominiert, gewinnen fibrosierende Reparaturprozesse in Media und Adventitia besonders im späteren Verlauf an Bedeutung [81, 88]. Auch Atherome, welche morphologisch denen der klassischen koronaren Herzkrankheit ähneln und auch meist epikardial lokalisiert sind, können vorkommen. Intermediäre Läsionen, bestehend sowohl aus Intimahyperplasie und Atherom, werden ebenfalls beobachtet [6, 84]. Mit fortschreitender endothelialer Dysfunktion und Gefäßobstruktion verschlechtern sich die Perfusion und Hämodynamik. In den Versorgungsgebieten kommt es zur Ischämie, durch die auch das Myokard reaktive Umbauprozesse durchläuft. Das Myokard bildet eine konzentrische Ventrikelhypertrophie aus und wird noch empfänglicher für Hypoxie. Je nach Schweregrad kommt es zu Infarkten mit nekrotischem Untergang von Myozyten, narbiger Infarktheilung und interstitieller Myokardfibrose. Die Folgen dieser Remodellingprozesse sind eine restriktive hämodynamische Situation und eine

vorwiegend diastolische Herzinsuffizienz [89-93]. Charakteristische histologische Befunde der CAV sind in Abbildung 11 dargestellt.

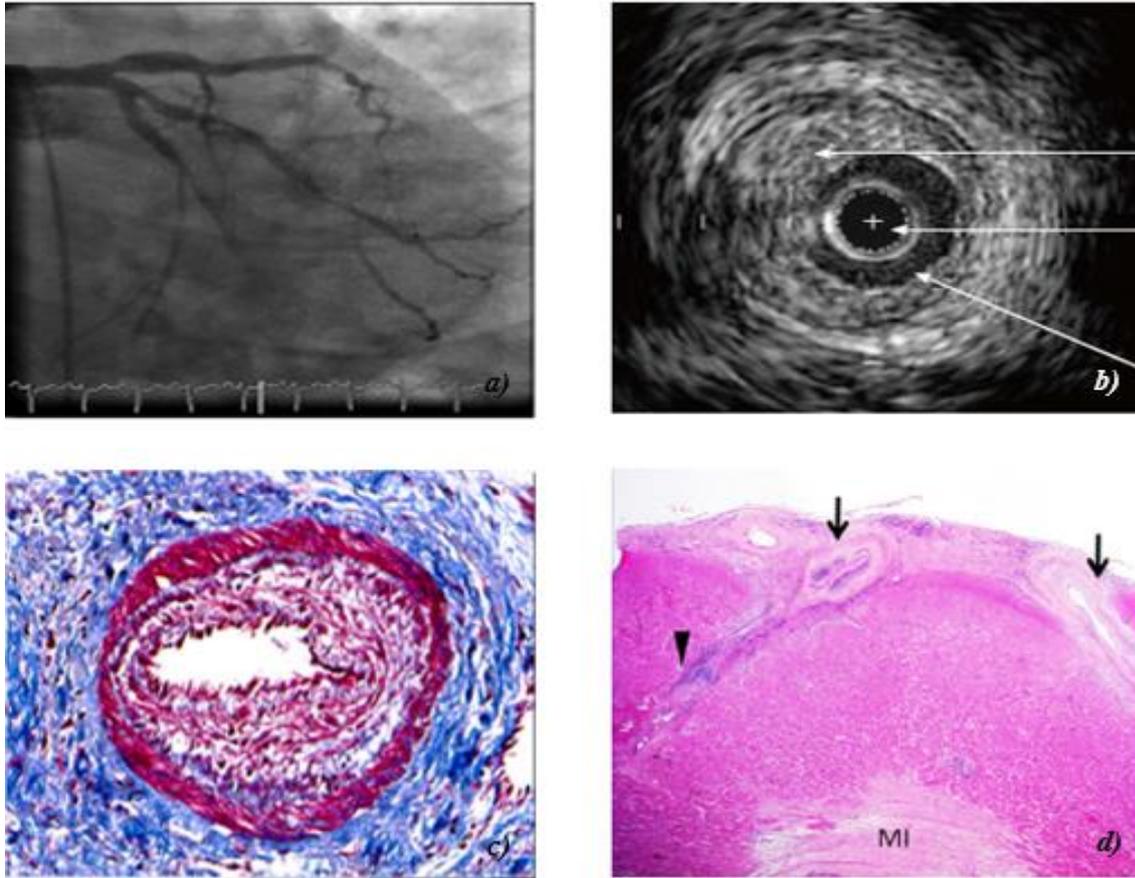
### 1.3.3 Möglichkeiten und Limitationen in Diagnostik und Therapie

Mit der HTx einher geht eine Denervierung des transplantatierten Herzens, was dazu führt, dass charakteristische Symptome einer Myokardischämie wie die Angina Pectoris ausbleiben. Obwohl es bereits ein Jahr nach der Operation bei mehr als einem Drittel aller Herzen zu einer szintigraphisch nachweisbaren Reinnervation kommt, bleibt die Symptomatik der CAV unspezifisch und heterogen [94]. Kongestive Herzinsuffizienz, stumme Infarkte, maligne Herzrhythmusstörungen und plötzlicher Herztod sind häufig die Erstsymptome [6]. Aus diesen Umständen entsteht die Notwendigkeit routinemäßiger koronarangiographischer Verlaufsuntersuchungen.

**Diagnostik** Labormedizinische Biomarker wie das C-reaktive Protein (CRP) und das *brain natriuretic peptide* (BNP) haben vor allem prognostische Aussagekraft [91, 95, 96]. Unter den invasiven bildgebenden Methoden stellt die Koronarangiographie nach wie vor den Goldstandard dar. Vorteile dieser Untersuchung sind die im Vergleich zu neueren Verfahren wie dem intravaskulären Ultraschall (IVUS) breite Verfügbarkeit und Expertise, niedrigere Kosten sowie die Möglichkeit zur Betrachtung kleinerer Äste, in die der IVUS-Katheter nicht vordringen kann. Allerdings bietet die Angiographie lediglich eine Lumenkontrastdarstellung, weshalb die Detektion distaler, konzentrischer und subintimaler CAV-Läsionen oft erst bei fortgeschrittener Erkrankung gelingt. Dies führt zu einer mäßigen Sensitivität, durch die die tatsächliche Häufigkeit der CAV mit der Angiographie bekanntermaßen unterschätzt wird [6, 65, 97]. Der sensitivere IVUS ermöglicht zusätzlich zur Lumenmessung eine Betrachtung der Gefäßwandmorphologie und der Intimadicke, sodass auch angiographisch blande Frühstadien detektiert werden können. Aufgrund der schnellen Progression der CAV werden je nach Zentrum in unterschiedlichen Intervallen routinemäßige, meistens ein- bis zweijährliche, Kontrollangiographien durchgeführt. Die empfohlenen Kontrollintervalle können aufgrund von Malcompliance, Gefäßverschlüssen und anderen Kontraindikationen in der Realität allerdings häufig nicht durchgeführt werden [98]. Sowohl die Koronarangiographie als auch die IVUS-Untersuchung sind kosten- und zeitintensiv und bergen aufgrund ihrer Invasivität ein Komplikationsrisiko.

Die Komplikationsraten der IVUS-Untersuchung liegen jedoch etwas über denen der Angiographie [29, 65, 91]. Auch die Gewinnung von Endomyokardbiopsien zur histopathologischen CAV-Diagnostik erfolgt invasiv via Rechtsherzkatheter. Sie ist ebenfalls relativ insensitiv, durch Stichprobenfehler gekennzeichnet und erfasst lediglich kleine intramurale Gefäße. Sie kann jedoch zum Ausschluss akuter Abstoßungen erfolgen und zusätzlich morphologische Informationen über Gefäße und Myokard liefern. Verlaufsformen mit überwiegendem Befall der Mikrovaskulatur können häufig nur anhand der Untersuchung von Endomyokardbiopsien diagnostiziert werden [7].

**Therapie** Wie bereits beschrieben stellt die kardiale Retransplantation die einzige kurative Therapiemaßnahme dar. Die diffusen, konzentrischen und häufig distal gelegenen Stenierungen bei der CAV sind kathetergestützten Ballondilatationen, Stentimplantationen oder aortokoronaren Bypassoperationen im Unterschied zu den fokalen, proximalen Stenosen der KHK leider nur selten zugänglich. Trotz des Einsatzes von antiproliferativ beschichteten Stents zeigt sich bei der CAV darüber hinaus eine erhöhte Rate an Restenosen [6, 29]. Kardiovaskuläre Risikofaktoren sollten so gut als möglich kontrolliert und therapiert werden. Durch ihre lipidsenkenden und immunmodulierenden Eigenschaften wird die präventive Einnahme eines HMG-CoA-Reduktaseinhibitors empfohlen. Weiterhin kann eine Umstellung der Immunsuppression von einem Calcineurininhibitor auf Mycophenolat-Mofetil, Sirolimus oder Everolimus erwogen werden, da unter diesen eine langsamere Progression beobachtet wurde [58].



**Abbildung 11 Angiographische, sonographische und histopathologische Befunde der CAV nach [99-101]**

- a) Angiographische Darstellung der linken Koronararterie: multiple sequentielle Läsionen, diffuse Verengung der Koronarien und deutliche Rarefizierung der distalen Vaskulatur. Bildmaterial mit freundlicher Genehmigung von Giora Weisz, MD, Columbia University Medical Center, New York, USA.
- b) Intravaskulärer Ultraschall eines Koronargefäßes, Pfeile von innen nach außen: Ultraschallkatheter, Gefäßlumen, hyperplastisch verdickte Intima. Bildmaterial mit freundlicher Genehmigung von Giora Weisz, MD, Columbia University Medical Center, New York, USA.
- c) Trichrom- und Van Gieson-Färbung, fibromuskuläre Intimahyperplasie. Bildmaterial mit freundlicher Genehmigung von Nathalie Dedieu, MD, King's College London, Großbritannien.
- d) Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Pfeile: epikardiale Arterien mit konzentrischer Lumeneinengung, Pfeilspitze: CAV-betroffene intramurale Arterie, MI = subsequenter Myokardinfarkt. Bildmaterial mit freundlicher Genehmigung von Elsevier Science, Amsterdam, Niederlande.

#### 1.3.4 Besonderheiten bei pädiatrischen Patienten

Wie in Abbildung 10 illustriert, ist die Inzidenz der CAV bei Kindern signifikant niedriger als bei erwachsenen Patienten. Wegen der ohnehin geringen Grundgesamtheit kindlicher HTx-Patienten wirkt sich dies weiter auf Fallzahlen, Stichproben und die wissenschaftliche Betrachtung pädiatrischer Studien zur CAV aus.

Bereits Billingham und Medawar beobachteten 1953 im Rahmen tierexperimenteller Hauttransplantationen, dass eine Exposition mit Alloantigen im neonatalen Stadium die Entstehung einer Toleranz gegenüber dem Transplantat induziert [102]. Auch klinische Beobachtungen, höhere Überlebensraten und seltenere Abstoßungsreaktionen unter jungen Transplantatempfängern führten zu der Hypothese, dass das kindliche Immunsystem, ähnlich wie bei Allergenen, wesentlich naiver und schwächer auf Alloantigen reagiert als das des Erwachsenen [103].

Mitverantwortlich für das seltenere Auftreten der CAV bei pädiatrischen Patienten sind jedoch womöglich auch klinische und diagnostische Umstände. Da sich nichtinvasive Verfahren aufgrund ihrer unterlegenen Sensitivität nicht bewährt haben, entsteht auch bei Kindern eine Notwendigkeit für routinemäßige Kontrollangiogramme. Im Vergleich mit Erwachsenen manifestiert sich die CAV bei Kindern häufiger mit einem diffusen und distalen Befallsmuster, was die Sensitivität der Angiographie bei Kindern weiter einschränkt [91, 104]. Außerdem sind klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Rauchen, Hypertonie oder Diabetes beim kindlichen Spender und Empfänger seltener als bei Erwachsenen. Da sowohl die Zugangsgefäße als auch die Koronarien bei pädiatrischen Patienten wesentlich kleiner und mit dem Katheter schwieriger zu passieren sind, ist die Angiographie hier technisch schwieriger. Dies führt zu höheren Komplikationsraten insbesondere bei Säuglingen, weshalb die Indikation bei Kindern besonders restriktiv gestellt wird. Weitere Gründe, die serielle Follow-Up-Untersuchungen verhindern, sind Malcompliance oder Kontraindikationen wie Gefäßverschlüsse oder schwere Komorbidität [91]. In einer retrospektiven, mehr als 2000 Patienten und 20 Zentren umfassenden Studie der *Pediatric Heart Transplant Study* lagen serielle Kontrollangiogramme nur bei weniger als 50% der Patienten vor [98].

## 1.4 HLA-Antikörpermonitoring nach Herztransplantation

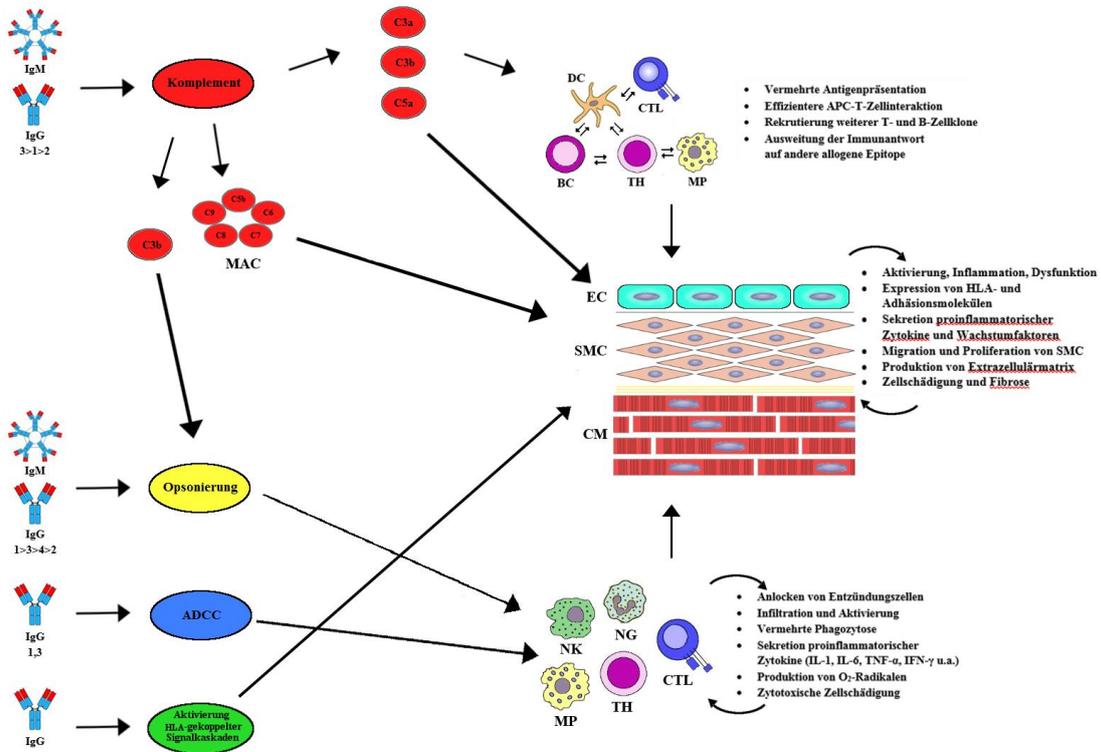
Die humorale (lat. *umor* „Flüssigkeit, Saft, Feuchtigkeit“) Immunantwort ist ein Teil der adaptiven Immunantwort und wird durch B-Lymphozyten und die von ihnen produzierten Immunglobuline vermittelt. Obwohl die pathophysiologischen Mechanismen *in vivo* nur teilweise bekannt sind und klinische Studien divergente Ergebnisse liefern, wird den HLA-Antikörpern in der humoralen Abstoßung die größte Bedeutung beigemessen.

### 1.4.1 Pathophysiologische Mechanismen von HLA-Antikörpern

**Entstehung** Alloantikörper sind irreguläre Antikörper, das heißt sie sind gegen andersartige, körperfremde Strukturen eines Individuums derselben biologischen Spezies gerichtet und können erst nach einer Sensibilisierung beobachtet werden. Nach dem zeitlichen Auftreten werden vor der Transplantation entstandene, sogenannte präformierte Antikörper von *de novo* Antikörpern unterschieden, welche nach der Transplantation entstehen. Sensibilisierende Ereignisse, die zur Bildung präformierter HLA-Antikörper führen, können beispielsweise Schwangerschaften, die Transfusion von Blutprodukten oder die Therapie mit extrakorporalen Zirkulationssystemen sein [38, 48]. Nach den in Kapitel 1.2.3 ausgeführten Mechanismen kommt es zur Bildung von Alloantikörpern.

**Isotyp** Antikörper bestehen aus einer variablen und einer konstanten Region. Während die variable Region Spezifität und Zielstruktur des Antikörpers festlegt, bestimmt dessen konstanter Teil, der Fc-Teil, den Isotyp und folglich die funktionellen Eigenschaften. Aus strukturellen Gründen sind Immunglobuline im menschlichen Körper charakteristisch verteilt. IgG und IgM sind die Immunglobuline mit der höchsten Konzentration im menschlichen Organismus und die wichtigsten Isotypen nach Transplantation. IgM-Antikörper sind pentamere Strukturen mit zehn Antigenbindungsstellen, welche sich wegen ihrer Größe vornehmlich auf den intravasalen Raum verteilen. IgG liegt als monomere Struktur vor und kann aufgrund seiner geringen Größe auch in extravasale Kompartimente, Lymphe und Interstitium diffundieren. Von besonderem Interesse ist bei transplantationsmedizinischen Fragestellungen häufig die Fähigkeit einzelner Isotypen, das Komplementsystem zu aktivieren. Diese Funktion wird maßgeblich von Immunglobulinen der Klasse M und G wahrgenommen [48].

Komplementabhängige und -unabhängige Effekte verschiedener Isotypen von HLA-Antikörpern auf allogene Zellen des transplantierten Herzens sind in Abbildung 12 dargestellt.



**Abbildung 12 Pathophysiologische Mechanismen von HLA-Antikörpern nach HTx nach [48, 105]**

ADCC = Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (engl. antibody dependent cellular cytotoxicity), APC = Antigenpräsentierende Zelle (engl. antigen presenting cell), BC = B-Lymphozyt, CM = Kardiomyozyt (engl. cardiomyocyte), CTL = Zytotoxischer T-Lymphozyt (engl. cytotoxic T lymphocyte), DC = Dendritische Zelle (engl. dendritic cell), EC = Endothelzelle (engl. endothelial cell), HLA = humanes Leukozytenantigen (engl. human leukocyte antigen), IgG = Immunglobulin G, IgM = Immunglobulin M, MAC = engl. membrane attack complex, MP = Makrophage, NG = Neutrophiler Granulozyt, NK = Natürliche Killerzelle, SMC = Glatte Muskelzelle (engl. smooth muscle cell), TH = T-Helferzelle.

**Spezifität** Bindet ein HLA-Antikörper spezifisch diejenigen HLA-Merkmale, welche von den allogenen Zellen des Organspenders exprimiert werden, so werden sie als donorspezifische Antikörper (DSA) bezeichnet. DSA können gegen HLA-Merkmale der Klasse I und der Klasse II gerichtet sein. Obwohl eine allogene Transplantation in Abwesenheit anderer sensibilisierender Ereignisse lediglich zur Immunisierung gegen die donorspezifischen HLA-Merkmale führen dürfte, werden besonders im Langzeitverlauf auch *de novo* HLA-Antikörper gegen andere Merkmale im Serum transplantierte Patienten gefunden (Non-DSA). Jedoch können sowohl DSA als auch Non-DSA als präformierte Antikörper in Reaktion auf Schwangerschaften oder transfundierte Blutbestandteile entstehen. Die Kenntnis über präformierte Antikörper ist besonders im Fall von DSA wegen ihrer schädlichen Effekte von klinischer Bedeutung und erfordern eine ausführliche Anamnese über eventuelle Sensibilisierungen und eine Antikörperbestimmung vor der Transplantation.

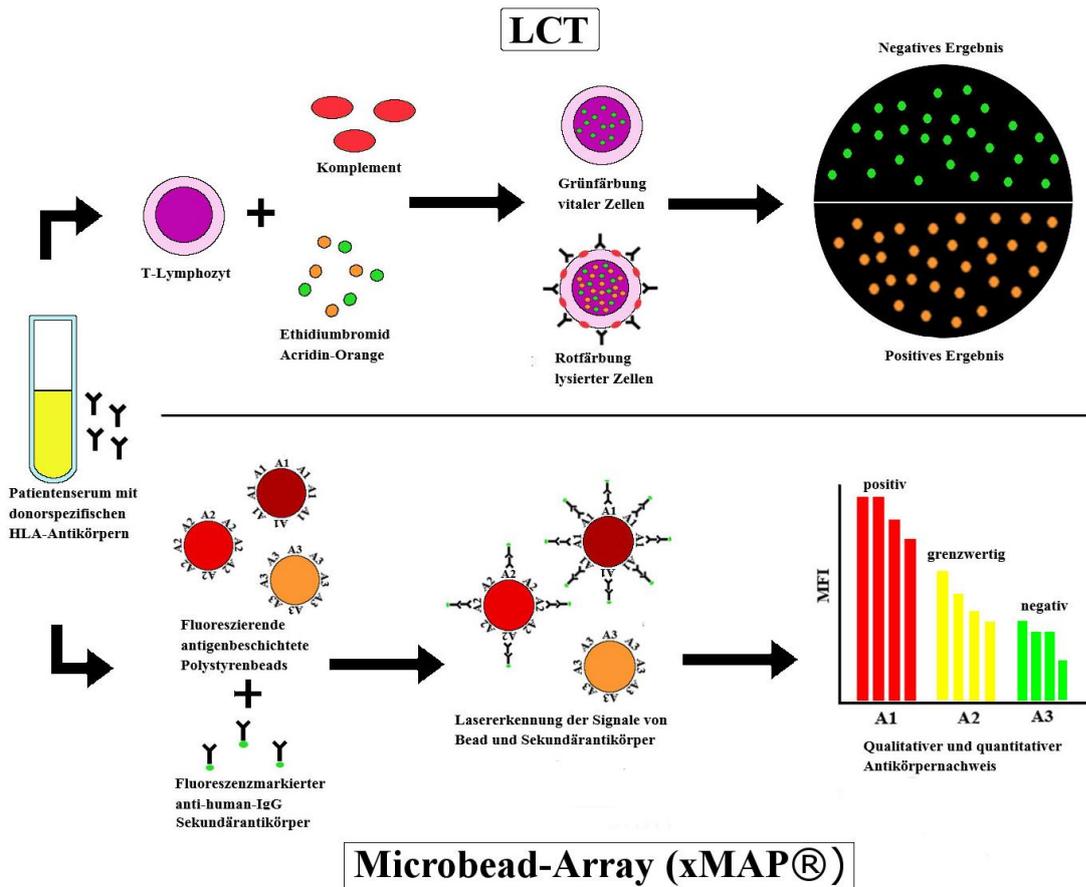
Während die negativen Auswirkungen von DSA als weitgehend anerkannt gelten, ist die klinische Relevanz von Non-DSA ungeklärt. Terasaki et al. konnten mithilfe von Epitopkartierungen zeigen, dass die Mehrheit der Non-DSA im Serum von Patienten nach Nierentransplantation (NTx) mit Aminosäuresequenzen reagieren, welche auf donorspezifischen, aber auch anderen HLA-Merkmalen vorkommen, sogenannten *shared epitopes*. Ebenso fanden sie auch bei der Präsenz von Non-DSA mehr C4d-Deposition und eine schlechtere Grafffunktion gegenüber antikörpernegativen Patienten [106]. Wie Tabelle 4 zu entnehmen ist, sprechen Ergebnisse anderer Studien allerdings eher gegen einen klinisch relevanten Einfluss auf die Organabstoßung.

### 1.4.2 Methoden zur Messung von HLA-Antikörpern

Unter den routinemäßig verwendeten Methoden zur HLA-Antikörperanalytik lassen sich zellbasierte von festphasebasierten Verfahren unterscheiden. Die wichtigsten zellbasierten Verfahren sind der Lymphozytotoxizitätstest (LCT) und die Durchflusszytometrie (engl. *flow cytometry*, FC), unter den festphasebasierten Methoden (engl. *solid phase assay*, SPA) sind der *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) und die *Microbead-Arrays* (*xMAP*®-Technologie, Luminex®) die wichtigsten Vertreter. Seit seiner Entwicklung im Jahre 1964 durch Terasaki et al. gehört der LCT zu den Standardmethoden der HLA-Antikörperdiagnostik, dessen Validität und klinische Relevanz hinreichend belegt wurden.

## 1.4 HLA-Antikörpermonitoring nach Herztransplantation

Durch die Einführung neuer, festphasebasierter Verfahren wird die Rolle von HLA-Antikörpern neu evaluiert. Wegen ihrer hohen Sensitivität werden mit Verfahren wie der xMAP®-Technologie deutlich mehr Antikörper detektiert als mit dem LCT. Neben der Frage nach der klinischen und pathophysiologischen Bedeutung von Alloantikörpern nach Transplantation treten deshalb zunehmend auch methodische Fragen in den Vordergrund. Im Folgenden werden die methodischen Prinzipien des LCT und des Luminex genauer erörtert und in Abbildung 13 schematisch dargestellt.



**Abbildung 13 Schematische Darstellung der Funktionsweisen von LCT und Microbead-Array (Luminex®) nach [107, 131]**

Abbildungsschema mit freundlicher Genehmigung von Wai Hon Lim, MD, University of Western Australia, Perth, Australien. Bildelemente mit freundlicher Genehmigung von Andreas Strubel, Diamex GmbH, Heidelberg.

HLA = Humanes Leukozytenantigen (engl. human leukocyte antigen), IgG = Immunglobulin G, LCT = Lymphozytotoxizitätstest (engl. lymphocytotoxicity test), MFI = Mittlere Fluoreszenzintensität (engl. mean fluorescence intensity)

**Lymphozytotoxizitätstest** Das zentrale Prinzip des LCT ist die Lyse von Testzellen durch komplementaktivierende Antikörper. Bei der Analyse auf HLA-Antikörper werden Testlymphozyten mit bekanntem HLA-Phänotyp mit Patientenserum inkubiert, welches vorher hitzeinaktiviert wurde. Die Inaktivierung des Serums hat die Denaturierung der Komplementfaktoren zur Folge. Im nächsten Schritt wird eine genormte Menge Kaninchenkomplement hinzugegeben und über einen definierten Zeitraum mit der Probe inkubiert. Enthält das zu untersuchende Serum spezifische Antikörper, die gegen HLA-Merkmale der Testzellen gerichtet sind und das Komplementsystem aktivieren können, kommt es zur Zelllyse. Im nächsten Schritt erfolgt eine Vitalitätsfärbung mit einem Gemisch aus Acridin-Orange und Ethidiumbromid, welches vitale Zellen grün und lysierte Zellen rot anfärbt. Das Ausmaß der Zytotoxizität eines Serums wird anhand des Verhältnisses von toten zu vitalen Zellen quantifiziert.

Der LCT weist somit nur komplementabhängige Immunglobuline nach, während komplementunabhängige HLA-Antikörper keinen Einfluss auf das Ergebnis haben. In Flüssigphaseverfahren werden aufgrund des Unterbleibens von Waschschritten auch Reaktionen durch zytotoxische Non-HLA-Antikörper erfasst. Auch die Gabe therapeutischer Antikörper kann zu falsch positiven Ergebnissen führen. Da T-Lymphozyten mit 70-80 % die größte Fraktion innerhalb der PBMC stellen und diese hauptsächlich HLA-Moleküle der Klasse I exprimieren, erlaubt der LCT im Wesentlichen die Suche nach HLA-Klasse I-Antikörpern. Sollen Seren auf HLA-Klasse II-Antikörper analysiert werden, muss vorher eine B-Zellselektion durchgeführt werden. Durch die Zugabe von Dithiothreitol (DTT) kann eine weitestgehend selektive Denaturierung von IgM erreicht werden (DTT-Modifikation). Reagiert ein Serum nach DTT-Zugabe immer noch positiv, ist dies in der Regel auf das Vorliegen von IgG-Antikörpern zurückzuführen. Angaben zur detaillierten Spezifität eines Antikörpers sind nur durch die Analyse von Reaktionsmustern eines Serums mit einer ausreichend großen Zahl unterschiedlicher Testlymphozyten möglich [38]. In Tabelle 3 sind methodische Vor- und Nachteile des LCT summiert.

**Microbead-Array** Die *xMAP*®-Technologie (Luminex®) basiert auf sogenannten „Beads“ oder „Mikrosphären“, welche als Festphase für Nachweisreaktionen für verschiedene biologische Analyte dienen. Die etwa 5 µm großen, aus Polystyrol bestehenden Beads enthalten unterschiedliche Konzentrationen eines rot und eines infrarot fluoreszierenden Farbstoffes, welche folglich in unterschiedlicher Intensität Licht in deren beiden Wellenlängenbereichen emittieren.

Durch diese Intensitätsunterschiede lassen sich die Mikrosphären spektralanalytisch in verschiedene Populationen gruppieren. Je nach Fragestellung werden den Beadpopulationen bestimmte HLA-Antigene oder Kombinationen von HLA-Antigenen zugeordnet und durch kovalente Bindung an deren Oberfläche fixiert. Enthält das zu analysierende Serum einen spezifischen Antikörper, kann dieser nach der Bindung an die Oberfläche der Mikropartikel durch einen grün fluoreszierenden anti-IgG-Konjugatantikörper markiert werden. Ähnlich einem Durchflusszytometer werden die Beads als Nächstes von der Mikrotiterplatte durch in eine Messküvette geleitet und verschiedenen Lasersystemen zugeführt, welche Beads und Konjugatantikörper zur Lichtemission anregen. Eine spezielle *Sheath-Fluid* garantiert aufgrund ihrer hydrodynamischen Eigenschaften die zentrale Fokussierung jedes Beads in der Küvette. Ausgestattet mit entsprechenden Detektoren kann das Gerät den jeweiligen fokussierten Bead durch sein charakterisierendes Lichtsignal einer Population zuordnen und im gleichen Schritt die Intensität der Grünfluoreszenz des Sekundärantikörpers messen, welche mit der Konzentration des gebundenen HLA-Antikörpers korreliert. Somit erfolgt simultan der qualitative und semiquantitative Nachweis eventueller Antikörper. Anhand der Intensität, mit der Positiv- und Negativkontrollbeads fluoreszieren, wird die jeweilige Testreihe „geeicht“, und nach einer Mittelwertbildung kann für jeden unterschiedlichen Bead eine mittlere Fluoreszenzintensität (*engl. Mean Fluorescence Intensity, MFI*) angegeben werden. Mit diesem ist eine semiquantitative Titerangabe möglich, jedoch ist die Luminex®-Technik als primär qualitatives Verfahren lizenziert [38, 62].

Der Unterschied zwischen den verschiedenen Assays, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, begründet sich in der Art der gebundenen HLA-Merkmale: Das Screening-Assay (*SPA-Screen/ LabScreen® Mixed, One Lambda, Inc.*) besteht aus Beads, welche mit großen Mengen aufgereinigter, nativer HLA-Moleküle entweder der Klasse I, Klasse II oder MICA-Antigen beschichtet sind. Somit lassen sich eventuelle Antikörper gegen HLA-Klasse I, HLA-Klasse II und MICA differenzieren und für jede Klasse ein MFI-Wert ermitteln. Das *Panel Reactive Antibodies/ LABScreen® PRA*-Assay

#### 1.4 HLA-Antikörpermonitoring nach Herztransplantation

besteht aus 55 unterschiedlichen Beads, die mit aufgereinigtem, nativem HLA-Antigen von 55 verschiedenen humanen Zelllinien konjugiert sind und deren Antigenkomposition menschlichen Zellen nachempfunden ist. Demnach tragen Beads aus dem HLA-Klasse I-Assay zwei Merkmale für je HLA-A, -B und -C. Beads des HLA-Klasse II-Assays tragen zwei HLA-DR- und zwei HLA-DQ-Merkmale. Neben der genauen Spezifität eventueller Antikörper lassen sich MFI-Werte und ein virtueller PRA-Wert (vPRA) angeben. Das *Single Antigen/ LABScreen® SA*-Assay zeichnet sich durch Beads aus, die jeweils nur ein HLA-Merkmal repräsentieren und deren HLA-Merkmale in denaturierter Form auf den Beads vorliegt. Dies ermöglicht besonders bei Seren hochimmunisierter Patienten eine hochauflösende Diagnostik von Antikörperspezifitäten bis hin zur Angabe von Allel- und Epitopspezifität. Auch im SA-Assay werden MFI-Werte für die verschiedenen Beads und ein vPRA-Wert angegeben.

Die *Microbead-Array xMAP®*-Technik ist das sensitivste Verfahren unter den HLA-Antikörper-Assays. Angesichts positiver Ergebnisse unter gesunden, nichtimmunisierten männlichen Blutspendern in bis zu 42 % wird die klinische Relevanz dieser sensitiven Methode allerdings kritisch bewertet [108]. Untersuchungen von 534 NTx-Wartelistenpatienten durch Süsal et al. zeigten, dass ein HLA-Antikörpernachweis mit dem LCT in 5 %, mit dem ELISA in 14 % und mit dem Luminex® SA-Assay in 81% erbracht werden kann [109]. Eine mögliche Ursache könnten den Autoren zufolge Kreuzreaktivitäten anderer Antikörper gegen die HLA-Antigene auf den Beads sein, was zu einer eingeschränkten Spezifität führt. Vorteilhaft sei auf der anderen Seite der hohe negative prädiktive Wert des Verfahrens. Da sich der im Luminex®-Assay verwendete Sekundärantikörper gegen den Fc-Teil aller IgG-Subtypen richtet, erzeugen gebundene IgM-Antikörper kein Signal und werden somit im Gegensatz zum LCT nicht gemessen. Falsch negative Ergebnisse allerdings können unter Umständen von IgM-Antikörpern verursacht werden [110]. Die Differenzierung in komplementbindende und nichtkomplementbindende Antikörper kann durch spezielle kommerziell erhältliche Modifikationen erfolgen. Als Festphasenverfahren, welches lediglich mit HLA-Merkmalen beschichtet ist, werden non-HLA-Antikörper im Zuge der Waschschriffe entfernt und entgehen der Detektion.

<b>LCT</b>	<b>Microbead-Array (Luminex®)</b>
<p><b>Nachgewiesene Antikörper:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• komplementaktivierende Antikörper (IgG1/3, IgM, IgA)</li> </ul> <p><b>Vorteile:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hohe Vorhersagekraft des <i>Crossmatchs</i></li> <li>• Langjährige Erfahrung, gute Validierung</li> <li>• Intakte HLA-Moleküle mit nativer Konformation</li> </ul> <p><b>Nachteile:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Niedrige Sensitivität, falsch negative Ergebnisse</li> <li>• Falsch positive Ergebnisse durch Auto-, Non-HLA-, infektionsassoziierte und therapeutische Antikörper</li> <li>• große Zahl vitaler Lymphozyten nötig</li> <li>• Kontamination durch andere Zellen</li> <li>• %PRA und Analyse der Spezifität von Zusammensetzung des Panels abhängig</li> <li>• Standardisierung schwierig</li> <li>• Weitere Aussagen erst durch Modifikation</li> </ul>	<p><b>Nachgewiesene Antikörper:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Komplementabhängige und – unabhängige IgG-Antikörper (IgG1/2/3/4)</li> <li>• Anti-MICA-Antikörper</li> </ul> <p><b>Vorteile:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hohe Sensitivität, hoher negativer Prädiktwert</li> <li>• Anti-Klasse I- und Anti-Klasse II-Analyse</li> <li>• Hochauflösende Analyse der Spezifität</li> <li>• Auch seltene HLA-Merkmale repräsentiert</li> <li>• Semiquantitative Angaben möglich (MFI-Wert)</li> </ul> <p><b>Nachteile:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Geringe Spezifität</li> <li>• Interferenz durch Auto-, infektassoziierte, IgM-, therapeutische Antikörper</li> <li>• Variierende Proteindichte auf einzelnen Beads durch herstellereigentliche Unterschiede</li> <li>• Prozoneneffekt (falsch negative Ergebnisse trotz hochtitriger Seren)</li> <li>• Beschichtung der Beads mit u.a. denaturiertem HLA-Protein mit unnatürlicher Konformation</li> <li>• Detektion klinisch irrelevanter Antikörper</li> <li>• Vorhersagekraft und Relevanz wenig validiert</li> <li>• Geringe Standardisierung, keine gängigen Cutoffs</li> <li>• Weitere Aussagen erst durch Modifikation</li> </ul>

**Tabelle 3 Methodische Eigenschaften des LCT und des Luminex in der HLA-Antikörperdiagnostik [38, 62]**

HLA = *Humanes Leukozytenantigen* (engl. *human leukocyte antigen*), IgA = *Immunglobulin A*, IgG = *Immunglobulin G*, IgM = *Immunglobulin M*, MFI = *Mittlere Fluoreszenzintensität* (engl. *mean fluorescence intensity*), MICA = engl. *MHC class I associated antigen*, PRA = engl. *panel reactive antibodies*

### 1.4.3 Die Studienlage zur Beziehung zwischen HLA-Antikörpern und der CAV

Die wissenschaftliche Literatur zur Bedeutung von HLA-Antikörpern im Rahmen der chronischen kardialen Abstoßung bedarf aufgrund von mehreren Faktoren einer differenzierten Interpretation. Neben den bereits in Kapitel 1.3.3 besprochenen Besonderheiten in der Diagnostik der CAV müssen auch für die Antikörperdiagnostik methodenspezifische und andere Umstände berücksichtigt werden.

Die bereits behandelten Unterschiede zwischen den jeweiligen Nachweismethoden führen zu teilweise deutlich unterschiedlichen Prävalenzen von HLA-Antikörpern. Zudem ist die verglichen mit dem LCT noch relativ neue Luminex®-Technologie weniger gut validiert, sodass häufig unterschiedliche Cutoffs verwendet werden und ein einheitlicher Wert nicht etabliert ist. Dies gilt sowohl für die MFI-Werte des Screeningassays, als auch für die MFI-Werte einzelner spezifischer Antikörper in den beiden Assays zur Antikörperdifferenzierung [62, 109, 111]. Außerdem wurde das Luminex®-Verfahren, trotz der Möglichkeit zur Angabe semiquantitativer MFI-Werte, *per se* nur als qualitatives Verfahren lizenziert [62]. Die nicht in den Allokationsrichtlinien (s. Kapitel 1.2.2) geforderte Berücksichtigung der HLA-Kompatibilität bedingt zudem, dass bei einigen Studien nicht für alle Spender-Empfänger-Paarungen vollständige HLA-Typisierungen vorhanden sind, was die Analyse auf Donorspezifitäten limitiert.

In Tabelle 4 sind mehrere Studien zusammengefasst, welche Zusammenhänge von HLA-Antikörpern mit der AMR und der CAV mittels verschiedener Methoden untersucht haben. Nicht nur die Assoziation zwischen HLA-Antikörpern, der AMR und der CAV, sondern auch die Relevanz des Isotyps, der Komplementabhängigkeit und der Spezifität werden unterschiedlich bewertet. Aufgrund des geringen Anteils von pädiatrischen Herztransplantationen wird die Untersuchung dieses Kollektivs durch geringe Fallzahlen kompliziert. Während sich bei erwachsenen Patienten eine mögliche Rolle von HLA-Antikörpern in Zusammenhang mit der CAV abzeichnet, wird die Studienlage bei pädiatrischen Patienten in der Literatur als unzureichend bezeichnet [112-114]. Aus der aktuellen Studienlage geht weiterhin hervor, dass kein Konsens über die prognostische Bedeutung, die Diagnostik und das klinische Management von HLA-Antikörpern existiert.

Autoren, Jahr	Kollektiv	Verwendetes Assay	Inzidenz/Spezifität der HLA-Antikörper	Ergebnisse und assoziierte Endpunkte
Ho, Vasilescu et al., 2011 [112]	n = 108 Alter: 9,4±10,9 Jahre	LCT MBA	Klasse I: LCT 15 %, MBA 28 % Klasse II: LCT 28 %, MBA 38 %	- LCT: HLA-Antikörper Klasse I → AMR ↑, Überleben ↓ - MBA: HLA-Antikörper Klasse I&II → AMR ↑, Überleben ↔ - Protektiver Effekt nichtkomplementaktivierender Antikörper
Tambur et al. 2005 [115]	n = 71 Alter: 46,6±12,2 Jahre	FC	Klasse I: 25,4 % Klasse II: 15,5 %	- HLA-Antikörper Klasse I&II → ACR ↑ - HLA-Antikörper Klasse II → CAV ↑ (per IVUS), Mortalität ↑
Statsny et al. 2007 [116]	n = 113 Alter: 53,8±11,9 Jahre	MBA	Erwachsene: Klasse I: 19,5 % Klasse II: 18,6 %	- DSA Klasse I&II → ACR ↑, Überleben ↑ - Non-DSA → Überleben ↔, ACR ↔, CAV ↔
	n = 31 Alter: 6,8±6,5 Jahre		Kinder: DSA: 29 %	
Zhang et al. 2011 [117]	n = 168 Alter: 54±2,1	MBA	DSA Klasse I: 16,6 % DSA Klasse II: 5,9 %	- DSA Klasse I&II → AMR ↑, CAV ↑ - Non-DSA → AMR ↔
Kaczmarek et al. 2008 [118]	n = 213 Alter: 48,2±13 Jahre	ELISA MBA	DSA Klasse I: 5,2 % DSA Klasse II: 8,9 %	- DSA → CAV ↑
Hosenpud et al. 1995 [76]	n = 52 Alter: 50±4 Jahre	FC	DSA: 15,3 %	- DSA → CAV ↔ - Zelluläre Immunität als Auslöser der CAV
Irving et al. 2011 [114]	n = 59 Alter: 10,4 (0,7-18,5) Jahre	MBA	DSA Klasse I: 1,6 % DSA Klasse II: 5,0 % Non-DSA: 25 %	- DSA Klasse II → CAV ↑ (n = 3) - DSA Klasse I → CAV ↔ (n = 1) - Non-DSA → CAV ↔
Topilsky et al. 2013 [119]	n = 51 Alter: 44,8-69,7 Jahre	MBA	DSA Klasse I: 7,8 % DSA Klasse II: 21,6 %	- Präformierte DSA Klasse II → CAV ↑
Molina et al. 2013 [120]	n = 109 Alter: 20-82 Jahre	MBA FC	DSA Klasse I: 22,9 % DSA Klasse II: 42,2 %	- DSA Klasse I → AMR ↑, Graftversagen ↑ - DSA Klasse II → AMR ↔, Graftversagen ↔, CAV ↑
Raess et al. 2013 [121]	n = 272 Alter: 43±13 Jahre	MBA	DSA Klasse I: 7,7 % DSA Klasse II: 4,4 % Non-DSA: 23,9 %	- präformierte DSA → CAV ↑ präformierte DSA nicht prädiktiv für Langzeitüberleben

**Tabelle 4 Studienlage zur Beziehung zwischen HLA-Antikörpern, der humoralen Abstoßung und der CAV**

ACR = Akute zelluläre Abstoßung (engl. acute cellular rejection), AMR = Antikörpervermittelte Abstoßung (engl. antibody mediated rejection), DSA = Donorspezifischer Antikörper, CAV = Koronare Transplantatvaskulopathie (engl. coronary allograft vasculopathy), ELISA = engl. enzyme linked immunosorbent assay, FC = Durchflusszytometrie (engl. flow cytometry), LCT = Lymphozytotoxizitätstest, MBA = engl. microbead assay

## 1.5 Ausgangssituation und Fragestellung

Wie in Kapitel 1.1 ausgeführt, sind die Verbesserungen der Überlebensraten nach Herztransplantation in den letzten Jahrzehnten vorwiegend auf eine Reduktion der Mortalität in der Frühphase zurückzuführen, während diese im Langzeitverlauf auf einem Niveau geblieben sind. Trotz beachtlicher Fortschritte der Transplantationsmedizin bleibt die Inzidenz der CAV unverändert hoch, und nach wie vor ist sie die wichtigste Mortalitätsursache im Langzeitverlauf nach HTx. Unspezifische klinische Symptome, die Ungenauigkeit nichtinvasiver Verfahren und die mit Risiken und methodischen Limitationen behaftete Koronarangiographie erschweren eine frühzeitige Diagnosestellung. Unverstanden ist außerdem, wie die CAV entsteht und welche Rolle der humoralen Immunantwort zukommt. HLA-Antikörper als Surrogatparameter der AMR werden in ihrer klinischen und ätiopathogenetischen Bedeutung kontrovers diskutiert. Einige Studien konnten zwar eine Assoziation zur CAV beobachten, allerdings ist ungewiss, ob eine kausale Beziehung vorliegt und ob sich aus dem Nachweis klinische Konsequenzen ergeben. Besonders bei pädiatrischen Patienten mangelt es mitunter aufgrund geringer Fallzahlen an Evidenz. Da sich sowohl Überlebensraten als auch Abstoßungsereignisse bei Kindern signifikant von denen bei Erwachsenen unterscheiden, wird vermutet, dass deren relativ unreifes Immunsystem durch frühen Kontakt mit Alloantigenen zur Toleranzentwicklung tendiert. Neben den herkömmlichen Antikörpernachweisverfahren existiert mit der Luminex®-Technologie seit einigen Jahren ein festphasebasiertes Verfahren, welches sich durch eine weitaus höhere Sensitivität als der LCT oder ELISA auszeichnet und weitaus mehr Antikörper nachweist. Allerdings sprechen viele Ärzte und Wissenschaftler diesen Antikörpern eine klinische Relevanz ab und sehen die herkömmlichen Methoden als bessere Indikatoren, Überdies haben sich noch keine standardisierten Cutoffs etabliert, und in vielen Studien fehlt es den im Luminex® nachgewiesenen Antikörpern an klinischem Korrelat. Durch diese Umstände kommt methodischen Fragestellungen bei der Antikörperdiagnostik nach Organtransplantationen eine größer werdende Bedeutung zu.

Vor diesem Hintergrund lauten die zentralen Fragestellungen der vorliegenden Arbeit:

- Gibt es einen Zusammenhang zwischen HLA-Antikörpern und der CAV nach pädiatrischer Herztransplantation?
- Wie fallen andere klinische und anamnestische Merkmale und Untersuchungsbefunde in Anwesenheit von HLA-Antikörpern und der CAV aus?
- Welchen potenziellen Stellenwert hat die Luminex®-Antikörperdiagnostik in der CAV-Diagnostik? Sind HLA-Antikörper ein geeigneter Biomarker für die CAV?
- Sind die Häufigkeiten von HLA-Antikörpern und der CAV vom Alter zum Zeitpunkt der Transplantation abhängig? Führt eine Transplantation im jungen Alter zu einem selteneren Auftreten von CAV und HLA-Antikörpern?

Neben der Beantwortung dieser Fragen soll diese Arbeit einen evidenzbasierten Beitrag zum Wissen über Epidemiologie und mögliche Risikofaktoren der CAV bei pädiatrischen Patienten leisten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studienprotokoll

#### 2.1.1 Probengewinnung und Präanalytik

Die folgenden Untersuchungen wurden per Votum durch die Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität (Aktenzeichen 181/13) genehmigt.

Im Rahmen der regelmäßigen Herztransplantationsnachsorge des Kinderherzzentrums Gießen wurde bei 98 Patienten Serum entnommen und zum routinemäßigen HLA-Antikörperscreening an das HLA-Labor des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin gesendet. Nach der Blutentnahme durch die behandelnden Ärztinnen und Ärzte des Kinderherzzentrums wurde das Probenmaterial anschließend mit einem entsprechenden Anforderungsbogen eingeschickt. Die präanalytische Behandlung und die Antikörperdiagnostik erfolgten unter Anleitung und Aufsicht von medizinisch-technischen Laborassistentinnen des HLA-Labors.

Die Antikörperanalytik und die Erhebung der klinischen Befunde liefen zeitlich versetzt ab, sodass keine Durchsicht von klinischen Vorbefunden stattfand. Nach dem Eingang im HLA-Labor erfolgte zunächst eine visuelle Kontrolle der Seren. Gemäß den allgemeinen Richtlinien des HLA-Labors mussten folgende präanalytische Kriterien erfüllt sein:

- Mindestmenge an Serum: 2 ml
- Keine makroskopisch sichtbare Hämolyse
- Keine makroskopisch sichtbare Hyperlipidämie

### 2.1.2 Studiendesign und Datenerhebung

Zur Beantwortung der in Kapitel 1.5 formulierten Fragestellungen erstellten wir die vorliegende Arbeit in Form einer korrelativen, retrospektiven Querschnittsstudie. Die Erhebung der Patientendaten erfolgte durch das Studium von Arztbriefen, Untersuchungsbefunden, Patientenakten und Verlaufsdokumentationen.

Als erster Endpunkt wurde der koronare Gefäßstatus bestimmt. Zu diesem Zweck erfolgte eine Durchsicht aller koronarangiographischen Befunde jedes Patienten. Diejenige Angiographie mit dem zeitlich engsten Bezug zur Serumentnahme, welche meist auch die aktuellste Untersuchung darstellte, definierte den koronaren Gefäßstatus. Patienten mit angiographisch blandem Befund wurden der Kontrollgruppe zugeteilt. Diejenigen Patienten, bei denen pathologische Veränderungen im Sinne einer CAV gefunden wurden, bildeten die Fallgruppe. Für alle Patienten in der Fallgruppe wurde weiterhin der Diagnosezeitpunkt der CAV festgehalten. Um mögliche Assoziationen auch auf ordinalskaliertem Niveau untersuchen zu können, wurde dem aktuellen Angiographiebefund ein Score zugewiesen. Patienten mit physiologischem Befund wurde der Score 0 zugewiesen, während Patienten mit angiographisch gesicherter CAV der Score 1 zugeordnet wurde. Patienten, bei denen es zusätzlich zu kardiovaskulären Komplikationen wie Stentimplantationen, Ballondilatationen, Myokardinfarkten, Retransplantationen oder zum Tod kam, erhielten den Score 2.

Den zweiten Endpunkt bildete der Antikörperstatus jedes Patienten. Dieser wurde durch die Untersuchung jedes Serums auf HLA-Antikörper mittels LCT und Luminex® bestimmt. Eine weitere Gruppierung in Antikörperfall- und -kontrollgruppen erfolgte je nach Positivität oder Negativität des Ergebnisses im LCT, im Luminex®-Antikörperscreening für HLA-Klasse I- und II- sowie MICA-Antikörper und weiterhin je nach Vorliegen oder Abwesenheit von donorspezifischen Antikörpern in der Luminex®-Antikörperdifferenzierung. Die Definitionen der jeweiligen Entscheidungsgrenzen erfolgen in Kapitel 2.2.

Neben diesen primären Endpunkten wurden weitere transplantationsrelevante Parameter erhoben:

- Stammdaten (Alter, Geschlecht, Zeitpunkt der Transplantation)
- HLA-Typisierung von Spender und Empfänger (soweit vorhanden)
- Stattgehabte kardiovaskuläre Komplikationen wie Myokardinfarkte, revaskularisierende Therapie, Retransplantationen oder Tod des Patienten
- Histopathologische Untersuchungsergebnisse jeder im Verlauf entnommenen Biopsie für jeden Patient und Erfassen von:
  - ACR, definiert als das Vorliegen histopathologischer Zeichen im Sinne der Grade 1R, 2R oder 3R entsprechend der in Tabelle 1 genannten Klassifikation
  - Dem immunpathologischen Nachweis von kapillären C4d-Ablagerungen
- Ergebnisse aller eventuellen im Verlauf durchgeführten kardialen MRT-Untersuchungen. Lagen hier Hinweise auf eine gestörte Perfusion der herzversorgenden Gefäße oder funktionelle Einschränkungen des Transplantats vor, wurde der MRT-Befund als pathologisch definiert.
- Ergebnisse von eventuellen Messungen des linksventrikulären enddiastolischen Drucks (engl. *left ventricular end diastolic pressure*, LVEDP) als Ausdruck einer restriktiven Hämodynamik. Werte bis einschließlich 12 mmHg wurden dabei als physiologisch angesehen, Werte von 13 mmHg und mehr als pathologisch.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Vorbereitung und Lagerung der Blutproben

Es erfolgte eine zehnmünütige Zentrifugation bei 1865 g, um das Serum von den anderen Blutbestandteilen zu separieren. Nach der Zentrifugation wurde dieses mit einer Pasteurpipette aspiriert, in Eppendorfgefäße umgefüllt und mit einer Protokollnummer zur internen Katalogisierung versehen. Danach wurden die Seren direkt den Testassays zugeführt oder bis zur Verwendung bei -30 °C eingefroren.

### 2.2.2 LCT

**Erstellen der Zellpanels** Der Konzeption der Panels und dem Beimpfen der Terasakiplatten mit den Seren ging eine Prüfung aller zu testenden Patienten auf eventuell bereits gesicherte Anti-HLA-Antikörper in den Vorbefunden des HLA-Labors voran. Patienten, die zu irgendeinem Zeitpunkt mit LCT- oder ELISA-Befunden mit PRA-Indices größer als 5 % auffielen, wurden an das Ende des Panels gesetzt und von der vorausgehenden und der darauffolgenden Serumprobe durch eine Negativkontrolle getrennt, um das Risiko falsch positiver Ergebnisse durch Kontamination der benachbarten Wells zu minimieren. Nach dem Erstellen der Reihenfolge der Seren auf den Terasakiplatten, die bis auf die oben genannten Kriterien nach der aufsteigenden, durch das HLA-Labor vergebenen Protokollnummer geschah, wurden die Seren bei Raumtemperatur aufgetaut und für 30 Minuten einer Temperatur von 56 °C ausgesetzt. Diese Hitzeinaktivierung dient der Denaturierung der Komplementfaktoren des Serums, welche nötig ist, um die Konzentration und die Reaktionszeit des Komplements durch spätere Zugabe genormter Mengen durch den Untersucher möglichst standardisiert zu gestalten. Das Pipettieren der Seren auf die Terasakiplatten erfolgte durch den Automatic-Seradot® der Firma Biotest, welcher 8 µl Paraffinöl und 1 µl Serum entsprechend der Panelliste in jedes Well gab. Insgesamt wurden pro Testpanel somit 130 Platten hergestellt, um diese gegen insgesamt 60 Spenderzellen, einmal mit und einmal ohne DTT, zu testen. Jeder der Platten wurde in Position 1 eine Positivkontrolle und in den Positionen 2 und 3 je eine Negativkontrolle vorgeschaltet.

Zusätzlich wurden alle verwendeten Spenderzellen vor der Auswertung auf separaten Kontrollplatten mit und ohne DTT-Inkubation gegen Positiv-, Negativ- und IgM-Kontrollseren getestet. Nach Herstellung der Platten wurden diese mit dem dazugehörigen Deckel verschlossen und wieder bei -30 °C im Gefrierschrank bis zum Tag der Testung im LCT gelagert.

**Isolation peripherer mononukleärer Zellen** Die für den LCT notwendigen Lymphozyten wurden aus Heparinblut gewonnen, welches von registrierten Blutspendern im Rahmen einer regulären Spende abgenommen wurde. Mit der von der Ethikkommission per Votum zugelassenen Einwilligung in die Spende (Aktenzeichen 05/2000) erklärten die Spender sich mit der Verwendung von Material für Diagnostik- und Forschungszwecke einverstanden. Vom Zeitpunkt der Entnahme durch Mitarbeiter der Blutbank befanden sich die Blutproben jederzeit bei Raumtemperatur und wurden stets noch am selben Tag bearbeitet. Konnten die isolierten Lymphozyten nicht am selben Tag der Isolation eingesetzt werden, wurden sie in Terasaki-Medium im Kühlschrank für den darauffolgenden Tag bei 2-8 °C gelagert. Die Zellisolation erfolgte nach dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation, bei der sich das Heparinvollblut nach Zugabe von Ficoll-Zuckerlösung abhängig vom spezifischen Gewicht der einzelnen Komponenten in verschiedene Phasen auf trennt. Mit einem spezifischen Gewicht von 1,077 g/ml führt der Ficoll-Gradient zu einer Isolation von peripheren mononukleären Zellen (Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, Mastzellen, Dendritische Zellen) welche sich in Form eines weißen Schleiers, dem sogenannten *buffy-coat*, zwischen der Ficollphase und der Plasmaphase ansammeln. Erythrozyten und Granulozyten bilden wegen ihres größeren spezifischen Gewichts das Sediment, die Thrombozyten finden sich in der Plasmaphase oberhalb des *buffy-coat* wieder.

Zuerst erfolgte das Befüllen eines Polyröhrchens mit 5 ml Ficoll-Lösung, welche in einem nächsten Schritt vorsichtig per Pasteurpipette mit 5 ml Heparinblut überschichtet wurde. Dem schloss sich ein erster Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 1865 g an. Der sich hierbei bildende *buffy-coat* wurde dann vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt und in ein zweites Polyröhrchen überführt. Nach Auffüllen des Polyröhrchens mit RPMI-Medium erfolgte ein zweiter Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 180 g. Der Überstand wurde danach verworfen, das Zellsediment am Boden des Röhrchens gut aufgerüttelt und erneut mit RPMI aufgefüllt.

Die dritte und letzte Zentrifugation erfolgte für 5 Minuten bei 829 g. Nach erneutem Verwerfen des Überstands und Aufrütteln des Sediments erfolgte ein schrittweises Titrieren von RPMI zur Einstellung der Zellkonzentration auf 2000-4000/μl unter visueller Kontrolle.

**Durchführung** Nach der Zellisolation wurde die entsprechende Anzahl an Terasakiplatten mit dem enthaltenen Patientenserum aufgetaut und mit der Protokollnummer des Zellspenders versehen. Weiterhin erfolgte bei allen verwendeten Zellen eine Testung mit positiven, negativen und IgM-positiven Kontrollseren, weshalb an jedem Tag separate geölte Terasakiplatten mit 1 μl der entsprechenden Kontrollen beimpft, beschriftet und im Weiteren mitgeführt wurden. Die Leukozytensuspensionen wurden nun mit einer Hamiltonpipette zu je 1 μl meanderförmig in die Wells der Terasakiplatten pipettiert. Diesem Schritt schloss sich eine dreißigminütige Inkubation bei Raumtemperatur an. Währenddessen wurde die benötigte Menge an lyophilisiertem Kaninchenkomplement in einer den Herstellerangaben entsprechenden Menge *Aqua dest.* aufgelöst. Nach Ablauf dieser ersten Inkubationszeit wurden 6 μl Komplement je Well hinzugefügt. Es erfolgte ein zweiter Inkubationsschritt für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Nach der darauffolgenden Färbung mit je 6 μl Fluoroquencht<sup>®</sup> pro Well und einer weiteren Inkubation von etwa 15 Minuten im Dunkeln konnten die Platten ausgelesen werden.

**DTT-Modifikation** Für die DTT-Modifikation wurden jeder der fertigen Leukozytensuspensionen 300 μl entnommen und in Eppendorfgefäße überführt, welche einer weiteren Zentrifugation unterzogen wurden. Nach Abziehen von 280 μl Überstand erreichte man durch Zugabe von 280 μl 0,01-molarem DTT und anschließendes Aufrütteln eine Suspension mit ähnlicher Zellkonzentration. Analog zum Test ohne DTT folgten das meanderförmige Beimpfen der Platten mit Testzellen und eine dreißigminütige Inkubation. Danach wurden die DTT enthaltenden Platten mit 1 μl L-Cystin beimpft, um zu verhindern, dass auch IgG-Antikörper in Struktur und Funktion gestört werden. Nach der Zugabe von L-Cystin erfolgte die weitere Bearbeitung der Platten in gleicher Weise.

**Auswertung** Die Auswertung der Reaktionen und die anschließende Spezifitäts-analyse der Seren erfolgten an einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Leitz, betrieben mit der *LambdaScan*®-Software der Firma *OneLambdaInc*® durchgeführt. Der Untersucher erkennt ein positives Ergebnis anhand der roten Färbung der lysierten Zellen und beurteilt das prozentuale Verhältnis von toten zu grün gefärbten vitalen Zellen. Dieses wird in Form eines Scores (s. Tabelle 5) nach Schema der *American Society for Histocompatibility & Immunogenetics* in das Eingabegerät übertragen.

<b>Letalität [%]</b>	<b>Score</b>	<b>Interpretation</b>
0-10	1	negativ
11-20	2	fraglich negativ
21-50	4	schwach positiv
51-80	6	positiv
81-100	8	stark positiv

**Tabelle 5 Schema zur Bewertung der Reaktivität eines Serums mit Testzellen im LCT nach [7]**

Der Anteil der als positiv bewerteten Reaktionen eines Serums mit den insgesamt 60 Spenderlymphozyten des Panels wird konventionell in PRA [%] (*percentage of panel reactive antibodies*) ausgedrückt. Üblicherweise wird ein Serum mit einer Panelreaktivität > 5 % als positiv bezeichnet. Patienten, deren Serum eine Panelreaktivität > 50 % ausweist, werden als hochimmunisiert bezeichnet. Die Merkmalsverteilung des Panels wurde so gewählt, dass sie derjenigen der Normalbevölkerung entspricht. Somit entspricht der PRA-Wert der Wahrscheinlichkeit eines positiven *Crossmatchs* mit einem zufällig ausgewählten Spender. Durch eine Betrachtung der HLA-Merkmale der Zellen, mit denen das Serum positiv reagiert, lassen sich Hypothesen über die Spezifität der enthaltenen Antikörper aufstellen. Der Computer errechnet mit dem  $\chi^2$ -Test die Irrtumswahrscheinlichkeit für die Annahme einer bestimmten Spezifität eines Serums. Ab Werten von  $\chi^2 \geq 3,84$  ist von einem spezifischen Antikörper auszugehen. Gängig ist die zusätzliche Angabe eines Korrelationskoeffizienten, für den Werte ab 0,85 eine gute Korrelation zwischen vorhandenem Antigen und angenommener Serumspezifität indizieren.

### 2.2.3 Luminex®

Die Seren aller 98 Patienten wurden gemäß dem Routinescreening-Algorithmus mit dem *LABScreen® Mixed*-Screeningtest untersucht. Seren, die ein positives Ergebnis zeigten, wurden einer weiteren Antikörperdifferenzierung im *LABScreen® PRA*- oder *Single Antigen*-Test in der jeweiligen Klasse zugeführt. Die im Folgenden besprochene Durchführung des Luminex®-Assays erfolgt für Screening und Antikörperdifferenzierung in gleicher Weise.

**Präanalytische Probenbehandlung** Zur Entfernung von restlichen Zellen oder Lipidmaterial erfolgte eine eingehende Zentrifugation bei für 5 Minuten bei 13628 g. und die Entnahme von 100 µl in ein neues Eppendorfgefäß. Es folgten eine weitere Zentrifugation in gleicher Weise und die Entnahme von 20 µl. Diese wurden einem vorher angefertigten Pipettierschema nach auf Costar-Platten überführt. Eine von *BMT One Lambda* mitgelieferte Negativkontrolle ist an die erste Position zu pipettieren und mit den Serumproben ansonsten gleich zu behandeln.

**Durchführung** Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Beads und des Sekundärantikörpers ist eine Lichtexposition während des ganzen Tests zu minimieren. Die in lichtundurchlässigen Behältern gelagerten Beadsuspensionen wurden gründlich auf dem Vortexer homogenisiert und 5 µl Beadsuspension je Well hinzugegeben. Durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit der Pipette wurden Serum und Beads nochmals durchmischt. Als Nächstes wurde die Platte mit einer Klebefolie verschlossen, abgedunkelt und für dreißig Minuten auf einer Rüttelplatte bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation wurde eine 1:10-Verdünnung des im Testkit enthaltenen Waschpuffers gemäß den Herstellerangaben mit *Aqua dest.* durchgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit und der anschließenden Zugabe von 150 µl verdünntem Waschpuffer fand eine fünfminütige Zentrifugation bei 300 g. statt. Die Zentrifugation führte zum Sedimentieren der Beads auf dem Boden der Wells und zu einem Waschpufferüberstand. Im Anschluss an die Zentrifugation wurde der überstehende Waschpuffer abgeschüttet, die Beads erneut mit dem Vortexer aufgerüttelt und mit 200 µl ein zweites Mal gewaschen, für fünf Minuten bei 300 g zentrifugiert und abgeschüttet. Zwischenzeitlich wurde der PE-konjugierte Sekundärantikörper mit einer entsprechenden Menge Waschpuffer in einem Polyröhrchen auf eine 1:100-Lösung verdünnt und direkt im Anschluss in einem dunklen Raum gelagert. Der zweiten Zentrifugation folgten dann die zügige Zugabe von 100 µl des Konjugatantikörpers, das

Abdecken der Platte mit der Schutzfolie und eine dreißigminütige Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur auf einem Rüttler. Es erfolgte ein dritter Zentrifugationsschritt, das darauffolgende Entfernen der Folie und das Ausschlagen und Abtupfen der Platte auf Zellstoff an. Im Anschluss wurden die am Boden der Platte aggregierten Beads wieder etwa eine Minute auf dem Vortexer aufgerüttelt. Anschließend wurden erneut 200 µl Pufferlösung je Well hinzugegeben, die Platte wieder mit der Klebefolie verschlossen und wie oben genannt abzentrifugiert. Nach dem Entfernen der Folie, dem Ausschlagen und Abtupfen über Zellstoff und dem Aufrütteln auf dem Vortexer wurden den Wells jeweils 80 µl Waschpuffer hinzugegeben. Mit dem Einführen der Platten in den dafür vorgesehenen Slot im Analysegerät waren die Platten somit fertig zur Messung.

**Messung** Die Messung erfolgte mit der Software *HLA Fusion 2.0*® der Firma *BMT One Lambda*. Nach einem definierten, automatischen Reinigungsprotokoll, dem Aufwärmen der Laser und der Eingabe von Chargennummer und den Positionen der Seren im Testansatz wird die Messung gestartet. Während des automatischen Messvorgangs erfolgte eine Kontrolle der Zahl und des Fluoreszenzsignals, um ein lichtbedingtes Ausbleichen oder versehentliches Entfernen der Beads durch die Waschschriffe, aber auch eine mangelhafte Kalibrierung auszuschließen.

**Auswertung** Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit der *HLA Fusion 2.0*®-Software von *BMT One Lambda*. Die Kalibrierung erfolgt anhand des in erster Position auf der Platte liegenden Negativkontrollserums und den Positivkontrollbeads des Testkits. Die Messung wurde zur Analyse freigegeben, wenn MFI-Werte der Positiv- und Negativkontrolle über beziehungsweise unter 500 lagen, und deren Quotient mindestens 2 betrug. Seren, deren Ergebnis im Screening jenseits des festgelegten Cutoffs von  $\geq 3,00$  war galten als positiv für die jeweilige HLA-Antigenklasse. Lagen die MFI-Werte der HLA-Klasse I- und/oder HLA-Klasse II-Antikörper eines Serums im Bereich von 3 - 20, so folgte eine weiterführende Differenzierung mit dem *LABScreen*® *PRA*-Test in der jeweiligen positiven Klasse. Bei MFI-Werten  $\geq 20$  wurde das Serum einer Differenzierung mit dem *LABScreen*® *Single Antigen*-Test zugeführt. Die vom Luminex® in *PRA*- und *Single Antigen*-Test ermittelten Spezifitäten wurden bei MFI-Werten  $\geq 1000$  als positiv angesehen. Der anschließende Abgleich der spezifischen Antikörper mit dem HLA-Phänotyp von Spender und Empfänger ermöglichte die Angabe von eventuellen donorspezifischen Antikörpern. Der Test auf Anti-MICA-Antikörper wurde bei MFI-Werten  $\geq 2$  als positiv angesehen.

## 2.3 Statistische Auswertung

Die Statistischen Analysen und graphischen Darstellungen wurden mit *GraphPad®* (Version 6.0 für Windows 7, *GraphPad Software Inc®*, La Jolla CA) durchgeführt. Deskriptive Statistiken und Abbildungen wurden teils mittels *Microsoft Excel®* (Version 2013 für Windows 7, *Microsoft Corporation®*, Redmond WA) erstellt. Kontingenzen zwischen nominalskalierten Merkmalsausprägungen wurden mit dem zweiseitigen *Fisher's Exact Test* berechnet. Bei drei oder mehr nominalskalierten Merkmalsausprägungen wurden Kontingenzen mit dem  $\chi^2$ -Test ermittelt. Zusammenhänge zwischen ordinal- oder kardinalskalierten Merkmalen wurden mittels Korrelationsanalyse nach Spearman berechnet. Varianzen zwischen kardinalskalierten Merkmalen von Fall- und Kontrollgruppen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test kalkuliert. Unterschiede in den MFI-Werten zwischen einzelnen Subgruppen wurden mittels einfaktorieller ANOVA und *Tukey's Multiple Comparison Test* untersucht. Die Berechnung der Testeigenschaften des Luminex® in der Detektion CAV-betroffener Patienten und die Cutoff-Analyse erfolgten mittels *Receiver Operating Characteristics*.

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  definierte ein statistisch signifikantes Ergebnis.

## 2.4 Reagenzien und Geräte

### Geräte

Zentrifuge Rotanta 460	Fa. Hettich, Mühlheim an der Ruhr
Zentrifuge Rotina 380	Fa. Hettich, Mühlheim an der Ruhr
Seradot	Fa. Biotest, Dreieich
Diavert-Mikroskop	Fa. Leitz, Wetzlar
Pipetten	Fa. Eppendorf, Hamburg
Luminex®-Gerät:	Bezogen über:
LabScan™ 200 Flow Analyzer	Fa. BMT One Lambda, Meerbusch

### Reagenzien

#### Zellisolierung

Ficoll (Art. 17-0840-03)	Fa. Pharmacia, Uppsala (Schweden)
RPMI ohne L-Glutamin ( Art. P04-17500)	Fa. PAN Biotech, Aidenbach

#### LCT

D.L. Dithiothreitol (Art. D5535)	Fa. Sigma-Aldrich, Buchs (Schweiz)
L-Cystin (Art. C8755)	Fa. Sigma-Aldrich, Buchs (Schweiz)
Fluoro Quench (Art. FQAE500)	Fa. One Lambda, Canoga Park (USA)
Positivkontrollserum LCT (W632)	Inhouse
IgM-Kontrollserum LCT	Eurotransplant-Labor, Leiden
Negativkontrollserum LCT	Inhouse AB-Serum (negativ getestet)
Aqua dest. (BRA50APO)	Fa. Braun, Melsungen
NaCl-Lösung 0,9%	Fa. Braun, Melsungen
Komplement (Art. 7023)	Fa. BAG Health Care, Lich

#### Luminex®

LabScreen Mixed (LSM12)	Fa. BMT One Lambda, Meerbusch
LabScreen PRA Class I (LS1PRA)	Fa. BMT One Lambda, Meerbusch
LabScreen PRA Class II (LS2PRA)	Fa. BMT One Lambda, Meerbusch
LabScreen Single Antigen Class I Combi (LS1A04S)	Fa. BMT One Lambda, Meerbusch
LabScreen Single Antigen Class II Group 1 (LS2A01S)	Fa. BMT One Lambda, Meerbusch
PE-conjugated Goat Anti-Human IgG (LS-AB2)	Fa. BMT One Lambda, Meerbusch
LS Negative Control Serum (LS-NC)	Fa. BMT One Lambda, Meerbusch
LiquiChip Calibration Bead Kit	Fa. Qiagen, Hilden
LiquiChip Calibration Control Kit	Fa. Qiagen, Hilden
LiquiChip System Fluid	Fa. Qiagen, Hilden
PBS (14200-067)	Fa. Thermo Fisher, München

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Basisdaten des Patientenkollektivs

Insgesamt 98 Patienten erfüllten die in Kapitel 2.1.1 genannten Einschlusskriterien. Die Basisdaten und demographischen Charakteristika gibt Tabelle 6 wieder.

<b>Merkmal</b>	<b>Wert</b>
<b>Stichprobenumfang (n)</b>	98
<b>Geschlechterverhältnis (m/w)</b>	62/36
<b>Alter bei Transplantation (Jahre)</b>	
Median; R; Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub>	0*; 0-21; 0-5
Mittelwert ± SD	3,541 ± 5,595
<b>Alter bei Serumentnahme (Jahre)</b>	
Median; R; Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub>	14; 0-31; 9-17
Mittelwert ± SD	13,27 ± 5,839
<b>Zeit von HTx bis Serumentnahme (Jahre)</b>	
Median; R; Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub>	9; 0-23; 4-15
Mittelwert ± SD	9,296 ± 6,268
<b>Grunderkrankung (n)</b>	
Singulärer Ventrikel	47
Kardiomyopathie	39
Andere	12

**Tabelle 6 Basisdaten des Patientenkollektivs**

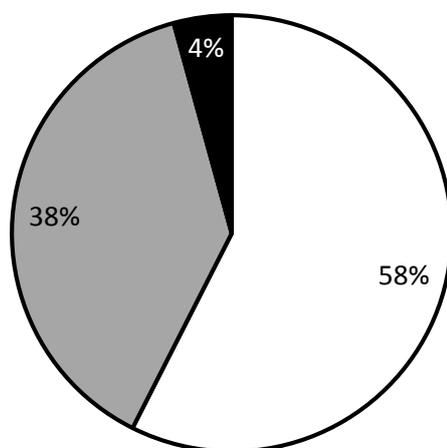
\*Medianes Alter bei Transplantation in Monaten: 10,5

R = Spannweite (engl. range), SD = Standardabweichung (engl. standard deviation)

Dem Formenkreis Singulärer Ventrikel wurden Patienten mit Hypoplastischem Linksherzsyndrom (n = 40), Pulmonalatresie (n = 3), *double inlet left ventricle* (n = 1) und Ventrikuläre Imbalance ohne nähere Angaben (n = 3) zugeordnet. Patienten mit zugrundeliegender Kardiomyopathie (n = 39) waren in 27 Fällen wegen der dilatativen, in 8 Fällen wegen der restriktiven und in einem Fall wegen der hypertrophen Form transplantiert worden. Drei weitere Patienten wurden wegen einer Kardiomyopathie ohne nähere Angaben transplantiert (n = 3). Unter „Andere“ wurden Patienten mit atrioventrikulärem Septumdefekt (n = 3), Transposition der großen Arterien (n = 3), Truncus arteriosus communis (n = 2), Bland-White-Garland-Syndrom (n = 2), Shone-Komplex (n = 1) und ein Patient mit einem Aortenvitium (n = 1) zusammengefasst.

### 3.2 Koronarangiographische Prävalenz der CAV

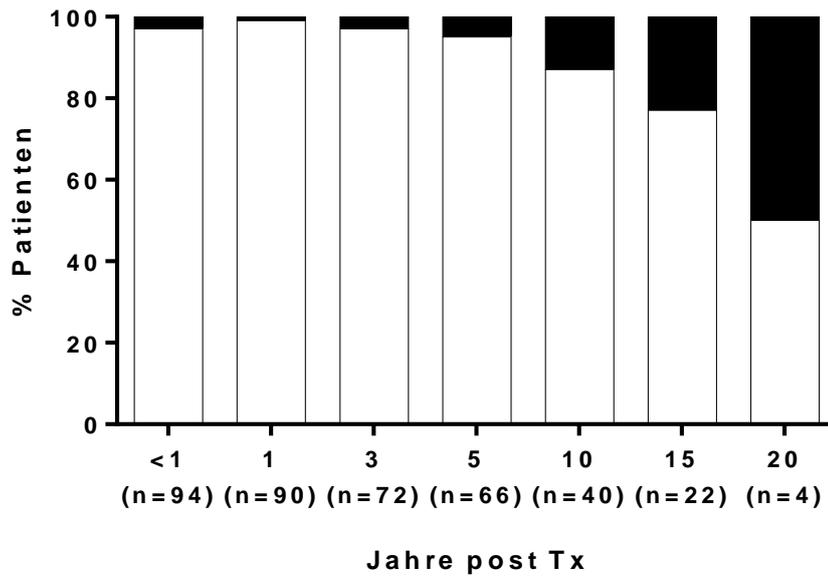
Zu insgesamt 94 von 98 Patienten lagen koronarangiographische Befunde vor, während bei vier Patienten wegen Malcompliance, Gefäßverschlüssen, Komorbidität oder anderer Kontraindikationen keine Koronarangiographie durchgeführt werden konnte. Die genannten Umstände waren weiterhin die führenden Ursachen, weshalb bei einem Teil der Patienten keine Verlaufskontrollen mehr durchgeführt werden konnten. Die Serumentnahme und die Koronarangiographie waren dabei in 77 % durch weniger als ein Jahr, in 89 % durch weniger als zwei Jahre von Serumentnahme getrennt. Insgesamt 54 der 94 vorliegenden Angiogramme (58 %) zeigten physiologische Koronargefäße, während bei 40 (42 %) pathologische Veränderungen im Sinne einer CAV vorlagen (s. Abbildung 14). Unter letzteren fanden sich vier Patienten mit einem komplizierten Verlauf (4 %). Davon benötigte ein Patient im Verlauf Koronargefäßstents, zwei Patienten wurden retransplantiert, und eine Patientin verstarb zehn Jahre *post transplantationem* im Alter von 23 Jahren an CAV-assoziiertem Graftversagen. Die Prävalenzen der CAV in Abhängigkeit der Dauer der Nachbeobachtung sind in Abbildung 15 dargestellt.



**Abbildung 14 Häufigkeit der CAV-Schweregrade im Studienkollektiv**

Weiß: Kontrollpatienten, Grau: CAV-Patienten, Schwarz: CAV-Patienten mit kompliziertem Verlauf

### 3.2 Koronarangiographische Prävalenz der CAV



**Abbildung 15 Prävalenz der CAV gruppiert nach der Dauer der Nachverfolgungszeit**

Die dargestellten Balken und Fallzahlen zu verschiedenen Zeitpunkten repräsentieren jene Patienten, für die mindestens die angegebene Nachbeobachtungszeit verfügbar war.

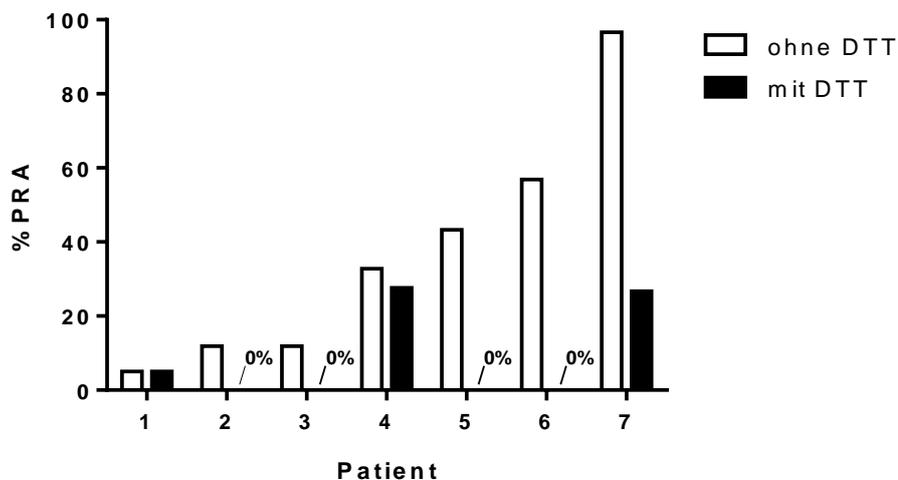
Schwarz: Patienten mit CAV-Manifestation innerhalb des jeweiligen Beobachtungszeitraums.

Weiß: Patienten ohne CAV-Manifestation innerhalb des jeweiligen Beobachtungszeitraums.

### 3.3 Ergebnisse der Antikörperdiagnostik

#### 3.3.1 LCT

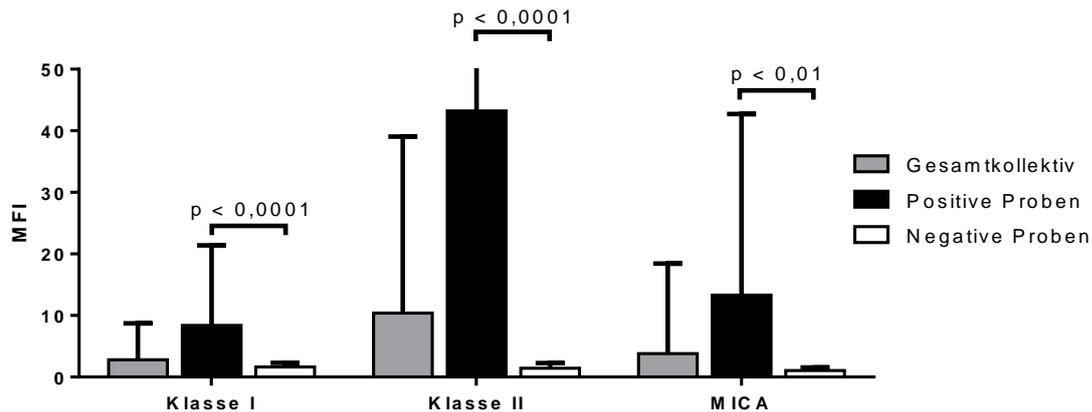
Der LCT fiel bei sieben von 98 Patientenseren mit einem PRA  $\geq 5\%$  positiv aus. Nach DTT-Inkubation zeigten noch drei Seren ein positives Ergebnis (s. Abbildung 16). DSA wurden mit dem LCT nicht nachgewiesen.



**Abbildung 16** Darstellung der Panelreaktivität für Patienten mit positivem LCT-Ergebnis vor und nach DTT-Inkubation

#### 3.3.2 Luminex

**Screening** Im Luminex-Antikörperscreening zeigten sich insgesamt 17 von 98 Patienten (17 %) positiv für HLA-Antikörper der Klasse I, während bei 21 Patienten (21 %) HLA-Klasse-II-Antikörper nachgewiesen wurden. Insgesamt neun dieser Patienten präsentierten Antikörper gegen beide HLA-Klassen (9 %). Anti-MICA-Antikörper lagen bei 22 Patienten vor. Abbildung 17 gibt eine graphische Darstellung der Unterschiede der MFI-Werte zwischen allen, positiven und negativen Patienten.



**Abbildung 17 Mittlere MFI-Werte plus Standardabweichung aller, positiver und negativer Patienten im Luminex®-Screening auf Anti-HLA-Klasse I-, Anti-HLA-Klasse II- und Anti-MICA-Antikörper**

HLA-Klasse I-Antikörper: Gesamtkollektiv (n = 98): 2,82 ± 5,91 MFI,

Positive Proben (n = 17): 8,41 ± 12,99 MFI, Negative Proben (n = 81): 1,64 ± 0,67 MFI

HLA-Klasse II-Antikörper: Gesamtkollektiv (n = 98): 10,39 ± 28,65 MFI,

Positive Proben (n = 21): 43,22 ± 50,39 MFI, Negative Proben (n = 77): 1,44 ± 0,85 MFI

MICA-Antikörper: Gesamtkollektiv (n = 98): 3,81 ± 14,63 MFI,

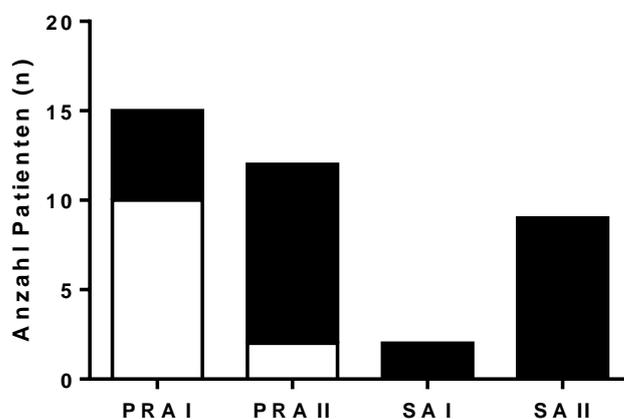
Positive Proben (n = 22): 13,32 ± 29,41 MFI, Negative Proben (n = 76): 1,05 ± 0,52 MFI

**Differenzierung** Insgesamt 15 der 17 Seren mit positivem HLA-Klasse I-Antikörper-screening zeigten einen MFI-Wert zwischen 3 und 20 und wurden gemäß des in Kapitel 2.2.3 ausgeführten Algorithmus mit dem *LabScreen® PRA*-Test weiter differenziert. Die anderen beiden wurden via *LabScreen® Single Antigen*-Test differenziert. Nach demselben Algorithmus erfolgte die Differenzierung der anti-HLA-Klasse II-positiven Seren in zwölf Fällen mit dem *PRA*- und in neun Fällen mit dem *Single Antigen*-Test. In Abbildung 18 sind die vPRA-Werte der jeweiligen Antikörper-differenzierungen in *PRA*- und *Single Antigen*-Test wiedergegeben. Die genaue Darstellung der Ergebnisse der untersuchten Patienten sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Von den 15 im *PRA*-Test auf HLA-Klasse I-Antikörperspezifitäten untersuchten Seren fielen zehn mit einem vPRA von 0 % negativ aus, während die bei den anderen fünf Seren gemessenen vPRA-Werte zwischen 4 % und 31 % zeigten. Eines der 15 Seren zeigte nichtdonorspezifische Antikörper mit einem MFI > 1000. Die beiden Seren, die im HLA-Antikörperscreening mit einem MFI > 20 auffielen und folgend mit dem *Single Antigen*-Test auf HLA-Klasse I-Antikörperspezifitäten untersucht wurden, zeigten mit vPRA-Werten von 43 % und 53 % ein positives Ergebnis. In beiden Seren fanden sich Antikörper gegen zahlreiche HLA-A- und HLA-B-Merkmale, in einem der beiden auch

gegen HLA-C. Beide demonstrierten DSA gegen HLA-A, eines der beiden wies weiterhin Antikörper gegen HLA-B-Merkmale des Donors auf.

Die zwölf im *PRA*-Test auf HLA-Klasse II-Antikörperspezifitäten untersuchten Seren zeigten in zwei Fällen einen vPRA von 0 %. Die vPRA-Werte der zehn positiven Seren lagen zwischen 3 und 51 %. Bei zwei Patienten, welche Antikörper gegen HLA-DR-Antigene aufwiesen und weiteren zwei Patienten mit Antikörpern gegen HLA-DQ-Antigene verhinderte das Fehlen vollständiger Typisierungsbefunde die Analyse auf DSA. In zwei Seren wurden donorspezifische anti-HLA-DR- und anti-HLA-DQ-Antikörper festgestellt, in einem Serum isolierte donorspezifische anti-HLA-DR-Antikörper. Die HLA-Klasse II-Antikörperdifferenzierung mittels *Single Antigen*-Test wies in allen neun Fällen ein positives Ergebnis auf, mit vPRA-Werten von minimal 13 % bis maximal 58 %. In jedem Serum waren multiple anti-HLA-DQ-Spezifitäten enthalten, in sechs Fällen lagen gleichzeitig anti-HLA-DR-Antikörper vor. Aufgrund fehlender HLA-Typisierungen konnte in zwei Fällen keine Angabe über das Vorliegen von DSA gemacht werden. Alle weiteren Seren zeigten donorspezifische HLA-Klasse II-Antikörper, nämlich isolierte anti-HLA-DR-Antikörper in zwei Fällen, isolierte anti-HLA-DQ-Antikörper in zwei Fällen und Antikörper gegen beide HLA-Klasse II-Antigene in vier Fällen (s. Abbildung 18, Tabelle 7).



**Abbildung 18 vPRA-Werte der Antikörperdifferenzierung**

Weiß: vPRA = 0 %, Schwarz: vPRA > 0 %

### 3.3 Ergebnisse der Antikörperdiagnostik

Patient	MFI –Wert im HLA-Antikörperscreening		vPRA-Wert (%) im PRA- bzw. Single Antigen-Test		Non-DSA Antikörperspezifitäten	DSA Antikörperspezifitäten	CAV Score
	HLA-Klasse I	HLA-Klasse II	HLA-Klasse I	HLA-Klasse II			
1	3,66	5,4	0	0	-	-	0
2	4,13	1,18	0	-	-	-	0
3	4,07	5,64	0	29	-	-	0
4	3,21	2,62	4	-	-	-	0
5	3,32	0	15	-	-	-	0
6	1,65	4,38	-	3	-	-	0
7	3,3	3,45	0	0	-	-	1
8	3,82	1,93	0	-	-	-	1
9	50,42	94,65	43	26	9 anti-HLA-A; 25 anti-HLA-B; 3 anti-HLA-C 4 anti-HLA-DR; 1 anti-HLA-DQ	anti-HLA-A11,29 anti-HLA-DQ1	1
10	2,01	7,76	-	29	-	anti-HLA-DR7; anti-HLA-DQ7,8	1
11	2,35	55,68	-	23	6 anti-HLA-DR; 3 anti-HLA-DQ	anti-HLA-DR4	1
12	2,08	105,65	-	13	2 anti-HLA-DQ	anti-HLA-DR11; anti-HLA-DQ2	1
13	1,78	23,67	-	13	anti-HLA-DQ4	anti-HLA-DQ5,6	1
14	33,35	114,52	53	58	18 anti-HLA-A; 16 anti-HLA-B 8 anti-HLA-DR; 2 anti-HLA-DQ	anti-HLA-A1,3; anti-HLA-B57 anti-HLA-DR7; anti-HLA-DQ4,9	1
15	3,12	137,03	0	18	1 anti-HLA-DR; 2 anti-HLA-DQ	anti-HLA-DR15; anti-HLA-DQ6	2
16	7,35	93,11	24	47	3 anti-HLA-A; 2 anti-HLA-B 6 anti-HLA-DR; 2 anti-HLA-DQ	anti-HLA-DQ7	2
17	2,36	12,89	-	51	3 anti-HLA-DR; 2 anti-HLA-DQ	anti-HLA-DR4; anti-HLA-DQ2	2
18	2,08	3,75	-	6	-	anti-HLA-DR10	-
19	5,35	1,55	25	-	-	-	-
<b><u>Ohne vollständige HLA-Typisierung (n = 10)</u></b>							
20	3,12	2,43	0	-	-	-	0
21	3,93	2,51	0	-	-	-	0
22	3,46	0	0	-	-	-	0
23	0	72,87	-	22	anti-HLA-DQ2,4,7,8,9*	-	0
24	2,22	4,21	-	43	-	-	0
25	2,03	4,56	-	43	-	-	0
26	4,18	3,45	0	34	-	-	1
27	2,16	4,01	-	17	anti-HLA-DR103*	-	1
28	1,08	10,04	-	6	anti-HLA-DR103*	-	1
29	3,21	140,88	31	23	anti-HLA-DQ2,4,5,6,7,8,9*	-	1

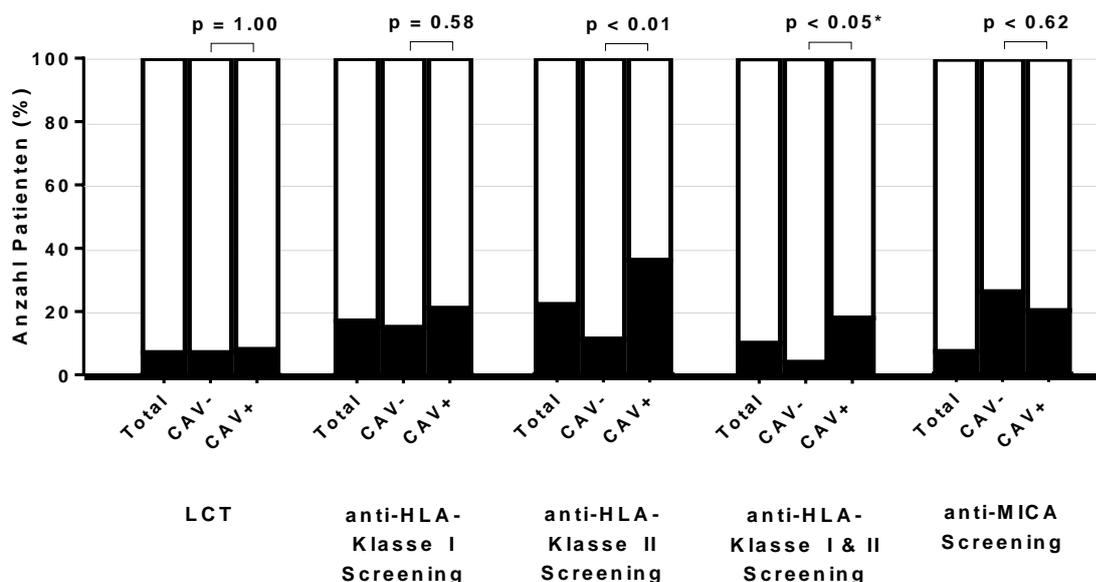
**Tabelle 7 Ergebnisse der HLA-Antikörperdifferenzierung in Zusammenhang mit MFI-Werten des HLA-Antikörperscreenings und dem CAV-Score**

\*Aufgrund fehlender HLA-Typisierungen ist nicht auszuschließen, dass es sich bei den hier als Non-DSA aufgeführten Antikörpern auch um donorspezifische Antikörper handelt.

### 3.4 Zusammenhang zwischen HLA-Antikörpern und der CAV

#### 3.4.1 Luminex-Screening und LCT

Da bei vier der 98 Patienten kein Angiographiebefund erhoben werden konnte, werden im Folgenden 94 Patienten, davon 40 CAV-Patienten und 54 Kontrollpatienten bezüglich ihres Antikörperstatus im LCT und Luminex® betrachtet (s. Abbildung 19).



**Abbildung 19 Antikörperprävalenzen ermittelt durch LCT und Luminex®-HLA-Antikörperscreening in CAV-Fall- und –Kontrollgruppe**

Schwarz: Anteil der Patienten mit positivem Ergebnis im jeweiligen Assay.

Weiß: Anteil der Patienten mit negativem Ergebnis

\*Negativität für gleichzeitige HLA-Klasse I- und HLA-Klasse II-Antikörper beinhaltet Patienten ohne Antikörper und Patienten mit Antikörpern gegen nur eine HLA-Klasse.

Unter den sieben LCT-Positiven fanden sich drei CAV-Patienten und vier koronargesunde Patienten. Die anderen 37 CAV-betroffenen Patienten zeigten im LCT keine Hinweise auf das Vorliegen von HLA-Antikörpern.

Sowohl in CAV-Kontroll- als auch –Fallgruppe zeigten sich im HLA-Klasse I-Antikörperscreening acht Patienten (15 % vs. 21 %) positiv. Die beobachteten Unterschiede bezüglich der Häufigkeit von Antikörpern gegen HLA-Klasse I-Antigene zwischen beiden Gruppen waren statistisch nicht signifikant.

### 3.4 Zusammenhang zwischen HLA-Antikörpern und der CAV

Es zeigte sich allerdings eine sehr signifikante Assoziation zwischen der CAV und den Nachweis von HLA-Klasse II-Antikörpern im Luminex®-Antikörperscreening ( $p < 0,01$ ). Diese fanden sich bei 35 % der CAV-Patienten und lediglich bei 11 % in der Kontrollgruppe, das Quotenverhältnis (engl. *Odds Ratio*, OR) entsprach 4,31 (95 % KI = 1,48 - 12,55).

Das gleichzeitige Vorliegen von HLA-Klasse I- und HLA-Klasse II-Antikörpern wurde in 18 % der CAV-Patienten und 4 % der Kontrollpatienten beobachtet ( $p < 0,05$ ). Die OR bei einem solchen Antikörperbefund betrug 5,51 (95 % KI = 1,08 - 28,18).

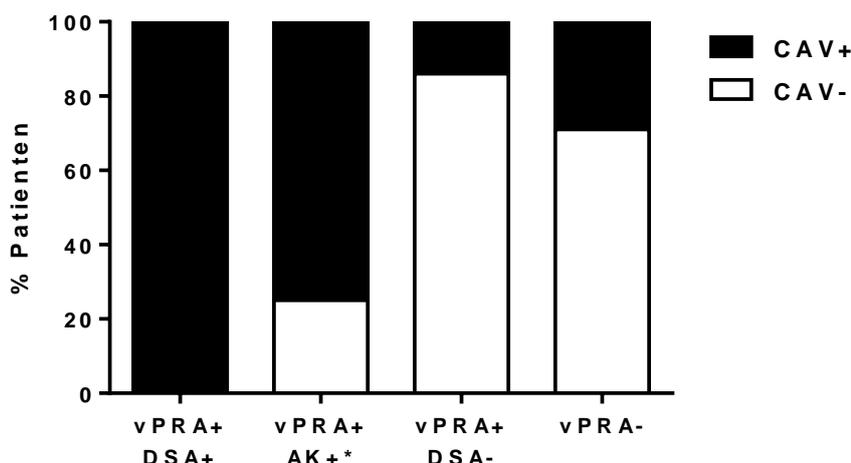
MICA-Antikörper lagen weder in Fall-, noch in Kontrollgruppe signifikant gehäuft vor.

Die weiter oben erwähnten 16 Patienten mit HLA-Klasse I-Antikörpernachweis im Luminex® demonstrierten im Gegensatz zu den 78 anti-HLA-Klasse I-negativen Patienten signifikant häufiger ein mit dem LCT übereinstimmendes Resultat (25 % vs. 4 %,  $p < 0,05$ ). Dies war bei den Patienten mit HLA-Klasse II-Antikörpern nicht der Fall (15 % vs. 5 %,  $p = 0,1632$ ). Die Luminex®-positiven Patienten, die begleitend auch ein positives LCT-Ergebnis präsentierten, zeigten sich für keine der beiden Antikörperklassen häufiger CAV-erkrankt (HLA-Klasse I: 25 % vs 25 %,  $p = 1,00$ ; HLA-Klasse II: 14 % vs. 17 %,  $p = 1,00$ ).

#### 3.4.2 Donorspezifische Antikörper

Die Seren der 29 zuvor im Screening positiv getesteten Patienten wurden bereits in Tabelle 7 ausgeführt. Unter diesen fanden sich 15 CAV-Patienten, zwölf CAV-freie Patienten und zwei Patienten, die aufgrund von Kontraindikationen nicht angiographisch untersucht worden waren und deshalb im Folgenden ausgeschlossen sind (Patient 18 und 19). Da bei zehn Patienten keine HLA-Typisierung des Spenders vorlag, konnte in diesen Fällen im Falle vorhandener HLA-Antikörper keine Zuordnung zu DSA oder Non-DSA erfolgen (Patient 23, 27-29). Abbildung 20 gibt eine graphische Darstellung der Verteilung von Fall- und Kontrollpatienten auf die im Folgenden definierten Patientengruppen.

### 3.4 Zusammenhang zwischen HLA-Antikörpern und der CAV



**Abbildung 20 Häufigkeit der CAV in Abhängigkeit von vPRA und Antikörpernachweis in der Luminex®-Antikörperdifferenzierung**

Signifikanzniveau:  $p < 0,01$ . Als positiv galt ein vPRA  $> 0$  %. Bei den Patienten, die für beide HLA-Antikörperklassen differenziert wurden, wurde der höhere der beiden Werte herangezogen.

$n(\text{vPRA+DSA+}) = 9$ ,  $n(\text{vPRA+AK+*}) = 4$ ,  $n(\text{vPRA+DSA-}) = 7$ ,  $n(\text{vPRA-}) = 7$

\* Dieser Gruppe gehören jene Patienten an, die HLA-Antikörper aufwiesen, mangels Typisierung aber weder Non-DSA noch DSA zugerechnet werden konnten. Patienten ohne Nachweis von spezifischen Antikörpern wurden unabhängig vom Vorliegen von HLA-Befunden in die Gruppen vPRA+DSA- oder vPRA- eingeteilt.

Unter den sieben Patienten mit einem negativen vPRA (s. Tabelle 7, Patient 1, 2, 7, 8, 20-22) fanden sich zwei CAV-Patienten (Patient 7 und 8). Die restlichen Patienten mit negativer Antikörperdifferenzierung gehörten zur Kontrollgruppe (s. Abbildung 20, Säule vPRA-).

Patientenseren, deren Untersuchung einen positiven vPRA-Wert, aber keinen Nachweis spezifischer Antikörper erbrachte (s. Tabelle 7, Patient 3-6 und 24-26), stammten bis auf eines (Patient 26) von koronargesunden Patienten (s. Abbildung 26, Säule vPRA+DSA-).

Bei den Patienten 23 und 27-29 wurden spezifische Antikörper gegen HLA-Merkmale der Klasse II gefunden, in zwei Fällen gegen multiple HLA-DQ-Antigene und in zwei Fällen gegen HLA-DR-Antigene (s. Tabelle 7). Drei dieser Patienten, deren HLA-

### 3.4 Zusammenhang zwischen HLA-Antikörpern und der CAV

Antikörper mangels Spendertypisierung nicht auf Donorspezifität überprüft werden konnten, wiesen eine CAV-Erkrankung auf (s. Abbildung 20, Säule vPRA+AK\*).

Bei den Patienten 9-17 erbrachte die Differenzierung den Nachweis von DSA, welche sich alle gegen HLA-Klasse II-Merkmale richteten, in drei Patienten gegen HLA-DQ, bei einem Patient gegen HLA-DR und bei fünf weiteren gegen beide. Bei den Patienten 9 und 14 wurden zusätzlich donorspezifische HLA-Klasse I-Antikörper beobachtet. Bis auf Patient 10 wurden bei allen DSA-positiven Patienten weitere Non-DSA nachgewiesen (s. Tabelle 7). Die neun DSA-positiven Patienten zeigten sich allesamt von der CAV betroffen (s. Abbildung 20, Säule vPRA+DSA+). Unter diesen fanden sich auch drei der vier Patienten (Patient 17-19), bei denen es im Verlauf zu CAV-assoziierten Komplikationen kam.

Die Häufigkeit der CAV in Abhängigkeit des Nachweises von DSA ist in Tabelle 8 als Kontingenztafel dargestellt. Die vier Patienten, bei denen aufgrund fehlender HLA-Typisierung des Spenders keine Aussagen über die Donorspezifität detektierter HLA-Antikörper getroffen werden konnten (s. Tabelle 7, Patient 23, 27-29) sind von den folgenden Berechnungen ausgeschlossen.

DSA	CAV positiv (n = 37)	CAV negativ (n = 53)	OR (95 % KI)	p-Wert
<b>positiv</b> (n = 9)	9	0	35,67 (2,00-635,8)	< 0,001
<b>negativ</b> (n = 81)	28	53		
Sensitivität 24 %, Spezifität 100 %, Positiver Prädiktivwert 100 %, Negativer Prädiktivwert 65 %				

**Tabelle 8 Häufigkeit der CAV in An- und Abwesenheit von donorspezifischen Antikörpern**

Vier Patienten, bei denen HLA-Antikörper mangels HLA-Typisierung des Spenders weder DSA noch Non-DSA zugeordnet werden konnte, wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Zur Berechnung der Odd's Ratio wurde zu jedem Wert 0,5 addiert.

Es zeigte sich eine hochsignifikante Häufung von DSA in der Gruppe der CAV-Patienten. Gegenüber 24 % in der Fallgruppe zeigte sich keiner der Kontrollpatienten positiv für DSA. Tabelle 9 stellt die Häufigkeit der CAV in Abhängigkeit des isolierten Nachweises von DSA gegen HLA-Merkmale der Klasse I, Klasse II oder beide.

### 3.4 Zusammenhang zwischen HLA-Antikörpern und der CAV

DSA	CAV positiv (n = 37)	CAV negativ (n = 53)	OR (95 % KI)	p-Wert
<i>anti-HLA-Klasse I positiv (n = 0)</i>	0	0	1,43 (0,03-73,58)	1,000
<i>anti-HLA-Klasse I negativ (n = 90)</i>	37	53		
Sensitivität 0 %, Spezifität 100 %, Positiver Prädiktivwert -, Negativer Prädiktivwert 59 %				
	7	0	26,31 (1,45-477,1)	< 0,01
<i>anti-HLA-Klasse II negativ (n = 83)</i>	30	53		
Sensitivität 19 %, Spezifität 100 %, Positiver Prädiktivwert 100 %, Negativer Prädiktivwert 63 %				
<i>anti-HLA-Klasse I&amp;II positiv (n = 2)</i>	2	0	7,03 (0,33-151,2)	0,1807
<i>anti-HLA-Klasse I&amp;II negativ (n = 88)</i>	35	53		
Sensitivität 19 %, Spezifität 100 %, Positiver Prädiktivwert 100 %, Negativer Prädiktivwert 63 %				

**Tabelle 9 Prävalenz isolierter donorspezifischer Antikörper gegen HLA-Merkmale der Klasse I, Klasse II und beide Klassen in CAV-Fall- und -Kontrollgruppe**

Vier Patienten, bei denen HLA-Antikörper mangels HLA-Typisierung des Spenders weder DSA noch Non-DSA zugeordnet werden konnte, wurden von der Analyse ausgeschlossen.

*anti-HLA-Klasse I&II negativ* beinhaltet neben antikörpernegativen Patienten auch Patienten mit donorspezifischen Antikörpern gegen nur eine der beiden HLA-Klassen.

Zur Berechnung der Odd's Ratio wurde zu jedem Wert 0,5 addiert.

Wie bereits ausgeführt präsentierte keiner der neun DSA-Patienten isolierte DSA gegen HLA-Klasse I-Antigene. Der Vergleich der Häufigkeiten von isolierten donorspezifischen HLA-Klasse II-Antikörpern bei CAV- und Kontrollpatienten zeigte mit 19 % versus 0 % einen sehr signifikanten Unterschied. Die zwei Patienten mit DSA gegen Donor-HLA-Antigene beider Klassen wiesen beide eine CAV-Erkrankung auf, ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der CAV gegenüber Patienten ohne HLA-Antikörper beider Klassen bestand jedoch nicht. Auch unter Exklusion der sieben Patienten mit isolierten DSA gegen HLA-Klasse II-Merkmale ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen Fall- und Kontrollpatienten beobachten (p = 0,1449).

### 3.5 Basisdaten und weitere klinische Endpunkte in Abhängigkeit von HLA-Antikörper- und Koronargefäßstatus

Die Basisdaten und Ergebnisse der in Kapitel 2.1.2 ausgeführten Merkmale in Abhängigkeit des Koronargefäßstatus sind in Tabelle 10 wiedergegeben, eine Darstellung in Abhängigkeit des Befunds im Luminex®-HLA-Antikörperscreening gibt Tabelle 11.

Merkmal	Total (n = 94)	CAV- (n = 54)	CAV+ (n = 40)	OR (95%KI)	p-Wert
<b><u>Basisdaten</u></b>					
Alter bei HTx (Jahre) (Median; Q <sub>0.25</sub> -Q <sub>0.75</sub> )	0; 0-5	1; 0-9	0; 0-2	-	0,0720
HTx innerhalb des ersten Lebensjahres	47/94	23/54	24/40	0,49 (0,22-1,14)	0,1438
Zeit seit HTx (Median; Q <sub>0.25</sub> -Q <sub>0.75</sub> )	9; 4-15	7; 2-11	14; 9-16	-	< 0,0001
Geschlecht (m/w)	59/35	32/22	27/13	0,7 (0,30-1,65)	0,5184
Grunderkrankung					
Singulärer Ventrikel	45/94	21/54	24/40	0,42 (0,18-0,98)	0,0601
Kardiomyopathie	38/94	23/54	15/40	1,24 (0,54-2,86)	0,6743
Andere	11/94	10/54	1/40	8,86 (1,08-72,44)	< 0,05
<b><u>Histopathologie</u></b>					
Zustand nach ACR	68/94	30/54	38/40	15,2 (3,32-69,51)	< 0,0001
Anzahl akuter ACR (Median; Q <sub>0.25</sub> -Q <sub>0.75</sub> )	2; 0-3	1; 0-2	3; 2-5	-	< 0,0001
Zustand nach C4d-Deposition	54/94	23/54	31/40	4,64 (1,85-11,62)	< 0,001
<b><u>Hämodynamik &amp; Bildgebung</u></b>					
LVEDP >12 mmHg*	21/89	7/50	14/39	3,44 (1,23-9,66)	< 0,05
Kardiale MRT**	6/72	3/39	3/33	1,20 (0,23-6,39)	1,000

**Tabelle 10 Basisdaten sowie histopathologische, bildgebende und hämodynamische Diagnostika in Abhängigkeit des CAV-Status**

\* LVEDP-Messungen lagen in insgesamt 89 Fällen vor.

\*\* Kardiale MRT-Untersuchungen lagen in insgesamt 72 Fällen vor.

Merkmal	Total (n = 94)	anti-HLA- Klasse I negativ (n = 78)	anti-HLA- Klasse I positiv (n = 16)	OR (95%KI)	p-Wert	anti-HLA- Klasse II negativ (n = 74)	anti-HLA- Klasse II positiv (n = 20)	OR (95%KI)	p-Wert
<b><u>Basisdaten</u></b>									
Alter bei HTx (Jahre) (Median; Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> )	0,5; 0-5	1; 0-6	0; 0-2	-	0,3654	1; 0-6	1; 0-2	-	0,6325
HTx innerhalb des ersten Lebensjahres	47/94	38/78	9/16	0,74 (0,25-2,18)	0,7845	37/74	10/20	1,00 (0,37-2,69)	1,0000
Zeit seit HTx (Median; Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> )	9; 4-15	8; 3-14	14; 8-17	-	< 0,05	8; 3-14	14; 9-16	-	0,0774
Geschlecht (m/w)	59/35	45/33	14/2	5,13 (1,09-24,15)	< 0,05	43/31	16/4	0,35 (0,11-1,14)	0,1163
Grunderkrankung					0,1397				0,5364
Singulärer Ventrikel	45	34	11	2,85 (0,90-8,98)	0,0985	34	11	1,44 (0,53-3,88)	0,6149
Kardiomyopathie	38	34	4	0,43 (0,13-1,46)	0,2632	30	8	0,98 (0,36-2,68)	1,0000
Andere	11	10	1	0,43 (0,05-3,65)	0,6815	10	1	0,34 (0,04-2,80)	0,4470
<b><u>Histopathologie</u></b>									
Zustand nach ACR	68/94	54/78	14/16	3,11 (0,66-14,78)	0,2195	50/74	18/20	4,32 (0,93-20,16)	< 0,05
Anzahl akuter ACR (Median; Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> )	2; 0-3	2; 0-3	2; 1-3	-	0,2566	2; 0-3	3; 1-4	-	0,0891
Zustand nach C4d-Deposition	54/94	42/78	12/16	3,52 (0,92-13,46)	0,0856	39/74	15/20	2,69 (0,89-8,17)	0,0818
<b><u>Hämodynamik &amp; Bildgebung</u></b>									
LVEDP > 12 mmHg*	21/89	19/77	2/12	0,61 (0,12-3,04)	0,7239	13/72	8/17	4,03 (1,31-12,44)	< 0,05
Kardiale MRT**	6/72	6/58	0/14	0,28 (0,01-5,24)	0,5894	5/54	1/18	0,59 (0,06-5,40)	1,0000

**Tabelle 11 Basisdaten, Histopathologie, Bildgebung und Hämodynamik in Abhängigkeit des Luminex®-HLA-Antikörperscreenings**

\* LVEDP-Werte lagen bei insgesamt 89 Patienten vor.

\*\* Kardiale MRT-Untersuchungen lagen bei insgesamt 72 Patienten vor.

### 3.5 Basisdaten und weitere klinische Endpunkte in Abhängigkeit von HLA-Antikörper- und Koronargefäßstatus

Der im Folgenden behandelte Vergleich zwischen den Basisdaten und klinischen Parametern in Bezug auf den DSA-Status erfolgte unter Ausschluss der vier Patienten, deren spezifische Antikörper mangels Typisierung keiner der beiden Gruppen zugeordnet werden konnte, anhand von neun DSA-positiven und 81 DSA-negativen Patienten.

Die DSA-Patienten wurden im Median im Alter von zwei Jahren ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$  = 0-3 Jahre) transplantiert und unterschieden sich damit nicht signifikant von den anderen 81 Patienten. Gleiches gilt für die Anzahl der innerhalb des ersten Lebensjahres transplantierten Patienten ( $n = 4$ ), die seit HTx vergangene Zeit (median 10 Jahre;  $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$  = 2-15 Jahre), die Verteilung der Grunderkrankungen und die Geschlechterverteilung (sieben Männer zu zwei Frauen).

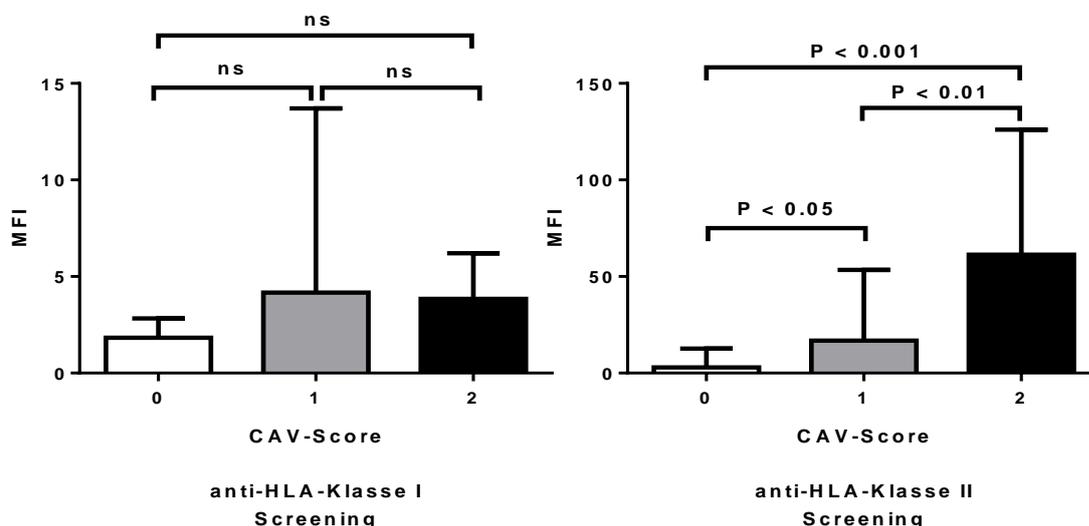
Obwohl sich im Vergleich zu 70 % bei DSA-Negativen alle neun DSA-positiven Patienten im Status nach ACR befanden, entsprach dies laut *Fisher's Exact Test* einem nichtsignifikanten Unterschied ( $p = 0,0587$ ). Ähnlich grenzwertig war die Assoziation von DSA mit der Häufigkeit des C4d-Nachweises in Verlaufsbiopsien ( $p = 0,0725$ ).

Es zeigte sich hingegen eine hochsignifikante Häufung pathologischer LVEDP-Werte bei DSA-positiven Patienten (78 % vs. 17 %,  $p < 0,001$ ). Die Betrachtung von Funktions- und Perfusionsanalysen mit der kardialen Magnetresonanztomographie korrelierte nicht mit An- oder Abwesenheit von DSA ( $p = 1,000$ ).

## 3.6 Validierung und Testeigenschaften des Luminex® in der CAV-Diagnostik

### 3.6.1 Beziehung zwischen MFI, vPRA und der CAV

In Kapitel 3.4 wurde bereits der Zusammenhang zwischen Luminex®-Screeningbefund für HLA-Antikörper der Klasse I und II und der CAV bei einem Cutoff von 3 dargestellt. Neben der Betrachtung von HLA-Antikörperstatus und Koronargefäßstatus als kategoriale Merkmale untersuchten wir weiterhin die Beziehung zwischen der Höhe der MFI-Werte des Luminex®-Antikörperscreenings und der CAV-Scores. Sowohl im HLA-Klasse I- als auch HLA-Klasse II-Antikörperscreening zeigten die MFI-Werte eine positive Korrelation mit dem CAV-Score (Klasse I: Spearman  $r = 0,26$ ,  $p < 0,05$ ; Klasse II: Spearman  $r = 0,39$ ,  $p < 0,0001$ ). Varianzanalysen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den MFI-Werten der einzelnen CAV-Subgruppen im Screening auf HLA-Klasse I-Antikörper ( $p = 0,1871$ ), indizierten jedoch hochsignifikante Unterschiede im Screening auf HLA-Antikörper der Klasse II ( $p < 0,0001$ ). Die Mittelwerte der einzelnen Subgruppen und das Signifikanzniveau der gruppenspezifischen Unterschiede sind in Abbildung 21 dargestellt.

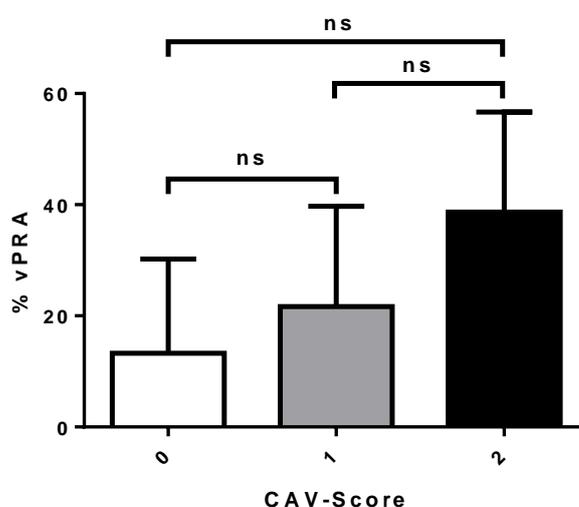


**Abbildung 21** MFI-Mittelwerte und Standardabweichungen der CAV-Subgruppen im Luminex®-Screening auf HLA-Klasse I- und HLA-Klasse II-Antikörper

### 3.6 Validierung und Testeigenschaften des Luminex® in der CAV-Diagnostik

Zwischen vPRA-Wert und CAV-Score beobachteten wir unabhängig vom Vorliegen spezifischer Antikörper weiterhin eine positive Korrelation ( $r = 0,4407$ ,  $p < 0,05$ ). Wie aus Abbildung 22 hervorgeht schienen tendenziell auch gruppenspezifische Unterschiede der mittleren vPRA-Werte vorzuliegen, Varianzanalysen sprachen allerdings nicht für signifikante Unterschiede zwischen den Subgruppen ( $p = 0,0927$ ).

Unter Vernachlässigung eventueller DSA oder Non-DSA wurden die 27 Patienten, welche mittels Antikörperdifferenzierung untersucht wurden (s. Tabelle 7 und Abbildung 20), in Bezug auf vPRA-Positivität und -Negativität verglichen. Obwohl bei allen 27 Patienten ein positiver Screeningbefund vorlag, welcher zur Untersuchung im PRA- oder *Single Antigen*-Test führte, zeigten sieben Patienten (vgl. Abbildung 20, Säule 4) einen negativen vPRA, darunter fünf CAV-negative und zwei CAV-betroffene Patienten. Die 20 anderen Patienten mit positivem vPRA (vgl. Abbildung 20 Säule 1-3) zeigten sich insgesamt in 13 Fällen CAV-erkrankt und in sieben Fällen gesund. Anhand der isolierten Betrachtung der vPRA-Werte dieser Patienten unterschieden sich CAV- und Kontrollpatienten nicht signifikant ( $p = 0,1850$ ).



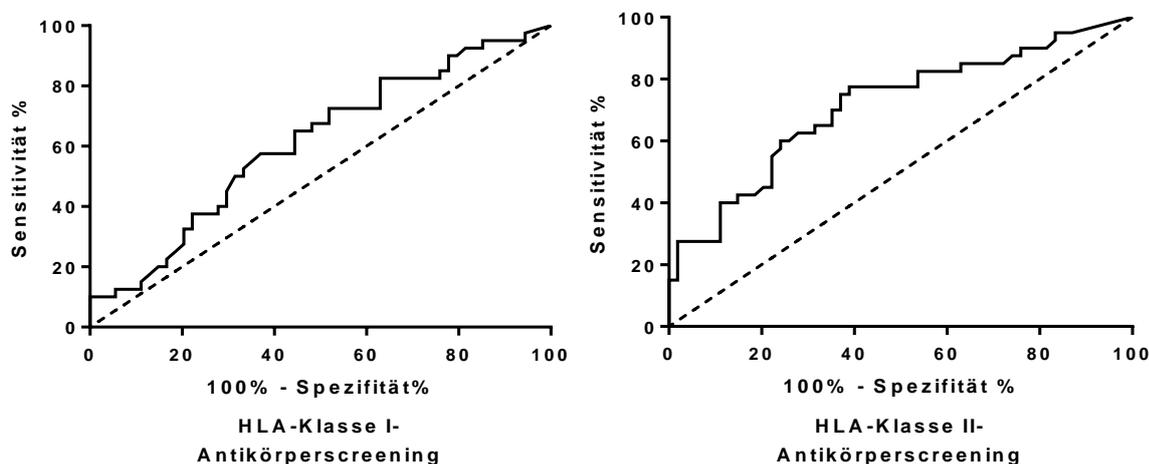
**Abbildung 22 vPRA-Mittelwerte und Standardabweichungen der in der Antikörperdifferenzierung untersuchten Patienten und deren gruppenspezifische Unterschiede**

Bei den Patienten, die für beide HLA-Antikörperklassen differenziert wurden, wurde der höhere der beiden Werte herangezogen.

### 3.6.2 ROC-Analyse und Testeigenschaften des Luminex bei verschiedenen Cutoffs

**Screening** Wie bereits ausgeführt wurde im Luminex®-Antikörperscreening die hausinterne Entscheidungsgrenze  $MFI \geq 3$  benutzt, um zwischen Positivität und Negativität für HLA-Antikörper zu unterscheiden. Für die Häufigkeit von HLA-Klasse I-Antikörpern konnten bei gegebenem Cutoff zwischen CAV-Gruppe und Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden (21 % vs. 15 %). Hingegen wurden in der CAV-Gruppe signifikant häufiger HLA-Klasse II-antikörperpositive Patienten beobachtet (35 % vs. 11 %,  $p < 0,01$ , s. Abbildung 19). Das Chancenverhältnis, bei Vorliegen von HLA-Klasse II-Antikörpern mit MFI-Werten  $\geq 3$  an einer CAV erkrankt zu sein, betrug 4,31 (95 % KI = 1,48-12,55). Mit 14 richtig positiv und 26 falsch negativ getesteten ergab sich eine Sensitivität von 35 %. Die Spezifität betrug mit sechs falsch positiven Patienten und 48 richtig negativen Patienten 89 %. Der positive und negative prädiktive Wert waren 70 % und 65 %.

Für das Luminex®-Antikörperscreening auf HLA-Antikörper beider Klassen wurde anhand der Ergebnisse der 94 untersuchten Seren eine Grenzwertoptimierungskurve (engl. *receiver operating characteristic*, ROC-Kurve) erstellt. Die resultierenden ROC-Kurven gibt Abbildung 23 wieder.



**Abbildung 23 ROC-Kurven des MFI-Werte aus dem Luminex®-Screening auf HLA-Antikörper in der Detektion von CAV-Patienten**

HLA-Klasse I-Antikörper:  $AUC=0,6102$ , 95 % KI = 0,4951-0,7252,  $p = 0,06881$ .

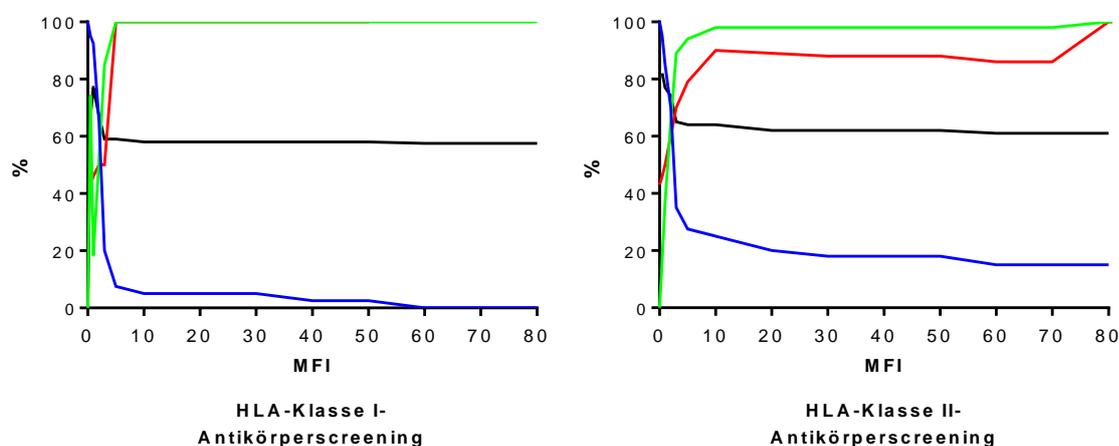
HLA-Klasse II-Antikörper:  $AUC=0,7127$ , 95 % KI = 0,6054-0,8200,  $p < 0,001$ .

Die Identitätslinie ist gestrichelt dargestellt.

### 3.6 Validierung und Testeigenschaften des Luminex® in der CAV-Diagnostik

Dabei erreichte die ROC-Analyse für des HLA-Klasse I-Antikörperscreenings nicht das geforderte Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ , während die des HLA-Klasse II-Antikörperscreenings mit  $p < 0,001$  ein hochsignifikantes Ergebnis bedeutete. Eine graphische Darstellung von Sensitivität, Spezifität und prädiktiven Werten des Luminex®-Screenings in Abhängigkeit des Cutoffs gibt Abbildung 24. Statistisch signifikante Unterschiede bezüglich der Häufigkeit von Antikörpern gegen HLA-Klasse I-Antigene zwischen CAV- und Kontrollpatienten konnten auch unter Veränderung des Cutoffs nicht erreicht werden. Der Cutoff, bei dem die geringste Irrtumswahrscheinlichkeit ( $p = 0,0747$ ) erreicht werden konnte, betrug  $\geq 5$ . Bei diesem betrug die Sensitivität 7,5 %, die Spezifität 100 %, der positive prädiktive Wert 100 % und der negative prädiktive Wert 59 %. Beim Nachweis von HLA-Antikörpern der Klasse I mit einem MFI  $\geq 5$  betrug das Chancenverhältnis einer CAV 10,17 (95 % KI = 0,5101-202,9).

Unter Verwendung eines Cutoffs von  $\geq 7$  waren die Unterschiede zwischen Fall- und Kontrollgruppe bezüglich der Häufigkeit von Antikörpern gegen HLA-Klasse II-Antigene maximal ( $p = 0,0003$ ). Die Sensitivität betrug so 28 %, die Spezifität 98 %, der positive prädiktive Wert 92 % und der negative prädiktive Wert 65 %. Das Chancenverhältnis einer CAV unter Anwesenheit von HLA-Klasse II-Antikörpern mit einem MFI  $\geq 7$  betrug 20,1 (95 % KI = 2,469-163,7).

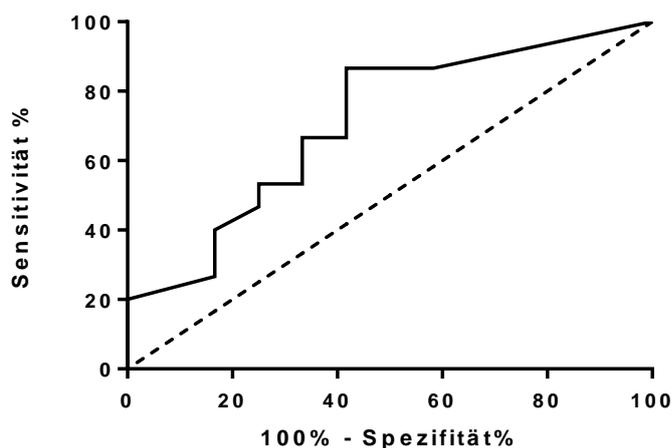


**Abbildung 24 Testeigenschaften des MFI-Werts des Luminex®-Screenings auf HLA-Antikörper der Klasse I und der Klasse II in der Detektion von CAV-Patienten in Abhängigkeit des Cutoffs**

Sensitivität: blau, Spezifität: grün, positiver Prädiktivwert: rot, negativer Prädiktivwert: schwarz.

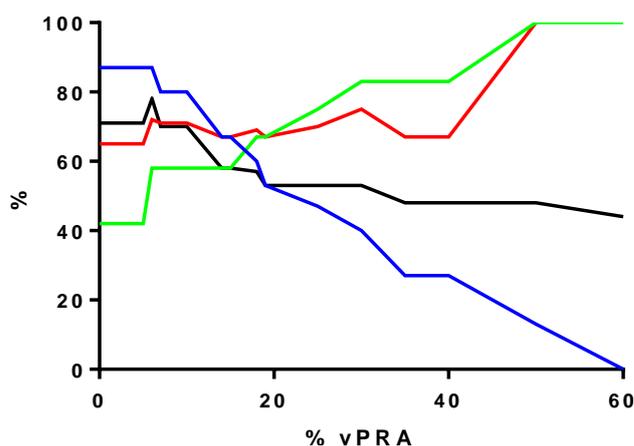
### 3.6 Validierung und Testeigenschaften des Luminex® in der CAV-Diagnostik

**Differenzierung** Die ROC-Analyse der vPRA-Werte der 15 CAV-positiven und 12 -negativen Patienten ergab die in Abbildung 25 dargestellte Kurve. Unter isolierter Betrachtung des vPRA konnte bei einem Cutoff von  $\geq 6\%$  vPRA mit hinreichender Irrtumswahrscheinlichkeit zwischen CAV-Patienten und Koronargesunden unterschieden werden ( $p = 0,0369$ ). Sensitivität und Spezifität betragen hierfür 87 % und 58 %, positiver und negativer Prädiktivwert lagen bei 72 % und 77 % (s. Abbildung 26).



**Abbildung 25 ROC-Kurve des vPRA-Werts zur Detektion von CAV-Patienten**

Die dargestellte Kurve basiert auf den Werten der 27 Patienten, die mittels Luminex®-Antikörperdifferenzierung untersucht wurden. Die Identitätslinie ist gestrichelt dargestellt. (AUC=0,7083, 95 %KI = 0,5070-0,9096,  $p = 0,06734$ ).



**Abbildung 26 Testeigenschaften des vPRA-Werts der Luminex®-Differenzierung in der Detektion von CAV-Patienten in Abhängigkeit des Cutoffs**

Bei Patienten, die für beide HLA-Antikörperklassen differenziert wurden, wurde der höhere der beiden Werte herangezogen.

Sensitivität: blau, Spezifität: grün, positiver Prädiktivwert: rot, negativer Prädiktivwert: schwarz.

## 4 Diskussion

### 4.1 Charakterisierung des Studienkollektivs

#### 4.1.1 Basisdaten

Mit einem Anteil von etwa 6 % an allen im Eurotransplantgebiet durchgeführten Herztransplantationen stellen kindliche HTx-Patienten eine sehr kleine Grundgesamtheit dar, was den Hauptgrund für die begrenzte Zahl an Studien zur Beziehung zwischen HLA-Antikörpern und der CAV darstellt [11, 112]. Kleine Fallzahlen erschweren häufig valide statistische Analysen und schränken die Aussagekraft vieler Untersuchungen ein. Mit 98 rekrutierten pädiatrischen HTx-Patienten kann sich die vorliegende Arbeit bezüglich des Stichprobenumfangs mit anderen Studien messen (vgl. Tabelle 4).

Vorteile der hier definierten Einschlusskriterien, welche sich wie beschrieben zunächst nur an Menge und Qualität der Serumproben richteten, sind die Generierung dieses vergleichsweise großen Kollektivs und die randomisierte Aufnahme der Patienten in die Studie ohne vorherige Durchsicht von Vorbefunden. Mögliche Nachteile sind die fehlende Kontrolle von Störvariablen durch beispielsweise die Anpassung des Alters in Fall- und Kontrollgruppen, eine relativ große Spannweite einzelner Merkmale und die Unvollständigkeit manch anderer. Die Tatsache, dass die hier untersuchten Proben hauptsächlich aus der kinder-kardiologischen Ambulanz und somit mehrheitlich von ambulanten Patienten stammten, könnte eine Stichprobenverzerrung darstellen, da womöglich eher Langzeitüberlebende rekrutiert wurden und Patienten mit kompliziertem Verlauf eher im stationären Bereich zu finden gewesen wären.

So repräsentierten die in dieser Studie untersuchten Patienten mit einem mittleren Alter zum Untersuchungszeitpunkt von  $13,27 \pm 5,839$  Jahren und einer mittleren seit der Transplantation vergangenen Zeit von  $9,296 \pm 6,268$  Jahren insgesamt eher ein Kollektiv von Langzeitüberlebenden (vgl. Tabelle 4). Das Alter zum Zeitpunkt der Transplantation zeigte zwar eine relativ große Spannweite, die Streuungsparameter fielen jedoch vergleichsweise gering aus (s. Tabelle 6, vgl. Tabelle 4).

## 4.1 Charakterisierung des Studienkollektivs

Die Verteilung der zur HTx führenden Grunderkrankungen entsprach im Wesentlichen der in Abbildung 1 dargestellten Verteilung innerhalb der ISHLT-Datenbank. Das Geschlechterverhältnis des Studienkollektivs fiel im Vergleich zu dem der Warteliste von Eurotransplant von 2000-2010 (381 männlich, 306 weiblich) mit 62 männlichen zu 36 weiblichen Patienten leicht zugunsten der männlichen Patienten aus ( $p = 0,1576$ ) [11].

### 4.1.2 Prävalenz von HLA-Antikörpern und der CAV

Dass Kontraindikationen, Malcompliance oder andere Ursachen die etwa alle ein bis zwei Jahre geforderten Verlaufsangiographien in der klinischen Routine verhindern, fällt aufgrund anatomischer und technischer Umstände besonders bei Kindern ins Gewicht [7, 91]. In einer multiinstitutionellen Studie im Rahmen der *Pediatric Heart Transplant Study* fehlten serielle angiographische Untersuchungen sogar in bis zu 50 % der Fälle [98]. Diese Tatsachen führten auch im hier untersuchten Kollektiv dazu, dass in vier Fällen kein angiographischer Befund erhoben werden konnte, was zu deren Ausschluss führte und in anderen keine Verlaufsuntersuchungen vorlagen. Wie bereits erwähnt war die Serumentnahme in 77 % durch weniger als ein Jahr, in 89% durch weniger als zwei Jahre von der jüngsten Angiographie getrennt. Die außerhalb dessen liegenden Fälle mögen aus wissenschaftlicher Sicht zwar ein limitierender Faktor sein, stellen jedoch einen kleinen Anteil dar und sind auch in der klinischen Realität in einer kinder-kardiologischen Ambulanz durchaus zu berücksichtigen.

Da es sich bei dieser Studie um eine Querschnittserhebung retrospektiver Daten handelt, konnten Unterschiede bezüglich der Nachbeobachtungszeiträume der Patienten nicht vermieden werden. Die in Abbildung 15 dargestellten Prävalenzen der CAV innerhalb der Patientengruppen in Abhängigkeit der Nachbeobachtungszeit sind daher nur bedingt mit den Zahlen aus Kaplan-Meier-Analysen des ISHLT-Jahresberichts aus 2013 (2 % nach einem, 15 % nach fünf, 34 % nach zehn Jahren) vergleichbar. Daher ist anzumerken, dass sich mit einer longitudinalen Betrachtung wohl repräsentativere Aussagen zu den verschiedenen Jahresprävalenzen und der Inzidenz treffen ließen. Die Darstellung spricht dennoch dafür, dass es umso häufiger zu einer Entwicklung einer CAV kommt, je länger der beobachtete Transplantationsverlauf ist und, dass besonders bei Langzeitüberlebenden mit deren Entwicklung gerechnet werden muss.

## 4.1 Charakterisierung des Studienkollektivs

Ebenso niedriger ist die hier im LCT beobachtete Prävalenz von HLA-Antikörpern von 7 %, welche Ho et al. in einer Studie an pädiatrischen Patienten mit 15 % für Antikörper gegen HLA-Klasse I-Antigene und mit 28% gegen HLA-Klasse II-Antigene bezifferten (s. Abbildung 16, vgl. Tabelle 4). Die in dieser Studie dokumentierte Häufigkeit von HLA-Klasse I-Antikörpern (17 %), HLA-Klasse II-Antikörpern (21 %) und donorspezifischen Antikörpern (10 %) liegt zwischen denen der Studien, die in Tabelle 4 zitiert wurden. Dass das HLA-Antikörperscreening mittels Luminex®-Technologie verglichen mit dem LCT insgesamt ein Verfahren mit überlegener Sensitivität ist und eine höhere Zahl von Patienten als antikörperpositiv identifiziert, zeigt auch die vorliegende Studie deutlich. Die niedrigeren CAV- und Antikörperprävalenzen gegenüber anderen Studien ließen sich möglicherweise durch das Rekrutieren hauptsächlich ambulanter Patienten und eine eventuelle Stichprobenverzerrung erklären. Im stationären Bereich hätte man vermutlich mehr Patienten mit immunologischen Komplikationen rekrutiert.

### 4.1.3 Vergleich der Basisdaten der Fall- und Kontrollpatienten

Die bereits ausgeführten Einschlusskriterien führten zwar zu einer relativ großen Stichprobe und einer randomisierten Aufnahme in das Kollektiv, verhinderten aber die Auswahl von Fall- und Kontrollpatienten unter Anpassung des Alters und der seit HTx vergangenen Zeit. Nichtsdestotrotz lassen sich anhand des in Tabelle 10 und Tabelle 11 dargestellten Vergleichs der Basisdaten zwischen Fall- und Kontrollgruppe einige Beobachtungen machen. So ließ sich weder bezüglich des Alters bei Transplantation noch bezüglich der Häufigkeit von Patienten, die innerhalb des ersten Lebensjahres transplantiert wurden zwischen CAV-positiven und -negativen Patienten ein signifikanter Unterschied feststellen. Die CAV-Patienten waren tendenziell zum Zeitpunkt der Transplantation jünger. Gleiches gilt für Positivität beziehungsweise Negativität für HLA-Antikörper beider Klassen. Dass früher transplantierte Patienten ein besseres Langzeitergebnis und eine niedrigere Inzidenz von Abstoßungsphänomenen aufweisen, könnte man möglicherweise im Falle größerer Altersdifferenzen zwischen Fall- und Kontrollgruppen beobachten, jedoch stützen die Daten aus der vorliegenden Arbeit diese Hypothese nicht.

#### 4.1 Charakterisierung des Studienkollektivs

Bezüglich der Verteilung der Grunderkrankungen erbrachte der  $\chi^2$ -Test zwischen CAV-Patienten und koronargesunden Patienten einen signifikanten Unterschied, ebenso fanden sich unter den koronargesunden signifikant mehr Fälle der Kategorie „Andere“, wie in Kapitel 3.1 definiert ( $p < 0,05$ ). Den Literaturdaten nach wurde bisher kein Zusammenhang zwischen der CAV und der zur HTx führenden Grunderkrankung bei pädiatrischen Patienten dokumentiert, weshalb diesem Zusammenhang eine zufällige Verteilung zugrunde liegen könnte. Ähnlich dürfte angesichts der Fallzahl die Häufung von HLA-Klasse I-Antikörpern im Luminex®-Antikörperscreening bei männlichen Patienten zu interpretieren sein ( $p < 0,05$ ).

Dass bei den CAV-Patienten im Median allerdings etwa doppelt so viel Zeit seit der HTx vergangen war stellte einen hochsignifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe dar ( $p < 0,0001$ ). Auch lag die HTx bei Patienten mit HLA-Klasse I-Antikörpern im Luminex®-Antikörperscreening signifikant länger zurück ( $p < 0,05$ ), während sich bezüglich Antikörpern gegen HLA-Merkmale der Klasse II zumindest eine nichtsignifikante Tendenz in dieselbe Richtung abzeichnete ( $p = 0,0774$ ). Dass die CAV mit fortschreitender Zeit nach HTx immer häufiger wird, belegen bereits die in Abbildung 10 dargestellten Graphiken der ISHLT. Auch die Daten dieser Studie sprechen dafür, dass die CAV eine typische Komplikation des Langzeitverlaufs ist. In der klinischen Betreuung von pädiatrischen HTx-Patienten sollte deshalb umso mehr mit der Entwicklung einer CAV gerechnet werden, je länger der Patient bereits mit dem transplantierten Herzen lebt. Womöglich gilt dies auch für die humorale Immunantwort und die Produktion von HLA-Antikörpern.

## 4.2 HLA-Antikörper als pathophysiologisches Element der CAV

Wie bereits in Kapitel 1.3 und 1.4 erläutert, gilt die Bedeutung von HLA-Antikörpern und der AMR für die CAV aus pathophysiologischer und klinischer Sicht als umstritten. Ob HLA-Antikörper als Epiphänomen der CAV auftreten, oder ob sie einen kausalen Faktor darstellen, können wir mit dieser Studie aufgrund ihres Querschnittsdesigns nicht beantworten. Hierzu wären Längsschnittbetrachtungen mit seriellen Antikörpermessungen und Koronarangiographien notwendig. Inzwischen impliziert jedoch eine beachtliche Menge an klinischen und experimentellen Daten, dass HLA-Antikörper der CAV vorausgehen und ein ätiopathogenetisches Element sind. Vor diesem Hintergrund lassen sich anhand der von uns und anderen Forschungsgruppen (s. Tabelle 4) beobachteten Assoziation von Antikörpern gegen HLA-Klasse II-Merkmale des Donors Hypothesen zur Pathophysiologie ableiten.

Abgesehen von den *donor passenger leukocytes*, welche in den ersten Monaten nach HTx aus dem Organismus und dem Allograft depletiert sind, stellen das Endothel und die vaskulären SMC die einzigen Zellen dar, welche durch repetitiv-kumulative Schädigung und unter Einwirkung inflammatorischer Zytokine zur HLA-Klasse II-Expression gebracht werden können [122, 123]. Diese beiden Zelltypen stellen in den Augen vieler Autoren die einzige vermeintliche Zielstruktur für HLA-Klasse II-Antikörper und die von ihnen vermittelten Effekte im Graft dar. So zeigte sich bei den Seren, welche im *LABScreen® PRA-* oder *SA-*Test untersucht wurden, ein deutliches Überwiegen von DSA gegen HLA-Klasse II-Merkmale des Donors. Die Antikörperkonstellation in Kontext des CAV-Status lässt nebenbei vermuten, dass es sich auch bei den Patienten 23, 27, 28 und 29 aus Tabelle 7 trotz fehlender Typisierung um DSA handelte (s. Abbildung 20). Auch Topilsky et al. entdeckten ähnliche Befunde [119]. Der mögliche Einfluss von donorspezifischen HLA-Klasse II-Antikörpern findet auch in unseren Ergebnissen Ausdruck, da alle Patienten, bei denen solche beobachtet wurden, CAV-betroffen waren und ein hochsignifikanter Zusammenhang bestand ( $p < 0,001$ ). Ebenfalls auffällig war der hohe Anteil an DSA gegen HLA-DQ-Merkmale des Donors, welche in sieben der neun DSA-positiven Patienten prävalent waren (s. Tabelle 7). Die Lokalisation von HLA-DR- und HLA-DQ-Antigen in den Zellen der Blutgefäßwände und deren Beteiligung an der Ausbildung von CAV-Läsionen macht diese Vermutung aus unserer Sicht wahrscheinlich.

#### 4.2 HLA-Antikörper als pathophysiologisches Element der CAV

Wie in Kapitel 3.5 gezeigt, fanden sich sowohl anti-HLA-Klasse II-Antikörper, donorspezifische Antikörper als auch die CAV selbst signifikant häufiger bei Patienten im Status nach akuter zellulärer Abstoßung. Die Ergebnisse dieser Studie befürworten, im Kontext der Literatur, eine pathophysiologische Sequenz, in der akute Abstoßungsepisoden eine zytokingesteuerte HLA-Induktion auf den allogenen Zellen, so auch auf Endothel und vaskulären SMC, initiieren und sie somit zum Ziel einer sich selbst unterhaltenden, polyklonalen chronischen Immunantwort machen (s. Kapitel 1.3.2). Wie auch bei Raichlin et al. spricht die von uns beobachtete hochsignifikante Korrelation zwischen dem Schweregrad der CAV und der Anzahl akuter Rejektionen für einen kumulativen Effekt [75].

Trotz der hier beobachteten signifikanten Assoziation wiesen immerhin 65 % der CAV-Patienten keine HLA-Antikörper der Klasse II auf. In Anbetracht dessen müssen auch bei unseren Patienten andere immunologische und nichtimmunologische kausale Faktoren in der Pathogenese der CAV angenommen werden. Eine Limitierung dieser Studie stellt sicherlich das Nichterfassen einiger Störfaktoren (klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren, Ischämiezeit etc.), die Unvollständigkeit oder das Fehlen mancher HLA-Typisierungen und die Außerachtlassung der zellulären Immunität gegen das Allograft dar. Dies hätte die Kapazitäten einer Promotionsarbeit jedoch überschritten. Eine weitergehende Erforschung der Interaktion humoraler und zellulärer Immunprozesse sowie des Einflusses von nichtimmunologischen Faktoren sind in Zukunft für ein differenzierteres Verständnis der Pathogenese der CAV notwendig.

Die deutliche Diskrepanz zwischen der Anzahl positiver Befunde im LCT und im Luminex®-Antikörperscreening in dieser Studie ließe sich auf mehrere Arten erklären. Dieser könnten zunächst methodische Faktoren zugrunde liegen, zum Beispiel die hohe Sensitivität der *Microbead-Arrays* oder Titer unterhalb der Nachweisgrenze des LCT. Im Falle der HLA-Klasse II-Antikörper kommt hinzu, dass der LCT ohne B-Zellselektion durchgeführt wurde und deshalb eher als repräsentativ für Antikörper gegen HLA Klasse I zu sehen ist. Diese Vermutung stützt die signifikante Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen des LCT und dem Luminex®-Screening auf HLA-Klasse I-Antikörper (s. Kapitel 3.4.1). Man könnte weiterhin annehmen, dass bei den Patienten mehrheitlich nichtkomplementaktivierende Antikörperisotypen vorliegen und deshalb nicht im LCT detektiert werden konnten.

## 4.2 HLA-Antikörper als pathophysiologisches Element der CAV

Über diese Annahme lässt sich anhand unserer Daten lediglich spekulieren, da wir deren Anteil nicht genau eruieren können. Dafür sprechen allerdings die Ergebnisse der DTT-Modifikation des LCT, nach denen bei einem Großteil der Patienten nach Inkubation mit DTT ein niedrigerer beziehungsweise negativer PRA-Wert ermittelt wurde, sodass in diesen Fällen IgM-Antikörper angenommen werden können. Die Berücksichtigung des LCT-Ergebnisses bei Patienten mit HLA-Antikörpernachweis mittels Luminex® erbrachte in diesem Kollektiv jedenfalls keine weiteren Hinweise bezüglich des CAV-Status (s. Kapitel 3.4.1).

Dass auch nichtkomplementaktivierende Isotypen eine CAV über mehrere Mechanismen auslösen können, wurde bereits durch mehrere, zum Teil in Kapitel 1.4.1 zitierte Studien dokumentiert. Dafür spricht auch, dass bei einem nicht unwesentlichen Teil von HTx-Patienten C4d-negative AMR vorkommen und, dass auch im Falle einer CAV nicht immer eine begleitende kapilläre C4d-Deposition gefunden werden kann [124]. Hingegen weisen sowohl unsere Studie als auch die Daten von Poelzl et al. auf eine Beziehung zwischen dem immunhistochemischen Nachweis von C4d als Komplementspaltprodukt und der CAV hin [125]. In einer älteren Arbeit von Vasilescu et al. konnte zudem eine Assoziation von HLA-Klasse II-Antikörpern im LCT (nach B-Zellselektion) zur CAV beobachtet werden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass sowohl komplementaktivierende als auch nichtkomplementaktivierende Isotypen zur Initiation einer CAV imstande sind [126]. Darüber hinaus wurden Mechanismen beschrieben, über die komplementunabhängige Antikörper in synergistischer Weise zur C4d-Deposition durch komplementabhängige Antikörper beitragen [127, 128].

Ho et al. interpretierten die bei manchen Patienten zu beobachtende, vermeintlich unspezifische Reaktivität gegen nichtdonorspezifische HLA-Merkmale durch Non-DSA, indem sie eine Aktivierung von Gedächtnis-B-Zellen durch inflammatorische Zytokine im Rahmen der Abstoßungsreaktion annahmen und plädierten für eine klinische Berücksichtigung, da sie eine laufende Alloimmunität reflektieren könnten [129]. Da mit fortschreitendem Posttransplantationsverlauf ein Überwiegen des indirekten Wegs der Antigenerkennung angenommen wird, könnte zudem im Rahmen einer chronischen Organabstoßung über die in Kapitel 1.2.3 erläuterten Mechanismen eine Ausweitung der humoralen Immunität auf andere intra- und intermolekuläre Epitope stattfinden. Diese wurde durch Ciubotariu et al. in der Vergangenheit, gemessen durch Grenzwertverdünnungsassays mit alloreaktiven T-Zellklonen, gehäuft bei CAV-Patienten beobachtet [52].

## 4.2 HLA-Antikörper als pathophysiologisches Element der CAV

Arbeitsgruppen um Statsny und Irving sprachen diesen Non-DSA eine klinische Relevanz ab, während Terasaki et al. eine Häufung bei NTx-Patienten mit Graftversagen fanden [106, 114, 116]. Die Entstehung dieser Non-DSA sei laut Terasaki auf eine Immunisierung gegen *shared epitopes*, welche sowohl auf donorspezifischen als auch nicht im Donor exprimierten HLA-Antigenen vorkommen, zurückzuführen. Non-DSA zeigten sich in unserem Kollektiv lediglich bei Patienten, die gleichzeitig auch DSA präsentierten. Außerdem konnte die Antikörperspezifität bei einigen Patienten mangels Typisierung nicht zugeordnet werden. Diese Umstände schränken die Aussagefähigkeit dieser Studie zur Bedeutung von Non-DSA ein. Obwohl auch hier weitere wissenschaftliche Erkenntnisse von Nöten sind, ist aus unserer Sicht angesichts der Ergebnisse anderer Forschungsgruppen und der von uns beobachteten Assoziationen eine Bedeutung von Non-DSA, ob kausal oder als Begleitphänomen, in der Pathophysiologie der chronischen Abstoßung nicht auszuschließen.

In Kapitel 3.4 wurde eine signifikante Beziehung zwischen dem Nachweis von HLA-Klasse II-Antikörpern im Luminex®-Screening und der CAV demonstriert. Weiterhin bestanden, wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben, signifikante positive Korrelationen zwischen den MFI-Werten des Antikörperscreenings sowie den vPRA-Werten in der Antikörperdifferenzierung und dem CAV-Schweregrad ( $p < 0,0001$  und  $< 0,05$ ). Ebenso ergaben die in Abbildung 21 illustrierten Varianzanalysen hochsignifikante Unterschiede der MFI-Werte von HLA-Klasse II-Antikörpern im Luminex®-Screening innerhalb der drei CAV-Subgruppen ( $p < 0,0001$ ), während diese unter Betrachtung des vPRA-Wertes der Antikörperdifferenzierung zumindest einen tendenziellen Unterschied ergab (s. Abbildung 22,  $p = 0,0927$ ). Interpretiert man die Höhe von MFI- und vPRA-Wert als Ausdruck der Reaktivitätsbreite eines Serums, so könnten hohe Werte als eine sich amplifizierende, polyklonale B-Zellantwort im Sinne einer chronischen humoralen Immunität gesehen werden, welche möglicherweise auch die Anwesenheit von Non-DSA umfasst. Dies wäre vor allem in einem Kollektiv aus mehrheitlich Langzeitüberlebenden denkbar. Jedoch könnte man besonders im Falle der Seren, die wegen eines Screeningergebnisses zwischen 3 und 20 mittels *LABScreen® PRA-Test* untersucht wurden und dort ein negatives Ergebnis zeigten, unspezifische Reaktionen als Ursache des positiven Screeningergebnis annehmen. Dies ist angesichts der außerordentlichen Sensitivität der Luminex®-Technologie zumindest zu bedenken.

#### 4.2 HLA-Antikörper als pathophysiologisches Element der CAV

Im Gegensatz zu diesen Seren präsentierten solche, die wegen eines Screeningergebnisses  $> 20$  im *LABScreen® Single Antigen*-Test untersucht wurden, in allen Fällen auch dort ein positives Ergebnis, in allen Fällen mit dem Nachweis spezifischer Antikörper mit  $MFI > 1000$ . Um methodische Einflüsse auszuschließen, hätte man alle positiven Seren sowohl mit dem *LABScreen® PRA*-, als auch dem *Single Antigen*-Test untersuchen müssen, was allerdings im Rahmen der Routinediagnostik wirtschaftlich schwer zu rechtfertigen gewesen wäre.

Zudem geben Kaczmarek et al. zu bedenken, dass man nur die in der Zirkulation befindlichen Antikörper messen könne und solche, die am Transplantat gebunden sind, der Messung entgingen [118]. Dieser Effekt müsste wohl bei DSA am stärksten ins Gewicht fallen. Wie in Abbildung 20 illustriert, fanden sich bei unseren Patienten solche mit messbaren DSA (Säule 1) häufiger CAV-erkrankt als die anderen dargestellten Gruppen, was in diesem Kontext auf eine Sättigung des Allografts zurückzuführen sein könnte. Auch hier wären allerdings eher serielle Messungen, idealerweise in *LABScreen® PRA*- und *Single Antigen*-Test unter Berücksichtigung der zeitlichen Dynamik von MFI-Werten der DSA und des Koronargefäßstatus geeigneter.

Die von uns festgestellte signifikante Häufung von Patienten mit erhöhtem linksventrikulärem enddiastolischem Druck in der CAV-Gruppe deckt sich mit Beobachtungen anderer Forschungsgruppen, dass im Rahmen der Pathophysiologie der CAV eine restriktive hämodynamische Situation zu entstehen scheint [92, 93]. Zur Entstehung der myokardialen und vaskulären Fibrose des Spenderherzens als Zeichen der CAV kann diese Arbeit allerdings keine Informationen bieten. Beide sind sicherlich zumindest anteilig als Reaktion des Allografts auf die sich durch die CAV verschlechternde Sauerstoffversorgung zu verstehen. Da allerdings auch HLA-Klasse II-Antikörper signifikant häufiger bei Patienten mit pathologischem LVEDP zu finden waren, ist eine Beteiligung dieser Antikörper anhand unserer Daten nicht auszuschließen. Denkbar wäre, dass HLA-Antikörper über verschiedene Mechanismen neben zellulären Bestandteilen des Immunsystems einen weiteren persistierenden Schädigungsreiz darstellen, die verstärkte Produktion extrazellulärer Bindegewebssubstanz fördern und letztlich zur Abnahme der Ventrikelcompliance führen. Da HLA-Klasse II-Merkmale allerdings lediglich in Zellen der Gefäßwand des Allografts exprimiert werden, dürften HLA-Klasse II-Antikörper weniger ein unabhängiger Einflussfaktor erhöhter LVEDP-Werte sein, sondern ein Teil der pathophysiologischen Sequenz der CAV, der den hämodynamischen Veränderungen vorausgeht.

#### 4.2 HLA-Antikörper als pathophysiologisches Element der CAV

Dies kann aufgrund der hier verwendeten statistischen Methoden und des Studiendesigns jedoch nur vermutet werden. Hilfreich wären an dieser Stelle weitere experimentelle Arbeiten über die Effekte von HLA-Antikörpern auf verschiedene Zellen des Allografts und eine Korrelation dieser Ergebnisse mit longitudinalen klinischen Studien unter Betrachtung hinreichend großer Fallzahlen, die einer multivariaten statistischen Untersuchung zugänglich sind.

### **4.3 HLA-Antikörperdetektion durch die Luminex®-Technologie und deren Testeigenschaften als Biomarker in der CAV-Diagnostik**

Ein Teil der Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit war die Validierung der Luminex®-Technologie als Biomarker zur Detektion CAV-betroffener Patienten.

Wie in Kapitel 3.4 dargestellt, zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen HLA-Klasse I-Antikörpern und der CAV. Trotz einer signifikanten positiven Korrelation zwischen MFI-Wert und CAV-Score ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den MFI-Mittelwerten der einzelnen CAV-Subgruppen im Luminex®-Screening auf HLA-Klasse I-Antikörper beobachten. Auch deren ROC-Kurve erreichte, wenn auch nur knapp, nicht die geforderte Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$ . Weiterhin konnte auch unter Verschieben des Cutoffs keine statistisch signifikante Trennung von CAV-Patienten und Kontrollpatienten durch Betrachten des HLA-Klasse I-Antikörperstatus erreicht werden. Der Cutoff, bei dem die minimale Irrtumswahrscheinlichkeit ( $p = 0,0747$ ) erzielt werden konnte, lag bei einer MFI von 5. Hier betrug die Sensitivität 7,5 %, die Spezifität 100 %, die positiven und negativen prädiktiven Werte betragen hier 100 % und 59 % (s. Kapitel 3.6.2). Unter isolierter Betrachtung eignen sich HLA-Klasse I-Antikörper diesen Ergebnissen zufolge nur bedingt als Biomarker in der Diagnostik der CAV, auch wenn hohe MFI-Werte einen mehr oder minder validen Hinweis geben könnten.

Im Gegensatz dazu bietet diese Studie zum Zusammenhang von HLA-Antikörpern gegen Merkmale der Klasse II mit der CAV eine statistisch hinreichend belastbare Grundlage, um deren mögliche Verwendung als Biomarker in der CAV-Diagnostik genauer zu betrachten. Wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben, lag der Verteilung dieser Antikörper auf Fall- und Kontrollpatienten ein sehr signifikanter Unterschied zugrunde. Ebenso zeigte sich eine hochsignifikante positive Korrelation zwischen dem MFI-Wert des Luminex®-HLA-Klasse II-Antikörperscreenings und dem CAV-Score.

#### 4.3 HLA-Antikörperdetektion durch die Luminex®-Technologie und deren Testeigenschaften als Biomarker in der CAV-Diagnostik

Weiterhin ergab die Varianzanalyse, dass sich die MFI-Mittelwerte der unterschiedlichen CAV-Subgruppen auf hohem Signifikanzniveau unterschieden, und auch Mehrfachvergleiche nach Tukey erbrachten stets signifikante Ergebnisse (s. Kapitel 3.6.1 und Abbildung 21). Auch für die in Abbildung 23 dargestellte ROC-Kurve und deren AUC von 0,7127 wurde eine geringe Irrtumswahrscheinlichkeit beobachtet ( $p < 0,001$ ).

Wie bereits beschrieben, zeigte sich beim hausinternen Cutoff von 3 eine Sensitivität von 35 %, während die Spezifität bei 89 % lag. Die positiven und negativen prädiktiven Werte betragen hier 70 % und 65 %. Unter Veränderung des Cutoffs auf eine MFI von 7 wurden die größten Unterschiede zwischen Fall- und Kontrollpatienten beobachtet ( $p < 0,001$ ). Angesichts dieser Zusammenhänge sollte der im Luminex®-Screening auf HLA-Klasse II-Antikörper generierte MFI-Wert nicht nur als nominale Variable betrachtet werden, da dessen Höhe und die daran geknüpften Testwahrscheinlichkeiten wichtige, in der CAV-Diagnostik nutzbare Informationen enthalten.

Da gerade bei Kindern die Indikation zur Koronarangiographie aufgrund ihrer Invasivität zurückhaltend gestellt werden sollte, bietet der positive Vorhersagewert bei Vorliegen von HLA-Klasse II-Antikörpern ein für den Kliniker wichtiges potenzielles Instrument, um die Indikation zur Angiographie zu untermauern. Abbildung 24 illustriert, dass mit steigendem MFI-Wert sehr hohe positive Vorhersagewerte erreicht werden konnten. Bei einer MFI von beispielsweise 7 konnte bei unseren Patienten eine CAV mit 92 % Wahrscheinlichkeit und einem Chancenverhältnis von 20,1 angenommen werden. Patienten mit  $MFI > 80$  ( $n = 6$ ) zeigten sich darüber hinaus zu 100 % CAV-erkrankt.

Angesichts einer Sensitivität von 35 % bei einem Cutoff von 3 und 28 % bei einem Cutoff von 7 scheint die Verwendung des Luminex® als Screeningtest für die CAV nicht geeignet. Hohe MFI im Kontext einer hohen Vortestwahrscheinlichkeit, beispielsweise bei Patienten im Status nach ACR und lange zurückliegender Transplantation, dürften jedoch trotzdem die Verdachtsdiagnose und die Indikationsstellung zur Herzkatheteruntersuchung stützen.

#### 4.3 HLA-Antikörperdetektion durch die Luminex®-Technologie und deren Testeigenschaften als Biomarker in der CAV-Diagnostik

Schneidet ein Patient trotz hoher Vortestwahrscheinlichkeit und gegebenen Risikofaktoren negativ ab, wäre im Kontext der limitierten Sensitivität von einem falsch negativen Ergebnis auszugehen. Zusätzliche Informationen über den Posttransplantationsverlauf und Risikofaktoren bleiben daher bei der Interpretation unerlässlich.

Anhand der hohen Spezifität des Tests, welche bei einem Cutoff von 3 bei 89 % und ab MFI-Werten > 10 bei über 98 % gemessen wurde, ist mit einer einhergehenden hohen Rate an richtig negativen Patienten zu rechnen. Die Abwesenheit von HLA-Klasse II-Antikörpern im Luminex®-Screening kann deshalb, gerade im Falle einer geringen Vortestwahrscheinlichkeit, zu einem sicheren Ausschluss der Erkrankung beitragen. Da bei einem nicht unerheblichen Teil von HTx-Patienten eine CAV vorlag, ohne dass Risikofaktoren vorgelegen hätten, sollte auch bei niedriger Vortestwahrscheinlichkeit angesichts des Nachweises HLA-Klasse II-Antikörpern an das Vorliegen einer CAV gedacht werden. Dies gilt speziell, wenn hohe MFI-Werte beobachtet werden.

Da die Angiographie, der Goldstandard in der CAV-Diagnostik, aufgrund der diffusen und distalen Manifestation der CAV selbst nur über eine limitierte Sensitivität verfügt, könnte ein HLA-Klasse II-Antikörpernachweis der Manifestation einer angiographisch nachweisbaren CAV möglicherweise vorausgehen und die Angiographie ergänzen. Nicht zuletzt, da die CAV mitunter einen sehr progressiven Verlauf zeigen kann, wären mögliche Konsequenzen des Antikörpernachweises eine Erhöhung der Frequenz von Kontrollangiographien und eine Anpassung der immunsuppressiven Therapie. Der Einsatz der HLA-Antikörperanalytik könnte darüber hinaus in der Differentialdiagnostik bei Symptomen einer Graftinsuffizienz bei Langzeitüberlebenden als Hinweis auf eine CAV-Erkrankung dienen.

Auch die Antikörperdifferenzierung, welche in unserem Algorithmus dem Screening nachgeschaltet war, kann weitere Informationen zum CAV-Status beisteuern. Zunächst ist im Rahmen der Validierung des Luminex die im *LabScreen® PRA*-Test aufgefallene Anzahl negativer Seren, denen ein positives Screeningresultat vorausging, zu diskutieren. Erwartungsgemäß hätte, da in beiden Tests die verwendeten Beads beide mit aufgereinigtem HLA-Antigen in natürlicher Konformation aus humanen Zelllinien beschichtet sind, der *LabScreen® PRA*-Test auch in diesen Fällen ein positives Ergebnis erbringen müssen. Herstellerangaben zufolge zeichnet sich der *LabScreen® PRA*-Test

#### 4.3 HLA-Antikörperdetektion durch die Luminex®-Technologie und deren Testeigenschaften als Biomarker in der CAV-Diagnostik

im Vergleich zum Screening durch eine höhere Spezifität aus. Colombo et al. zeigten in einer Studie an NTx-Wartelistenpatienten, dass unter Verwendung eines ähnlichen Algorithmus, wie ihn unser HLA-Labor verwendet, eine beträchtliche Anzahl screeningpositiver Seren durch anschließende Analyse im *PRA*®-Test als falsch-positiv identifiziert werden konnte [130]. Aus Abbildung 20 geht unter Betrachtung des Endpunkts CAV hervor, dass 11 der 12 CAV-negativen Patienten mit positivem Screeningbefund entweder einen positiven vPRA-Wert ohne spezifischen Antikörpernachweis (Säule 3) oder gar einen negativen vPRA-Wert (Säule 4) präsentierten. Dies unterstreicht die Bedeutung des *LabScreen*® *PRA*-Tests in der Identifizierung falsch positiver Screeningergebnisse, obschon unter diese Befundkonstellation auch 3 CAV-Patienten als falsch positiv bezeichnet worden wären. Wie Abbildung 18 zu entnehmen ist, sind im Gegensatz zum *LabScreen*® *PRA* keine negativen Ergebnisse im *Single Antigen*®-Test entstanden. Bei Screeningergebnissen mit MFI-Werten > 20 könnte womöglich also von einem tatsächlichen Vorliegen spezifischer Antikörper ausgegangen und direkt eine Differenzierung mittels *LabScreen*® *Single Antigen* abgeschlossen werden. Der Algorithmus, Seren mit einem MFI von 3-20 mittels *LabScreen*® *PRA* und Seren mit einem MFI > 20 mittels *LabScreen*® *Single Antigen*® zu untersuchen, scheint angesichts dieser Daten im Kontext der CAV-Diagnostik sinnvoll.

Ob sich distale und diffus verlaufende Manifestationsformen der CAV gehäuft bei Patienten mit bestimmten Antikörperkonstellationen finden lassen, sollte als weitere Konsequenz dieser Arbeit Gegenstand zukünftiger wissenschaftlicher Studien sein. Wie bereits im vorherigen Kapitel gefordert, sind weitere Studien, welche die Zusammenhänge von HLA-Antikörpern und der CAV unter Berücksichtigung zeitlicher Aspekte beleuchten, von Nöten. In diesem Rahmen bietet sich die IVUS-Technik als sensitivere Methode unter den bildgebenden Verfahren an. Um die Testeigenschaften des Luminex® zu konkretisieren und eine bessere Validierung der diagnostischen Algorithmen zu erreichen, wären außerdem vergleichende Untersuchungen einer großen Serenzahl in *LabScreen*® *Mixed Screening*-, *PRA* und *Single Antigen-Test* notwendig.

#### 4.3 HLA-Antikörperdetektion durch die Luminex®-Technologie und deren Testeigenschaften als Biomarker in der CAV-Diagnostik

Der von uns verwendete Algorithmus und die durch die Antikörperdifferenzierung gewonnenen Informationen über den vPRA-Wert und eventuelle DSA konnten in unserem Kollektiv zu einer weiteren Eingrenzung der Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer CAV beitragen.

Wie in Kapitel 3.6 ausgeführt, bestand eine positive Korrelation zwischen vPRA-Wert und dem CAV-Score, während Varianzanalysen keine signifikanten Unterschiede zwischen den CAV-Subgruppen erbrachten. Die ROC-Analyse ergab eine AUC von 0,7083 bei einem p-Wert von 0,06734. Unter Applikation eines Cutoffs von 6 % ließ sich mit der isolierten Betrachtung des vPRA mit hinreichend geringer Irrtumswahrscheinlichkeit zwischen CAV- und Kontrollpatienten unterscheiden ( $p < 0,05$ ). Patienten mit dem Nachweis von DSA stellten sich als die Gruppe mit dem höchsten Risiko für eine CAV heraus (s. Tabelle 8).

Wie bereits durch andere Autoren wurde auch während der Datenerhebung für diese Arbeit festgestellt, dass das Fehlen oder die Unvollständigkeit der Informationen über den HLA-Phänotyp von Spender und Empfänger klinische Realität zu sein scheint. Auch unter kompletter Außerachtlassung der HLA-Merkmale des Donors ließen MFI- sowie vPRA-Wert und der Nachweis von spezifischen Antikörpern in der Differenzierung in unserem Kollektiv eine signifikante Unterscheidung zwischen Fall- und Kontrollpatienten zu. Zu einer detaillierteren Betrachtung der Testeigenschaften der verschiedenen Luminex®-Assays zur Antikörperdifferenzierung und der diagnostischen Rolle von DSA sind allerdings auch hier Studien an einer größeren Fallzahl, deren komplette HLA-Daten vorliegen, notwendig.

## 4.4 Ausblick

Nach wie vor ist die CAV der wichtigste, das Langzeitüberleben limitierende Faktor nach pädiatrischer Herztransplantation. Das Wissen um die Pathophysiologie der CAV hat zwar beachtliche Fortschritte erzielt, dennoch ist ungewiss, welchen Anteil die humorale und zelluläre Immunantwort und nichtimmunologische Faktoren zu ihrer Entstehung leisten. Da speziell pädiatrische HTx-Patienten eine sehr kleine Grundgesamtheit darstellen, besteht ein Evidenzmangel zur Rolle verschiedener HLA-Antikörper in der Pathophysiologie der CAV nach pädiatrischer HTx. Seit Einführung der Luminex®-Technologie, welche zunehmend auch methodische Fragestellungen in den Fokus gerückt hat, durchläuft die Debatte über die pathophysiologische Bedeutung und den diagnostischen Nutzen von HLA-Antikörpern darüber hinaus eine Reevaluation.

Angesichts technischer Einschränkungen, dem begrenzten Organangebot und dem extremen HLA-Polymorphismus wird eine stärkere Berücksichtigung der Histokompatibilität bei der Allokation von Herztransplantaten wohl vorerst nicht zu realisieren sein. Aufgrund der von uns gezeigten Bedeutung von DSA und ihrer möglichen diagnostischen Verwendung im Langzeitverlauf ist daher eine wichtige Konsequenz dieser Studie, dass eine Bestimmung und Archivierung der Gewebemerkmale in jedem Fall angestrebt werden sollte. Dies gilt neben den HLA-Merkmalen der Klasse I auch für HLA-Merkmale der Klasse II, insbesondere HLA-DR und -DQ. Die systematische Erfassung wäre nicht nur klinisch, sondern auch wissenschaftlich nutzbar und würde nicht zuletzt im Falle einer anstehenden Retransplantation zur Risikostratifizierung beitragen.

Die in dieser Studie beobachteten Zusammenhänge befürworten im Kontext der Ergebnisse anderer Forschungsgruppen die Hypothese, dass HLA-Antikörper einen kausalen Faktor in der Pathophysiologie der CAV darstellen. Die Analyse auf DSA zeigte, dass ein Großteil dieser sich gegen HLA-DQ-Merkmale des Donors richtete, und dass eine starke Häufung bei CAV-Patienten bestand. Dies deutet auf eine zentrale Rolle von HLA-DQ als Immunogen im Rahmen der chronischen humoralen Abstoßung und der Pathogenese der CAV hin. Weitere wissenschaftliche Anstrengungen sollten erfolgen, um die Auswirkungen von HLA-DQ-Mismatches, die Expression und Signaltransduktion von HLA-DQ im transplantierten Herzen und die biologischen Auswirkungen einer Interaktion mit HLA-Antikörpern besser zu verstehen.

Eine weitere Anforderung an anschließende Studien ist aus unserer Sicht weiterhin ein longitudinales Design mit seriellen Erhebungen von Antikörper- und Koronargefäßstatus in Kontext anderer transplantationsrelevanter Befunde. Sowohl aus wissenschaftlicher, als auch aus klinischer und diagnostischer Sicht könnte so zum Verständnis des zeitlichen Ablaufs der humoralen Immunantwort und der CAV beigetragen werden. Zum Zweck einer besseren Validierung der Luminex®-Technologie, aber auch zum Erkennen möglicher charakteristischer Antikörperbefunde im Rahmen der chronischen Abstoßungsreaktion wären vergleichende und auch hier serielle Antikörpermessungen im *LabScreen® Mixed Screening-, PRA und Single Antigen-Test* sinnvoll. Von großem wissenschaftlichem Vorteil wäre außerdem eine Koordination in Form von multizentrischen Studien, welche eine statistische Betrachtung von weitaus größeren Stichproben ermöglichen könnten. Dies wäre nicht zuletzt aufgrund des ausgeprägten HLA-Polymorphismus und den daraus entstehenden Auswirkungen auf die HLA-Kompatibilität und die Transplantatabstoßung von wertvoller Bedeutung.

Obwohl die Koronarangiographie nach wie vor als Goldstandard in der Diagnostik gilt, verfügt sie aufgrund der Morphologie der CAV-Läsionen selbst nur über eine eingeschränkte Sensitivität und birgt als invasive Methode ein nennenswertes Komplikationsrisiko. Der Einsatz von HLA-Klasse II-Antikörpern als Biomarker könnte in Zukunft zur Identifikation von Risikopatienten und zum effizienteren Einsatz der Herzkatheteruntersuchung beitragen.

## 5 Zusammenfassungen

### 5.1 Englische Zusammenfassung/Abstract

Coronary Allograft Vasculopathy (CAV) is still the most common cause for late graft failure after heart transplantation. Due to limitations in diagnostics it is often detected in progressed stages and it can frequently not be treated by interventional or surgical measures. The pathophysiology of this disease is not fully understood yet. Especially the impact of HLA antibodies as an immunological risk factor is discussed ambiguously. Particularly data from pediatric heart transplant patients is inconclusive. With the introduction of Luminex® technology, focus is also set on methodological issues. Compared to other diagnostic tools such as ELISA or CDC, Luminex® displays superior sensitivity, although execution and interpretation are poorly standardized and its clinical relevance is doubted by several authors. This study examined a possible relationship between CAV and HLA antibodies as well as Luminex® properties in CAV diagnostics in 98 pediatric heart transplant patients in a correlative cross sectional design. For this reason sera of all patients were tested for the presence of HLA antibodies via Luminex® and CDC and data from coronary angiography and other diagnostic and anamnestic features were gathered. HLA class II antibodies were significantly more prevalent in CAV affected patients than in controls (35 % vs. 11 %,  $p < 0.01$ ). In patients with donor specific antibodies, being predominantly directed against HLA-DQ, CAV was observed in all cases (100 % vs. 35 % in DSA negative patients,  $p < 0.001$ ). Furthermore, CAV was significantly associated with positive history of acute cellular rejection (95 % vs. 56 %,  $p < 0.0001$ ), elevated left ventricular enddiastolic pressure (36 % vs. 14 %,  $p < 0.05$ ) and history of capillary C4d deposition (78 % vs. 43 %,  $p < 0.001$ ). Similarly, patients with HLA class II antibodies displayed history of acute cellular rejection (90 % vs. 68 %,  $p < 0.05$ ) and elevated left ventricular enddiastolic pressure (47 % vs. 18 %,  $p < 0.05$ ) significantly more often than class II negative patients. This study demonstrates that HLA class II antibodies are a significant risk factor for CAV. ROC and cutoff analysis show that using Luminex® detected HLA antibodies as a biomarker might contribute to identifying patients at risk of CAV in routine aftercare and also substantiate the indication for coronary angiography.

## 5.2 Deutsche Zusammenfassung

Die koronare Transplantatvaskulopathie (CAV) stellt nach wie vor die häufigste Ursache für Transplantatversagen im Langzeitverlauf nach Herztransplantation dar. Aufgrund limitierter diagnostischer Alternativen wird sie oft erst in späten Stadien diagnostiziert und ist einer interventionellen oder operativen Therapie nur selten zugänglich. Die Pathophysiologie dieser Erkrankung ist bisher nicht gänzlich verstanden. Insbesondere die Rolle von HLA-Antikörpern als immunologischer Risikofaktor wird kontrovers diskutiert, und vor allem nach pädiatrischer Herztransplantation ist die Datenlage widersprüchlich. Durch die Einführung der Luminex®-Technologie in die HLA-Antikörperdiagnostik treten zudem methodische Fragestellungen in den Fokus. Im Vergleich zu herkömmlichen Methoden wie ELISA oder LCT zeichnet sich diese durch eine überlegene Sensitivität aus, allerdings sind Durchführung und Interpretation wenig standardisiert und die klinische Relevanz wird von einigen Autoren angezweifelt. In der vorliegenden Arbeit wurde an 98 pädiatrischen Herztransplantationspatienten ein möglicher Zusammenhang zwischen der CAV und HLA-Antikörpern in Form einer korrelativen Querschnittsstudie untersucht und die Testeigenschaften des Luminex® in der CAV-Diagnostik bewertet. Zu diesem Zweck wurden Seren aller Patienten mittels Luminex® und LCT auf HLA-Antikörper analysiert und neben einem aktuellen Angiographiebefund weitere anamnestische und diagnostische Merkmale erhoben. CAV-Patienten zeigten signifikant häufiger HLA-Klasse II-Antikörper als die Kontrollpatienten (35 % vs. 11 %,  $p < 0,01$ ). Bei Patienten mit donorspezifischen Antikörpern, deren Mehrheit sich gegen HLA-DQ richtete, lag in allen Fällen eine CAV-Erkrankung vor (100 % vs. 35 % bei DSA-negativen Patienten,  $p < 0,001$ ). Weiterhin zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen der CAV und stattgehabten akuten zellulären Abstoßungen (95 % vs. 56 %,  $p < 0,0001$ ), erhöhten linksventrikulären Füllungsdrücken (36 % vs. 14 %,  $p < 0,05$ ) und kapillärer C4d-Deposition in der Anamnese (78 % vs. 43 %,  $p < 0,001$ ). Ebenso zeigte sich bei Patienten mit HLA-Klasse II-Antikörpern eine signifikante Häufung von stattgehabten akuten zellulären Abstoßungen (90 % vs. 68 %,  $p < 0,05$ ) und erhöhten linksventrikulären Füllungsdrücken (47 % vs. 18 %,  $p < 0,05$ ). Die vorliegende Studie zeigt, dass HLA-Klasse II-Antikörper ein signifikanter Risikofaktor für die CAV sind. ROC- und Cutoffanalysen befürworten die Verwendung von HLA-Antikörpern via Luminex als Biomarker in der CAV-Diagnostik, um Risikopatienten frühzeitiger zu erkennen und die Indikationsstellung zur Herzkatheteruntersuchung verbessern.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

ACR	Akute zelluläre Abstoßung (engl. <i>acute cellular rejection</i> )
ADCC	Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (engl. <i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i> )
AMR	Antikörpervermittelte Abstoßung (engl. <i>antibody mediated rejection</i> )
APC	Antigenpräsentierende Zelle (engl. <i>antigen presenting cell</i> )
AUC	Fläche unterhalb der Kurve (engl. <i>area under the curve</i> )
BC	B-Lymphozyt (engl. <i>B-cell</i> )
CAV	Koronare Transplantatvaskulopathie (engl. <i>coronary allograft vasculopathy</i> )
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CM	Kardiomyozyt (engl. <i>cardiomyocyte</i> )
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt (engl. <i>cytotoxic T-lymphocyte</i> )
DC	Dendritische Zelle (engl. <i>dendritic cell</i> )
DSA	Donorspezifischer Antikörper
DTT	Dithiothreitol
EC	Endothelzelle (engl. <i>endothelial cell</i> )
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
g	Konstante für die Erdbeschleunigung (ca. 9,81 m/s <sup>2</sup> )
HBGF	<i>heparine binding growth factor</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HTx	Herztransplantation
HU	Hohe Dringlichkeit (engl. <i>high urgency</i> )
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IGF-1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
IL	Interleukin
ISHLT	<i>International Society for Heart and Lung Transplantation</i>

kDa	Kilodalton, Gewichtseinheit (definiert als 1/12 der Masse des <sup>12</sup> C-Isotops)
KI	Konfidenzintervall
LCT	Lymphozytotoxizitätstest (engl. <i>lymphocytotoxicity test</i> )
LVEDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (engl. <i>left ventricular enddiastolic pressure</i> )
MAC	Membranangriffskomplex (engl. <i>membrane attack complex</i> )
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität (engl. <i>mean fluorescence intensity</i> )
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MP	Makrophage
MRT	Magnetresonanztomographie
NG	Neutrophiler Granulozyt
NK	Natürliche Killerzelle
ns	nicht signifikant
NTx	Nierentransplantation
OR	Quotenverhältnis (engl. <i>odds ratio</i> )
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PRA	<i>panel reactive antibodies</i>
R	Spannweite (engl. <i>range</i> )
ROC	<i>receiver operator characteristics</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SD	Standardabweichung (engl. <i>standard deviation</i> )
SMC	Glatte Muskelzelle (engl. <i>smooth muscle cell</i> )
SPA	Festphaseassay (engl. <i>solid phase assay</i> )
TGF-β	<i>transforming growth factor β</i>
TH	T-Helferzelle
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
U/Min.	Umdrehungen pro Minute
vPRA	<i>virtual panel reactive antibodies</i>

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Häufigkeit der zur HTx führenden Grunderkrankungen innerhalb einzelner Altersgruppen nach [4, 5] .....	8
Abbildung 2 Überlebensraten nach HTx in Abhängigkeit des Zeitraums der Transplantation nach [3].....	11
Abbildung 3 Vergleich der Überlebensraten pädiatrischer und erwachsener Patienten gruppiert nach Alter zum Zeitpunkt der HTx nach [23, 24].....	12
Abbildung 4 Polymorphismus der einzelnen HLA-Klassen und -Loci nach [36] .....	14
Abbildung 5 Genkarte des MHC auf Chromosom 6 nach [37].....	14
Abbildung 6 Struktur und Funktion der HLA-Moleküle nach [38].....	16
Abbildung 7 Direkte und indirekte Antigenerkennung durch T-Zellen nach [48, 50] ....	20
Abbildung 8 Histologische Befunde der akuten zellulären Abstoßung (H&E-Färbung) nach [61].....	25
Abbildung 9 Histologische und immunpathologische Befunde bei akuter humoraler Abstoßung nach [61].....	25
Abbildung 10 Prävalenz der CAV bei pädiatrischen (oben) und erwachsenen (unten) Patienten subgruppiert nach Alter zum Zeitpunkt der HTx nach [4, 5] ...	27
Abbildung 11 Angiographische, sonographische und histopathologische Befunde der CAV nach [99-101].....	33
Abbildung 12 Pathophysiologische Mechanismen von HLA-Antikörpern nach HTx nach [48, 105] .....	36
Abbildung 13 Schematische Darstellung der Funktionsweisen von LCT und Microbead-Array (Luminex®) nach [107, 131].....	38

Abbildung 14 Häufigkeit der CAV-Schweregrade im Studienkollektiv .....	59
Abbildung 15 Prävalenz der CAV gruppiert nach der Dauer der Nachverfolgungszeit	60
Abbildung 16 Darstellung der Panelreaktivität für Patienten mit positivem LCT-Ergebnis vor und nach DTT-Inkubation. ....	61
Abbildung 17 Mittlere MFI-Werte plus Standardabweichung aller, positiver und negativer Patienten im Luminex®-Screening auf Anti-HLA-Klasse I-, Anti-HLA-Klasse II- und Anti-MICA-Antikörper.....	62
Abbildung 18 vPRA-Werte der Antikörperdifferenzierung .....	63
Abbildung 19 Antikörperprävalenzen ermittelt durch LCT und Luminex®-HLA-Antikörperscreening in CAV-Fall- und –Kontrollgruppe.....	65
Abbildung 20 Häufigkeit der CAV in Abhängigkeit von vPRA und Antikörpernachweis in der Luminex®-Antikörperdifferenzierung. ....	67
Abbildung 21 MFI-Mittelwerte und Standardabweichungen der CAV-Subgruppen im Luminex-Screening auf HLA-Klasse I- und HLA-Klasse II-Antikörper ....	73
Abbildung 22 vPRA-Mittelwerte und Standardabweichungen der in der Antikörperdifferenzierung untersuchten Patienten und deren gruppenspezifische Unterschiede.....	74
Abbildung 23 ROC-Kurven des MFI-Werte aus dem Luminex®-Screening auf HLA-Antikörper in der Detektion von CAV-Patienten.....	75
Abbildung 24 Testeigenschaften des MFI-Werts des Luminex®-Screenings auf HLA-Antikörper der Klasse I und der Klasse II in der Detektion von CAV-Patienten in Abhängigkeit des Cutoffs.....	76
Abbildung 25 ROC-Kurve des vPRA-Werts zur Detektion von CAV-Patienten .....	77
Abbildung 26 Testeigenschaften des vPRA-Werts der Luminex®-Differenzierung in der Detektion von CAV-Patienten in Abhängigkeit des Cutoffs. ....	77

## 6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Klassifikation der akuten zellulären und akuten humoralen Abstoßung nach HTx nach [59, 61] .....	24
Tabelle 2 Morphologische Unterschiede zwischen der KHK und der CAV nach [6] ....	30
Tabelle 3 Methodische Eigenschaften des LCT und des Luminex in der HLA-Antikörperdiagnostik [38, 62] .....	42
Tabelle 4 Studienlage zur Beziehung zwischen HLA-Antikörpern, der humoralen Abstoßung und der CAV .....	44
Tabelle 5 Schema zur Bewertung der Reaktivität eines Serums mit Testzellen im LCT nach [7] .....	53
Tabelle 6 Basisdaten des Patientenkollektivs .....	58
Tabelle 7 Ergebnisse der HLA-Antikörperdifferenzierung in Zusammenhang mit MFI-Werten des HLA-Antikörperscreenings und dem CAV-Score. ....	64
Tabelle 8 Häufigkeit der CAV in An- und Abwesenheit von donorspezifischen Antikörpern. ....	68
Tabelle 9 Prävalenz isolierter donorspezifischer Antikörper gegen HLA-Merkmale der Klasse I, Klasse II und beide Klassen in CAV-Fall- und –Kontrollgruppe. ...	69
Tabelle 10 Basisdaten sowie histopathologische, bildgebende und hämodynamische Diagnostika in Abhängigkeit des CAV-Status.....	70
Tabelle 11 Basisdaten, Histopathologie, Bildgebung und Hämodynamik in Abhängigkeit des Luminex®-HLA-Antikörperscreenings .....	71

## 6.4 Literaturverzeichnis

- [1] Barnard CN. The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town. S. Afr. Med. J. 1967;41 (48): 1271-4.
- [2] Columbia University Department of Surgery. A Brief History of Heart Transplantation. Columbia University Medical Center, Department of Surgery, New York. Online verfügbar unter: <http://columbiasurgery.org/heart-transplant/brief-history-heart-transplantation> (Stand: 01.09.2015).
- [3] ISHLT. 2014 Pediatric Heart Transplantation Slides. JHLT. 2014; 33(10): 985-995. Online verfügbar unter: <http://ishlt.org/registries/slides.asp?slides=heartLungRegistry> (Stand: 01.09.2015).
- [4] ISHLT. 2013 ISHLT Pediatric Heart Transplantation Slides. JHLT. 2013; 32(10): 979-988. Online verfügbar unter: <http://www.ishlt.org/registries/slides.asp?slides=heartLungRegistry> (Stand: 01.09.2015).
- [5] ISHLT. 2013 ISHLT Adult Heart Transplantation Slides. JHLT. 2013 Oct; 32(10): 951-964. Online verfügbar unter: <http://www.ishlt.org/registries/slides.asp?slides=heartLungRegistry> (Stand: 01.09.2015).
- [6] Schmid C, Hirt S, Scheld HH. Leitfaden Herztransplantation. 3. Aufl. Steinkopff-Verlag, Darmstadt: 2009. ISBN-13: 978-3798518728.
- [7] Banas B, Breidenbach T. Organspende und Transplantationsmedizin XXS pocket. 1. Aufl. Börm-Bruckmeier-Verlag, Grünwald: 2011. ISBN-13: 978-3898625388.
- [8] Eurotransplant International Foundation. Annual Report 2013. Online verfügbar unter: <http://www.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=AR20135.pdf> (Stand: 01.09.2015).

- [9] Bundesärztekammer. Richtlinien für die Wartelistenführung und Organvermittlung zur Herz- und Herz-Lungen-Transplantation. 2013. Online verfügbar unter: [http://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user\\_upload/downloads/Herz-Lunge\\_09122013.pdf](http://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/downloads/Herz-Lunge_09122013.pdf) (Stand: 01.09.2015)
- [10] Eurotransplant International Foundation. Eurotransplant Manual: Chapter 6 ET Thoracic Allocation System. Online verfügbar unter: <https://www.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=H6+EThAS+-++July+28%2C+20151.pdf> (Stand: 01.09.2015).
- [11] Smits JM, Thul J, Pauw M de, Delmo Walter E, Strelniece A, Green D et al. Pediatric heart allocation and transplantation in Eurotransplant. *Transpl. Int.* 2014; 27 (9): 917-25.
- [12] Osaki S, Edwards NM, Johnson MR, Velez M, Munoz A, Lozonschi L et al. Improved survival after heart transplantation in patients with bridge to transplant in the recent era: a 17-year single-center experience. *J. Heart Lung Transplant.* 2009; 28 (6): 591-7.
- [13] Opelz G, Wujciak T, Döhler B, Scherer S, Mytilineos J. HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study. *Rev Immunogenet* 1999; 1 (3): 334-42.
- [14] Hosenpud JD, Edwards EB, Lin HM, Daily OP. Influence of HLA matching on thoracic transplant outcomes. An analysis from the UNOS/ISHLT Thoracic Registry. *Circulation* 1996; 94 (2): 170-4.
- [15] Costanzo-Nordin MR. Cardiac allograft vasculopathy: relationship with acute cellular rejection and histocompatibility. *J. Heart Lung Transplant.* 1992; 11 (3 Pt 2): 90-103.
- [16] Hosenpud JD, Boyle TM, Hensler H, Sanford G, Khanna AK. The relationship between acute rejection and chronic rejection is highly dependent on specific MHC matching: a multi-strain rat heterotopic heart transplant study. *Transplantation* 2000; 69 (10): 2173-8.

- [17] Richard Kirk et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Fourteenth Pediatric Heart Transplantation Report 2011. *J. Heart Lung Transplant*: 1095-103.
- [18] Paolillo JA, Boyle GJ, Law YM, Miller SA, Lawrence K, Wagner K et al. Posttransplant diabetes mellitus in pediatric thoracic organ recipients receiving tacrolimus-based immunosuppression. *Transplantation* 2001; 71 (2): 252-6.
- [19] Boucek MM, Aurora P, Edwards LB, Taylor DO, Trulock EP, Christie J et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: tenth official pediatric heart transplantation report 2007. *J. Heart Lung Transplant*. 2007; 26 (8): 796-807.
- [20] Yusen RD, Christie JD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirtieth Adult Lung and Heart-Lung Transplant Report 2013; focus theme: age. *J. Heart Lung Transplant*. 2013; 32 (10): 965-78.
- [21] Eba H, Hathout et al. Pediatric Post-Transplant Diabetes: Data From a Large Cohort of Pediatric Heart-Transplant Recipients. *Am J Transplant*. 2003; 3 (8): 994-8.
- [22] Haug C, Duell T, Voisard R, Lenich A, Kolb HJ, Mickley V et al. Cyclosporine A stimulates endothelin release. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1995; 26 (Suppl 3): 239-41.
- [23] ISHLT. 2014 ISHLT Adult Heart Transplantation Slides. *JHLT*. 2014; 33(10): 996-1008. Online verfügbar unter:  
<http://www.isHLT.org/registries/slides.asp?slides=heartLungRegistry>  
(Stand: 01.09.2015).
- [24] ISHLT. 2014 ISHLT Pediatric Heart Transplantation Slides. *JHLT*. 2014; 33(10): 985-995. Online verfügbar unter:  
<http://www.isHLT.org/registries/slides.asp?slides=heartLungRegistry>  
(Stand: 01.09.2015).

- [25] Roussel JC, Baron O, Périgaud C, Bizouarn P, Pattier S, Habash O et al. Outcome of heart transplants 15 to 20 years ago: graft survival, post-transplant morbidity, and risk factors for mortality. *J. Heart Lung Transplant.* 2008; 27 (5): 486-93.
- [26] John R, Rajasinghe HA, Chen JM, Weinberg AD, Sinha P, Mancini DM et al. Long-term outcomes after cardiac transplantation: an experience based on different eras of immunosuppressive therapy. *Ann. Thorac. Surg.* 2001; 72 (2): 440-9.
- [27] McGiffin DC, Kirklin JK, Naftel DC, Bourge RC. Competing outcomes after heart transplantation: a comparison of eras and outcomes. *J. Heart Lung Transplant.* 1997; 16 (2): 190-8.
- [28] Juan M. Aranda JMD, and James Hill MM. Cardiac Transplant Vasculopathy. *Chest* 2000 (118): 1792-800.
- [29] Zimmer RJ, Lee MS. Transplant Coronary Artery Disease. *JACC: Cardiovascular Interventions* 2010; 3 (4): 367-77.
- [30] Gibson T, Medawar PB. The fate of skin homografts in man. *J. Anat.* 1943; 77 (Pt 4): 299-310.4.
- [31] Payne R. Leukocyte agglutinins in human sera; correlation between blood transfusions and their development. *AMA Arch Intern Med* 1957; 99 (4): 587-606.
- [32] Amos DB. The agglutination of mouse leucocytes by iso-immune sera. *Br J Exp Pathol* 1953; 34 (4): 465-70.
- [33] van Rood JJ. Women, pregnancy and serendipity: a personal story about the discovery of HLA. *J. Nephrol.* 2004; 17 (3): 467-74.
- [34] Jean Dausset. Iso-Leuco-Anticorps. *Acta Haematol.* 1958; 20: 156-66.
- [35] Dausset J. Leuco-Agglutinins and Blood Transfusion. *Vox Sanguinis* 1954 (4): 190-8.
- [36] Robinson J et al. The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic Acids Research*, 2015; 43 (43): 423-431.

- [37] Mehra N, Kaur G. MHC-based vaccination approaches: progress and perspectives. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2003; 5: 1-17. Online verfügbar unter:  
[http://journals.cambridge.org/fulltext\\_content/ERM/ERM5\\_07/S1462399403005957sup001.pdf](http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM5_07/S1462399403005957sup001.pdf) (Stand: 01.09.2015).
- [38] Wassmuth R. *Primer on the HLA system: basic concepts - medical relevance - laboratory methods - quality management*. Ecomed Medizin, Heidelberg, München, Landsberg, Frechen, Hamburg 2010; 1. Aufl.: ISBN-13: 978-3609163161.
- [39] Atkinson C, Floerchinger B, Qiao F, Casey S, Williamson T, Moseley E et al. Donor brain death exacerbates complement-dependent ischemia/reperfusion injury in transplanted hearts. *Circulation* 2013; 127 (12): 1290-9.
- [40] Land W. MK. The Impact on Ischemia/Reperfusion Injury on Specific and Non-Specific, Early and Late Chronic Events after Organ Transplantation. *Transpl. Rev.* 1996; 10 (2): 108-127.
- [41] Linfert D, Chowdhry T, Rabb H. Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury. *Transplant Rev (Orlando)* 2009; 23 (1): 1-10.
- [42] Kaczorowski DJ, Nakao A, Mollen KP, Vallabhaneni R, Sugimoto R, Kohmoto J et al. Toll-like receptor 4 mediates the early inflammatory response after cold ischemia/reperfusion. *Transplantation* 2007; 84 (10): 1279-87.
- [43] Busche MN, Pavlov V, Takahashi K, Stahl GL. Myocardial ischemia and reperfusion injury is dependent on both IgM and mannose-binding lectin. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2009; 297 (5): H1853-9.
- [44] Walsh MC, Bourcier T, Takahashi K, Shi L, Busche MN, Rother RP et al. Mannose-binding lectin is a regulator of inflammation that accompanies myocardial ischemia and reperfusion injury. *J. Immunol.* 2005; 175 (1): 541-6.
- [45] Collard CD, Montalto MC, Reenstra WR, Buras JA, Stahl GL. Endothelial oxidative stress activates the lectin complement pathway: role of cytokeratin 1. *Am. J. Pathol.* 2001; 159 (3): 1045-54.

- [46] Adams PW, Lee HS, Waldman WJ, Sedmak DD, Morgan CJ, Ward JS et al. Alloantigenicity of human endothelial cells. 1. Frequency and phenotype of human T helper lymphocytes that can react to allogeneic endothelial cells. *J. Immunol.* 1992; 148 (12): 3753-60.
- [47] Baldwin WM, Samaniego-Picota M, Kasper EK, Clark AM, Czader M, Rohde C et al. Complement deposition in early cardiac transplant biopsies is associated with ischemic injury and subsequent rejection episodes. *Transplantation* 1999; 68 (6): 894-900.
- [48] Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. Garland Publishing Inc. New York 2001, 5. Aufl.: ISBN-10: 081533642X.
- [49] Herrera OB, Golshayan D, Tibbott R, Salcido Ochoa F, James MJ, Marelli-Berg FM et al. A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J. Immunol.* 2004; 173 (8): 4828-37.
- [50] Ali JM, Bolton EM, Bradley JA, Pettigrew GJ. Allorecognition pathways in transplant rejection and tolerance. *Transplantation* 2013; 96 (8): 681-8.
- [51] Game DS, Lechler RI. Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance. *Transpl. Immunol.* 2002; 10 (2-3): 101-8.
- [52] Rodica Ciubotariu. Persistent Allopeptide Reactivity and Epitope Spreading in Chronic Rejection of Organ Allografts. *Journal of Clinical Investigation* 1998; 101 (15): 398-405.
- [53] Suci-Foca N, Harris PE, Cortesini R. Intramolecular and intermolecular spreading during the course of organ allograft rejection. *Immunol. Rev.* 1998; 164: 241-6.
- [54] Elson CJ, Barker RN, Thompson SJ, Williams NA. Immunologically ignorant autoreactive T cells, epitope spreading and repertoire limitation. *Immunol. Today* 1995; 16 (2): 71-6.

- [55] Matzinger P, Bevan MJ. Induction of H-2-restricted cytotoxic T cells: in vivo induction has the appearance of being unrestricted. *Cell. Immunol.* 1977; 33 (1): 92-100.
- [56] Valujskikh A, Zhang Q, Heeger PS. CD8 T cells specific for a donor-derived, self-restricted transplant antigen are nonpathogenic bystanders after vascularized heart transplantation in mice. *J. Immunol.* 2006; 176 (4): 2190-6.
- [57] Pietra BA, Wiseman A, Bolwerk A, Rizeq M, Gill RG. CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II. *J. Clin. Invest.* 2000; 106 (8): 1003-10.
- [58] David A. Baran MD et al. The International Society for Heart and Lung Transplantation Guidelines for the Care of Heart Transplant Recipients: Task Force 2: Immunosuppression and Rejection. 2010. Online verfügbar unter: [https://www.ishlt.org/ContentDocuments/ISHLT\\_GL\\_TaskForce2\\_110810.pdf](https://www.ishlt.org/ContentDocuments/ISHLT_GL_TaskForce2_110810.pdf) (Stand: 01.09.2015).
- [59] Kobashigawa J, Crespo-Leiro MG, Ensminger SM, Reichenspurner H, Angelini A, Berry G et al. Report from a consensus conference on antibody-mediated rejection in heart transplantation. *J. Heart Lung Transplant.* 2011; 30 (3): 252-69.
- [60] Taylor DO, Yowell RL, Kfoury AG, Hammond EH, Renlund DG. Allograft coronary artery disease: clinical correlations with circulating anti-HLA antibodies and the immunohistopathologic pattern of vascular rejection. *J. Heart Lung Transplant.* 2000; 19 (6): 518-21.
- [61] Stewart S, Winters GL, Fishbein MC, Tazelaar HD, Kobashigawa J, Abrams J et al. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J. Heart Lung Transplant.* 2005; 24 (11): 1710-20.
- [62] Brian D. Tait et al. Consensus Guidelines on the Testing and Clinical Management Issues Associated With HLA and Non-HLA Antibodies in Transplantation. *Transplantation (Baltimore)* 2013, 15 January 2013: 19-47.

- [63] Costanzo MR, Dipchand A, Starling R, Anderson A, Chan M, Desai S et al. The International Society of Heart and Lung Transplantation Guidelines for the care of heart transplant recipients. *J. Heart Lung Transplant.* 2010; 29 (8): 914-56.
- [64] Linda D. Sharples. Diagnostic Accuracy of Coronary Angiography in CAV. *Transplantation (Baltimore)* 2003, 27 August 2003: 679-82.
- [65] Amandeep Dhaliwal MD VTM. Cardiac Allograft Vasculopathy: The Achilles' Heel of Long-term Survival after Cardiac Transplantation. *Current Atherosclerosis Reports* 2006; 8 (2): 119-30.
- [66] Anne I. Dipchand. Ten yr of pediatric heart transplantation: A report from the Pediatric Heart Transplant Study. *Pediatr Transplant* 2013; 17 (2): 99-111.
- [67] Dipchand AI, Kirk R, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Christie JD et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Sixteenth Official Pediatric Heart Transplantation Report 2013; focus theme: age. *J. Heart Lung Transplant.* 2013; 32 (10): 979-88.
- [68] Grattan MT, Moreno-Cabral CE, Starnes VA, Oyer PE, Stinson EB, Shumway NE. Cytomegalovirus infection is associated with cardiac allograft rejection and atherosclerosis. *JAMA* 1989; 261 (24): 3561-6.
- [69] P.K. Koskinen E.A. Kallio. Cytomegalovirus Infection and Coronary Allograft Vasculopathy. *Transplant Infectious Disease* 1999; 1 (2): 115-26.
- [70] Radovancevic B, Poindexter S, Birovljev S, Velebit V, McAllister HA, Duncan JM et al. Risk factors for development of accelerated coronary artery disease in cardiac transplant recipients. *Eur J Cardiothorac Surg* 1990; 4 (6): 309-12.
- [71] Escobar A, Ventura HO, Stapleton DD, Mehra MR, Ramee SR, Collins TJ et al. Cardiac allograft vasculopathy assessed by intravascular ultrasonography and nonimmunologic risk factors. *Am. J. Cardiol.* 1994; 74 (10): 1042-6.
- [72] Gao HZ, Hunt SA, Alderman EL, Liang D, Yeung AC, Schroeder JS. Relation of donor age and preexisting coronary artery disease on angiography and intracoronary ultrasound to later development of accelerated allograft coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1997;29 (3): 623-9.

- [73] Gao SZ, Schroeder JS, Hunt SA, Valentine HA, Hill IR, Stinson EB. Influence of graft rejection on incidence of accelerated graft coronary artery disease: a new approach to analysis. *J. Heart Lung Transplant.* 1993; 12 (6 Pt 1): 1029-35.
- [74] Yamani MH, Yousufuddin M, Starling RC, Tuzcu M, Ratliff NB, Cook DJ et al. Does acute cellular rejection correlate with cardiac allograft vasculopathy? *J. Heart Lung Transplant.* 2004; 23 (3): 272-6.
- [75] Raichlin E, Edwards BS, Kremers WK, Clavell AL, Rodeheffer RJ, Frantz RP et al. Acute cellular rejection and the subsequent development of allograft vasculopathy after cardiac transplantation. *J. Heart Lung Transplant.* 2009; 28 (4): 320-7.
- [76] Hosenpud JD, Everett JP, Morris TE, Mauck KA, Shipley GD, Wagner CR. Cardiac allograft vasculopathy. Association with cell-mediated but not humoral alloimmunity to donor-specific vascular endothelium. *Circulation* 1995; 92 (2): 205-11.
- [77] Opelz G, Wujciak T. The influence of HLA compatibility on graft survival after heart transplantation. The Collaborative Transplant Study. *N. Engl. J. Med.* 1994; 330 (12): 816-9.
- [78] Galvani S, Augé N, Calise D, Thiers JC, Canivet C, Kamar N et al. HLA class I antibodies provoke graft arteriosclerosis in human arteries transplanted into SCID/beige mice. *Am. J. Transplant.* 2009; 9 (11): 2607-14.
- [79] Pardi R, Bender JR, Engleman EG. Lymphocyte subsets differentially induce class II human leukocyte antigens on allogeneic microvascular endothelial cells. *J. Immunol.* 1987; 139 (8): 2585-92.
- [80] Hosenpud JD, Morris TE, Shipley GD, Mauck KA, Wagner CR. Cardiac Allograft Vasculopathy: Preferential Regulation of Endothelial Cell-Derived Mesenchymal Growth Factors in Response to a Donor-Specific Cell-Mediated Allogeneic Response. *Transplantation (Baltimore)* 1996; 61 (6): 939-48.
- [81] Li H, Tanaka K, Oeser B, Kobashigawa JA, Tobis JM. Vascular remodelling after cardiac transplantation: a 3-year serial intravascular ultrasound study. *Eur. Heart J.* 2006; 27 (14): 1671-7.

- [82] Tsutsui H, Ziada KM, Schoenhagen P, Iyisoy A, Magyar WA, Crowe TD et al. Lumen loss in transplant coronary artery disease is a biphasic process involving early intimal thickening and late constrictive remodeling: results from a 5-year serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 2001; 104 (6): 653-7.
- [83] Robert N. Salomon et al. Human Coronary Transplantation-associated Arteriosclerosis: Evidence for a Chronic Immune Reaction to Activated Graft Endothelial Cells. *American Journal of Pathology* 1991:791-8.
- [84] Lu W, Palatnik K, Fishbein GA, Lai C, Levi DS, Perens G et al. Diverse morphologic manifestations of cardiac allograft vasculopathy: a pathologic study of 64 allograft hearts. *J. Heart Lung Transplant.* 2011; 30 (9): 1044-50.
- [85] Thauinat O, Louedec L, Dai J, Bellier F, Groyer E, Delignat S et al. Direct and indirect effects of alloantibodies link neointimal and medial remodeling in graft arteriosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26 (10): 2359-65.
- [86] Simper D, Wang S, Deb A, Holmes D, McGregor C, Frantz R et al. Endothelial progenitor cells are decreased in blood of cardiac allograft patients with vasculopathy and endothelial cells of noncardiac origin are enriched in transplant atherosclerosis. *Circulation* 2003; 108 (2): 143-9.
- [87] Fischbein MP, Yun J, Laks H, Irie Y, Fishbein MC, Bonavida B et al. Role of CD8+ lymphocytes in chronic rejection of transplanted hearts. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2002; 123 (4): 803-9.
- [88] Arbustini E, Roberts WC. Morphological observations in the epicardial coronary arteries and their surroundings late after cardiac transplantation (allograft vascular disease). *Am. J. Cardiol.* 1996;78 (7): 814-20.
- [89] E. Raichlin. Cardiac Allograft Remodeling After Heart Transplantation Is Associated with Increased Graft Vasculopathy and Mortality. *Am J Transplant* 2009; 9 (1): 132-9.

- [90] Armstrong AT, Binkley PF, Baker PB, Myerowitz PD, Leier CV. Quantitative investigation of cardiomyocyte hypertrophy and myocardial fibrosis over 6 years after cardiac transplantation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1998; 32 (3): 704-10.
- [91] Mandeep R. Mehra MD et al. International Society for Heart and Lung Transplantation working formulation of a standardized nomenclature for Cardiac Allograft Vasculopathy. *J. Heart Lung Transplant* 2010: 717-27.
- [92] Itagaki BK et al. Widespread fibrosis of myocardial and adjacent tissues causing restrictive cardiac physiology in patients needing re-do heart transplant. *J. Heart Lung Transplant.* 2007; 26 (2): 138.
- [93] Law Y, Boyle G, Miller S, Clendaniel J, Etedgui J, Beerman L et al. Restrictive hemodynamics are present at the time of diagnosis of allograft coronary artery disease in children. *Pediatr Transplant* 2006; 10 (8): 948-52.
- [94] Buendia-Fuentes F, Almenar L, Ruiz C, Vercher JL, Sánchez-Lázaro I, Martínez-Dolz L et al. Sympathetic reinnervation 1 year after heart transplantation, assessed using iodine-123 metaiodobenzylguanidine imaging. *Transplant. Proc.* 2011; 43 (6): 2247-8.
- [95] Pethig K, Heublein B, Kutschka I, Haverich A. Systemic inflammatory response in cardiac allograft vasculopathy: high-sensitive C-reactive protein is associated with progressive luminal obstruction. *Circulation* 2000; 102 (19): 233-6.
- [96] Rossano JW, Denfield SW, Kim JJ, Price JF, Jefferies JL, Decker JA et al. B-type natriuretic peptide levels late after transplant predict graft survival in pediatric heart transplant patients. *J. Heart Lung Transplant.* 2010; 29 (3): 385-6.
- [97] Dipchand AI, Bharat W, Manlhiot C, Safi M, Lobach NE, McCrindle BW. A prospective study of dobutamine stress echocardiography for the assessment of cardiac allograft vasculopathy in pediatric heart transplant recipients. *Pediatr Transplant* 2008; 12 (5): 570-6.
- [98] Pahl E, Naftel DC, Kuhn MA, Shaddy RE, Morrow WR, Canter CE et al. The impact and outcome of transplant coronary artery disease in a pediatric population: a 9-year multi-institutional study. *J. Heart Lung Transplant.* 2005; 24 (6): 645-51.

- [99] Pollack A, Nazif T, Mancini D, Weisz G. Detection and imaging of cardiac allograft vasculopathy. *JACC Cardiovasc Imaging* 2013; 6 (5): 613-23.
- [100] Dedieu N, Greil G, Wong J, Fenton M, Burch M, Hussain T. Diagnosis and management of coronary allograft vasculopathy in children and adolescents. *World J Transplant* 2014; 4 (4): 276-93.
- [101] Seki A, Fishbein MC. Predicting the development of cardiac allograft vasculopathy. *Cardiovasc. Pathol.* 2014; 23 (5): 253-60.
- [102] Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 1953; 172 (4379): 603-6.
- [103] Chinnock RE, Bailey LL. Heart transplantation for congenital heart disease in the first year of life. *Curr Cardiol Rev* 2011; 7 (2): 72-84.
- [104] Jeewa A, Dreyer WJ, Kearney DL, Denfield SW. The presentation and diagnosis of coronary allograft vasculopathy in pediatric heart transplant recipients. *Congenit Heart Dis* 2012; 7 (4): 302-11.
- [105] Victor J, Dzau, Ruediger C, Braun-Dullaeus, Daniel G, Sedding. Vascular proliferation and atherosclerosis: New perspectives and therapeutic strategies. *Nature Medicine* 2002; 8 (11): 1249-56.
- [106] Cai J, Terasaki PI, Mao Q, Pham T, El-Awar N, Lee JH et al. Development of nondonor-specific HLA-DR antibodies in allograft recipients is associated with shared epitopes with mismatched donor DR antigens. *Am. J. Transplant.* 2006; 6 (12): 2947-54.
- [107] DiameX GmbH. Werbeprospekt. Multiplexe Analytik mit Beadbasierten Assays. Online verfügbar unter:  
<https://www.yumpu.com/de/document/view/34057833/multiplexe-analytik-mit-bead-basierten-assays-progen-> (Stand: 01.09.2015).
- [108] Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vázquez LA, Lee J, El-Awar N, Alberú J. "Natural" human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. *Transplantation* 2008; 86 (8): 1111-5.

- [109] C. Süsal, P. Gombos, S. Scherer, C. Morath, M. Zeier, P. Schemmer et al. Influence of Test Technique on Sensitization Status of Patients on The Kidney Transplant Waiting List. *Am J Transplant.* 2013; 13 (8): 2075-82.
- [110] Weinstock C, Schnaidt M. The complement-mediated prozone effect in the Luminex single-antigen bead assay and its impact on HLA antibody determination in patient sera. *Int. J. Immunogenet.* 2013; 40 (3): 171-7.
- [111] Colombo MB, Haworth SE, Poli F, Nocco A, Puglisi G, Innocente A et al. Luminex technology for anti-HLA antibody screening: Evaluation of performance and of impact on laboratory routine. *Cytometry* 2007; 72 (6): 465-71.
- [112] Ho EK, Vasilescu ER, Vlad G, Marboe CC, Addonizio LJ, Suciufoca N. HLA antibodies in pediatric heart transplantation. *Pediatr Transplant* 2011; 15 (5): 458-64.
- [113] Peng DM, Law YM, Kemna MS, Warner P, Nelson K, Boucek RJ. Donor-specific antibodies: can they predict C4d deposition in pediatric heart recipients? *Pediatr Transplant* 2013; 17 (5): 429-35.
- [114] Irving C, Carter V, Parry G, Hasan A, Kirk R. Donor-specific HLA antibodies in paediatric cardiac transplant recipients are associated with poor graft survival. *Pediatr Transplant* 2011; 15 (2): 193-7.
- [115] Tambur AR, Pamboukian SV, Costanzo M, Herrera ND, Dunlap S, Montpetit M et al. The presence of HLA-directed antibodies after heart transplantation is associated with poor allograft outcome. *Transplantation* 2005; 80 (8): 1019-25.
- [116] Stastny P, Lavingia B, Fixler DE, Yancy CW, Ring WS. Antibodies against donor human leukocyte antigens and the outcome of cardiac allografts in adults and children. *Transplantation* 2007; 84 (6): 738-45.
- [117] Zhang Q, Cecka JM, Gjertson DW, Ge P, Rose ML, Patel JK et al. HLA and MICA: targets of antibody-mediated rejection in heart transplantation. *Transplantation* 2011; 91 (10): 1153-8.

- [118] Ingo Kaczmarek et al. Donor-Specific HLA Alloantibodies: Long-Term Impact on Cardiac Allograft Vasculopathy and Mortality after Heart Transplant. *Exp Clin Transplant* 2008; 6 (3): 229-35.
- [119] Yan Topilsky. Donor-Specific Antibodies to Class II Antigens Are Associated With Accelerated Cardiac Allograft Vasculopathy: A Three-Dimensional Volumetric Intravascular Ultrasound Study. *Transplantation (Baltimore)* 2013; 95 (2): 389-96.
- [120] Frank R, Molina MR, Wald JW, Goldberg LR, Kamoun M, Lal P. Correlation of circulating donor-specific anti-HLA antibodies and presence of C4d in endomyocardial biopsy with heart allograft outcomes: A single-center, retrospective study. *J. Heart Lung Transplant.* 2013; 32 (4): 410-7.
- [121] Michelle Raess et al. Donor-specific anti-HLA antibodies detected by Luminex: predictive for short-term but not long-term survival after heart transplantation. *Transplant International* 2013: 1097-107.
- [122] Hansson GK, Jonasson L, Holm J, Claesson-Welsh L. Class II MHC antigen expression in the atherosclerotic plaque: smooth muscle cells express HLA-DR, HLA-DQ and the invariant gamma chain. *Clin. Exp. Immunol.* 1986; 64 (2): 261-8.
- [123] Stemme S, Fager G, Hansson GK. MHC class II antigen expression in human vascular smooth muscle cells is induced by interferon-gamma and modulated by tumour necrosis factor and lymphotoxin. *Immunology* 1990; 69 (2): 243-9.
- [124] Hirohashi T, Uehara S, Chase CM, DellaPelle P, Madsen JC, Russell PS et al. Complement independent antibody-mediated endarteritis and transplant arteriopathy in mice. *Am. J. Transplant.* 2010; 10 (3): 510-7.
- [125] Poelzl G, Ullrich R, Huber A, Ulmer H, Antretter H, Hofer D et al. Capillary deposition of the complement fragment C4d in cardiac allograft biopsies is associated with allograft vasculopathy. *Transpl. Int.* 2005; 18 (3): 313-7.
- [126] La Elena R. Vasilescu et al. Anti-HLA antibodies in heart transplantation. *Transpl. Immunol.* 2003: 177-83.

- [127] Murata K, Fox-Talbot K, Qian Z, Takahashi K, Stahl GL, Baldwin WM et al. Synergistic deposition of C4d by complement-activating and non-activating antibodies in cardiac transplants. *Am. J. Transplant.* 2007; 7 (11): 2605-14.
- [128] Rahimi S, Qian Z, Layton J, Fox-Talbot K, Baldwin WM, Wasowska BA. Non-complement- and complement-activating antibodies synergize to cause rejection of cardiac allografts. *Am. J. Transplant.* 2004; 4 (3): 326-34.
- [129] Ho EK, Vlad G, Vasilescu ER, La Torre L de, Colovai AI, Burke E et al. Pre- and posttransplantation allosensitization in heart allograft recipients: major impact of de novo alloantibody production on allograft survival. *Hum. Immunol.* 2011; 72 (1): 5-10.
- [130] Maria Bernadette Colombo. Luminex Technology for Anti-HLA Antibody Screening Evaluation of Performance and of Impact on Laboratory Routine. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* (2007): 465-71.
- [131] Shyam Dheda, Siew Chong, Rebecca Lucy Williams, Germaine Wong and Wai Hon Lim. Detection of Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplantation and the Management of Highly Sensitised Kidney Transplant Recipients. *Current Issues and Future Direction in Kidney Transplantation*, ISBN: 978-953-51-0985-3. InTech-Verlag 2013. Online verfügbar unter:  
<http://www.intechopen.com/books/current-issues-and-future-direction-in-kidney-transplantation/detection-of-antibody-mediated-rejection-in-kidney-transplantation-and-the-management-of-highly-sens>

## 6.5 Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## **6.6 Publikationsverzeichnis**

Teilergebnisse der Studie wurden in einem Vortrag auf der 21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immungenetik 2013 in Heidelberg vorgestellt.

Eine weitere Vorstellung von Teilergebnissen der Studie erfolgte auf der 22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immungenetik 2014 in Frankfurt am Main.

Eine wissenschaftliche Publikation der Arbeit in einer Fachzeitschrift befindet sich in Arbeit.

## 6.7 Danksagungen

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. Gregor Bein dafür bedanken, dass er mir diese spannende, herausfordernde und hochinteressante Studie anvertraut hat und mir alle notwendigen Mittel zur Verfügung gestellt hat. Ebenso bedanke ich mich für die wissenschaftliche und organisatorische Unterstützung sowie die Möglichkeit, diese Studie zu publizieren.

Frau Dr. med. Sandra Wienzek-Lischka gebührt mein Dank für die außerordentlich konstruktive und freundschaftliche Zusammenarbeit, die Qualitätskontrolle meines Arbeitens, die Unterstützung bei all meinen Anliegen und die Zeit, die sie mir und dieser Arbeit in dieser wichtigen Lebensphase gewidmet hat.

Frau Katja Müller, Frau Christina Lang, Frau Marion Ernst-Schlegel, Frau Kristina Hau, Frau Beate Costa Sousa, Frau Wiebke Köhler, Frau Dorothea Ringleb-Wieden, Frau Martina Scharf möchte ich dafür danken, dass sie mich so herzlich im HLA-Labor willkommen geheißen und mir stets geholfen und zur Seite gestanden haben. Ein besonderer Dank gilt Frau Katja Müller, Frau Christina Lang und Frau Kristina Hau, denen ich einen Großteil meines Wissens über die HLA-Antikörperdiagnostik verdanke und die mich fachlich und persönlich in allen Phasen dieser Arbeit unterstützt haben.

Frau Regina Adam, Frau Marlies Götz, Frau Liane Rausch-Barnickel und Frau Beate Uredat möchte ich für die organisatorische Unterstützung danken.

Herrn Prof. Dr. med. Dietmar Schranz, Herrn Priv. Doz. Dr. med. Jürgen Bauer, Herr Dr. med. Josef Thul, Frau Dr. med. Nona Mazhari, Frau Dr. med. Anja Bennewiz und Frau Dr. med. Kachina Behnke-Hall möchte ich für die Zurverfügungstellung der Patientendaten und ihre Unterstützung bei klinischen Fragestellungen danken.

Zuletzt möchte ich mich besonders bei meiner Familie und Frau Constanze Kling bedanken, ohne deren Beistand und Hilfe mein Studium und diese Dissertation nicht möglich gewesen wären.