

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der
Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

ddPCR-basierte Quantifizierung der GcfDNA als früher Marker der Organintegrität
nach Lebertransplantation

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Lilli Greulich
aus Wiesbaden

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 18.10.2024

Inhaltsverzeichnis

1	Gender-Erklärung.....	I
2	Abkürzungsverzeichnis.....	II
3	Abbildungsverzeichnis.....	III
4	Tabellenverzeichnis.....	IV
5	Einleitung.....	1
5.1	Transplantationen (Tx).....	1
5.2	GcfDNA.....	1
5.3	ddPCR.....	2
5.4	Ziel der Arbeit.....	2
6	Literaturdiskussion.....	3
6.1	Lebertransplantation.....	3
6.1.1	Geschichte.....	3
6.1.2	Ursachen/Indikation und Häufigkeit.....	3
6.1.3	Organisatorischer Ablauf der Transplantation.....	4
6.1.4	Postoperatives Monitoring nach Lebertransplantation.....	6
6.1.5	Immunsuppression.....	8
6.1.6	Komplikationen.....	9
6.1.7	Ausblick.....	11
6.2	cfDNA.....	12
6.2.1	Anwendung nach Leber-Transplantation.....	13
6.2.2	Anwendung bei Transplantation anderer Organe (Herz/Niere/Lunge).....	17
6.2.3	Verwendung in der Tumor- und Pränatal-Diagnostik.....	18
6.2.4	Methoden zur Detektion und Quantifizierung.....	19
6.3	ddPCR.....	21

7	Material und Methode.....	23
7.1	Untersuchungsablauf.....	23
7.1.1	Erfassung des Patientenkollektivs.....	23
7.1.2	Beobachtungszeitraum.....	24
7.1.3	Vergabe der Spenderorgane und MELD-Scores.....	25
7.2	Gewinnung und Quantifizierung der GcfDNA.....	25
7.2.1	Gewinnung der Empfänger-DNA und Identifizierung geeigneter SNPs 25	
7.2.2	Gewinnung der Spender-DNA und Überprüfung der SNPs.....	27
7.2.3	Isolierung der Gesamt-cfDNA und Qualitätsprüfung.....	27
7.2.4	Quantifizierung der GcfDNA.....	28
7.3	Auswertung laborchemischer Parameter.....	29
7.4	Klinischer Verlauf und weitere Befunde.....	33
7.5	Statistik und verwendete Programme.....	36
8	Ergebnisse.....	37
8.1	Erfasstes Patientenkollektiv und Auswahl endgültiger Laborparameter.....	37
8.2	Transplantationsursachen.....	38
8.3	SNP-Auswahl und Genotypisierung von Empfängern und Spendern.....	38
8.3.1	Konstellation 1: Spender-DNA verfügbar → Genotypisierung der SNPs in der DNA von Empfängern und Spendern.....	39
8.3.2	Konstellation 2: keine Spender-DNA verfügbar → Rückrechnung des Spendergenotyps aus der Gesamt-cfDNA:.....	39
8.3.3	Endgültige Zusammensetzung der SNP-Auswahl.....	42
8.4	Ergebnisse der GcfDNA-Quantifizierungen: Höhe, zeitlicher Verlauf.....	44
8.4.1	Betrachtung des Gesamtkollektivs.....	49
8.4.2	Auffälligkeiten im GcfDNA-Verlauf.....	49
8.5	Qualitätsverifizierung der Gesamt-cfDNA-Quantifizierungen.....	50
8.6	GcfDNA im Zusammenhang mit Leber-Markern und klinischen Ereignissen	

8.6.1	GcfDNA-Dynamik versus GPT-Dynamik.....	53
8.6.2	GcfDNA-Dynamik versus Bilirubin-Dynamik.....	57
8.6.3	GcfDNA versus leberpathologische, nicht-quantitative Ereignisse.....	59
8.7	Exemplarische Patientenverläufe.....	61
8.7.1	Beispiel 1: Unkomplizierter Verlauf (Patient 17).....	61
8.7.2	Beispiel 2: Komplizierter Verlauf (Patient 10).....	64
8.7.3	Beispiel 3: Patientin mit Re-Transplantation (Patientin 12).....	71
9	Diskussion.....	80
9.1	SNPs und GcfDNA-Quantifizierungen.....	80
9.1.1	Dynamik der GcfDNA.....	82
9.1.2	Auffälligkeiten im Verlauf der GcfDNA.....	85
9.2	Verhalten der GcfDNA bei Komplikationen, Vergleich mit GPT und Bilirubin 89	
9.3	GcfDNA als Monitoringparameter der Organintegrität.....	91
9.4	Stärken der GcfDNA.....	93
9.5	Limitationen der GcfDNA.....	94
9.6	Quantifizierung mittels ddPCR.....	96
9.7	Stärken und Schwächen der Untersuchung.....	97
9.8	Schlussfolgerung.....	98
9.9	Ausblick.....	100
10	Zusammenfassung.....	101
11	Literaturverzeichnis.....	103
12	Anhang.....	108
13	Danksagung.....	111
14	Lebenslauf.....	112

1 Gender-Erklärung

In dieser Dissertation wird aufgrund der besseren Lesbarkeit bewusst auf eine geschlechtsneutrale Formulierung verzichtet. Sämtliche männlichen Schreibweisen beziehen sich dabei gleichermaßen auf alle Geschlechter.

2 Abkürzungsverzeichnis

AIH.....	<i>Autoimmunhepatitis</i>
ALT.....	<i>Alanin-Aminotransferase</i>
APDL.....	<i>Adulte polyzystische Degeneration der Leber</i>
AST.....	<i>Aspartat-Aminotransferase</i>
cfDNA.....	<i>cell-free DNA</i>
CMV.....	<i>Cytomegalie-Virus</i>
ddPCR.....	<i>droplet digital PCR</i>
EBV.....	<i>Epstein-Barr-Virus</i>
EK.....	<i>Erythrozyten-Konzentrat</i>
ERCP.....	<i>endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie</i>
FFP.....	<i>Fresh Frozen Plasma</i>
GcfDNA.....	<i>Graft-derived cell-free DNA</i>
gDNA.....	<i>genomische DNA</i>
GOT.....	<i>Glutamat-Oxalacetat-Transaminase</i>
GPT.....	<i>Glutamat-Pyruvat-Transaminase</i>
HBV.....	<i>Hepatitis-B-Virus</i>
HCC.....	<i>Hepatozelluläres Karzinom</i>
HCV.....	<i>Hepatitis-C-Virus</i>
HEV.....	<i>Hepatitis-E-Virus</i>
HSV.....	<i>Herpes-simplex-Virus</i>
HU.....	<i>High Urgency</i>
ITBL.....	<i>Ischemic Type Biliary Lesions</i>
MAF.....	<i>Minor Allel Frequenz</i>
MELD.....	<i>Model for End-stage Liver Disease</i>
MRCP.....	<i>Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie</i>
PBC.....	<i>Primär biliäre Cholangitis</i>
PCR.....	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>
PSC.....	<i>Primär sklerosierende Cholangitis</i>
PTCD.....	<i>Perkutane transhepatische Cholangiodrainage</i>
SNPs.....	<i>Single Nucleotid Polymorphismen</i>
TCMR.....	<i>T-Zell-vermittelte Abstoßung</i>
TDM.....	<i>Therapeutic Drug Monitoring</i>
Tx.....	<i>Transplantation</i>

3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - 1D-Plot nach Auslesen der Tröpfchen.....	22
Abbildung 2 - Flowchart: Untersuchungsablauf.....	25
Abbildung 3 - Flowchart: Identifizierung der geeigneten SNPs.....	28
Abbildung 4 - Qualitätsverifizierung der GcfDNA-Messung (Patient 23).....	29
Abbildung 5 - Verteilung des prozentualen Anteils des Minor Allels an der GcfDNA.	41
Abbildung 6 - Verlauf des GcfDNA-Anteils und der Transaminasen des Kollektivs...	46
Abbildung 7 - Qualitätskontrolle der fünften cfDNA-Quantifizierung von Patient 23.	52
Abbildung 8 - Korrelation GcfDNA und GPT im Kollektiv.....	54
Abbildung 9 - Korrelation für GPT und GcfDNA für Patient 13.....	55
Abbildung 10 - Korrelation von GPT und GcfDNA für Patient 11.....	56
Abbildung 11 - Korrelation von GPT und GcfDNA für Patient 10.....	56
Abbildung 12 - Korrelation von GPT und GcfDNA für Patientin 7.....	57
Abbildung 13 - Korrelation der GcfDNA des Kollektivs mit Gesamt-Bilirubin.....	58
Abbildung 14 - Korrelation von Gesamt-Bilirubin und GcfDNA für Patient 20.....	59
Abbildung 15 - Korrelation von Gesamt-Bilirubin und GcfDNA für Patient 10.....	59
Abbildung 16 - GcfDNA-Verlauf von Patient 17.....	64
Abbildung 17 - Verlauf GcfDNA, GPT und Bilirubin für Patient 17.....	64
Abbildung 18 - GcfDNA-Verlauf von Patient 10.....	69
Abbildung 19 - Verlauf GcfDNA, GPT, Gesamt-Bilirubin und CRP für Patient 10.....	70
Abbildung 20 - GcfDNA-Verlauf von Patientin 12.....	77
Abbildung 21 - Verlauf von GcfDNA, GPT und Gesamt-Bilirubin für Patientin 12.....	78
Abbildung 22 - GcfDNA-Verlauf von Patientin 7.....	88
Abbildung 23 - GcfDNA-Verlauf von Patient 15.....	89

4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Liste der ausgewerteten Laborparameter.....	31
Tabelle 2 - Ausgewertete klinische Ereignisse und Komplikationen.....	36
Tabelle 3 - Zusammensetzung des Patientenkollektivs.....	38
Tabelle 4 - Ausprägung der SNPS der Leberempfänger.....	42
Tabelle 5 - Ausprägung der SNPs der Leberspender.....	43
Tabelle 6 - Absolute cfDNA-Menge und GcfDNA-Anteile im Kollektiv.....	47
Tabelle 7 - Korrelation von GcfDNA mit GPT und Gesamt-Bilirubin.....	53
Tabelle 8 - Häufigkeit der Komplikationen im Kollektiv.....	60
Tabelle 9 - Patient 17: Labor und GcfDNA der ersten postoperativen Tage.....	63
Tabelle 10 - Patient 17: GcfDNA-Anteile der einzelnen SNPs an den Quantifizierungstagen.....	65
Tabelle 11 - Patient 10: Labor und GcfDNA der ersten postoperativen Tage.....	66
Tabelle 12 - Patient 10: GcfDNA-Anteile der einzelnen SNPs an den Quantifizierungstagen.....	69
Tabelle 13 - Ausschnitt ausgewählter Laborparameter von Patient 10.....	71
Tabelle 14 - Patientin 12: Labor und GcfDNA der ersten postoperativen Tage (Tx1).....	73
Tabelle 15 - Patientin 12: Labor und GcfDNA der ersten postoperativen Tage (Tx2).....	74
Tabelle 16 - Patientin 12: GcfDNA-Anteile der einzelnen SNPs an den Quantifizierungstagen.....	77
Tabelle 17 - Ausschnitt Patientin 12 190-215 Tage nach Tx.....	79
Tabelle 18 - Verlauf des medianen GcfDNA-Anteils des Kollektivs.....	83
Tabelle 19 - Anhang 1: Referenzbereiche der ausgewerteten Laborparameter.....	109
Tabelle 20 - Anhang 2: rs-Identifizier der genotypisierten SNPs und Nummerierung in der Untersuchung.....	110
Tabelle 21 - Anhang 3: Laborwerte von Patient 10 32-93 Tage nach Tx.....	111

5 Einleitung

5.1 Transplantationen (Tx)

Bei Vorliegen einer unheilbaren Organerkrankung ist eine Transplantation des entsprechenden Organs oft die letzte Therapiemöglichkeit für die betroffenen Patienten. Im Bereich der Leber kann eine Vielzahl von viralen, autoimmunen und onkologischen Erkrankungen dazu führen, dass die Organfunktion in einem Ausmaß irreversibel geschädigt wird, das eine Transplantation nötig macht. Häufige Ursachen sind beispielsweise Leberzirrhosen durch Alkoholabusus oder Infektionen mit Hepatitis C (HCV). Lebertransplantationen werden seit den 1960er Jahren durchgeführt, heute ist die Leber das am zweithäufigsten transplantierte Organ in Deutschland. Wurde eine Organtransplantation erfolgreich durchgeführt, so muss in regelmäßigen Abständen die Integrität und Funktion des entsprechenden Organs kontrolliert werden. Hierfür ist es essenziell, auf etablierte zuverlässige und spezifische Marker und Parameter des Monitorings zurückgreifen zu können. Für manche Organe gibt es bereits entsprechende Parameter, in anderen Fällen besteht noch Bedarf. Nach Lebertransplantation hat sich als Kontrollparameter für Organintegrität und -funktion unter anderem die Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) etabliert.

5.2 GcfDNA

Ein aktueller Forschungsansatz im Rahmen des Monitorings nach Lebertransplantation ist die Quantifizierung der „Graft-derived cell-free DNA“ (GcfDNA) im Blut der transplantierten Patienten, also die Messung der DNA des Leberspenders, welche aus dem Transplantat freigesetzt wird. Der Hintergrund dieses Ansatzes ist, dass unter Einwirkung schädigender Einflüsse auf die transplantierte Leber vermehrt Leberzellen zugrunde gehen, und die in ihnen enthaltene DNA, also die DNA des Leberspenders, in die Blutbahn der Empfänger freigesetzt wird. Die Menge dieser vom Spender stammenden zellfreien DNA und ihr Anteil an der gesamten zellfreien DNA des Leberempfängers kann quantifiziert und aus den Ergebnissen können Rückschlüsse auf die Organintegrität gezogen werden. Ob die GcfDNA den gängigen Monitoring-Parametern nach Transplantationen, wie der Lebertransplantation, überlegen ist, ist Gegenstand aktueller Forschung und Thema dieser Arbeit.

5.3 ddPCR

Der Nachweis und die Quantifizierung der GcfDNA gelingen beispielsweise mit der PCR. Neben der Real-Time-PCR besteht auch die Möglichkeit der Durchführung einer Droplet Digital PCR (ddPCR). Sie basiert auf der Technik, die zu untersuchende Probe mit PCR-Reagenzien, die fluoreszenzmarkierten Sonden enthalten, zu versetzen und anschließend in bis zu 20 000 Öltröpfchen aufzuteilen. In der Auswertung wird für jedes Tröpfchen die Fluoreszenzamplitude gemessen und daraus die in der Probe enthaltene DNA-Menge berechnet. Eine Fluoreszenz entsteht nur beim Nachweis der Ziel-DNA. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde ein hochempfindlicher ddPCR-Assay für die wiederholte Quantifizierung der GcfDNA im Blut von Leber-Empfängern entwickelt.

5.4 Ziel der Arbeit

Vor dem in diesem Kapitel beschriebenen Hintergrund hat die vorliegende Arbeit das folgende Ziel: Es soll untersucht werden, ob sich der von uns entwickelte ddPCR-Assay zur Quantifizierung der GcfDNA nach Transplantation eignet.

Dazu wurde geprüft, ob die GcfDNA den gängigen Laborparametern, exemplarisch GPT und Gesamt-Bilirubin, in Fragen des Monitorings der Organintegrität nach Leber-Transplantation ebenbürtig bzw. überlegen ist.

Hierzu sollen die folgenden Fragestellungen beantwortet werden: Wie verhält sich die GcfDNA nach einer Lebertransplantation? Wie verhält sie sich bei Vorliegen von leberpathologischen Ereignissen? Geht ein eventueller GcfDNA-Anstieg einem GPT- oder Gesamt-Bilirubin-Anstieg zeitlich voraus?

6 Literaturdiskussion

6.1 Lebertransplantation

6.1.1 Geschichte

Am 01. März 1963 führten Starzl et al. die weltweit erste Lebertransplantation am Menschen durch. Der Patient war ein dreijähriger Junge mit angeborener biliärer Atresie, welcher jedoch während der Operation aufgrund von Gerinnungsstörung und unkontrollierbarer Blutung verstarb (1). Auch die Patienten der folgenden vier Transplantationen verstarben innerhalb der ersten 23 Tage nach Transplantation (2). Für die hohe Sterblichkeit in der Anfangszeit der Lebertransplantation waren, neben anderen Ursachen, vor allem Reperfusions- bzw. Ischämieschäden am Transplantat und Organabstoßungen verantwortlich (2). Über die Jahre konnte das Kurzzeit-Überleben der Patienten sowie der transplantierten Organe sukzessive gesteigert werden. Dies war durch die Weiterentwicklung chirurgischer Techniken, den verbesserten Erhalt des Transplantats nach der Entnahme aus dem Organspender, den optimierten Einsatz bereits etablierter sowie die Entwicklung neuer Immunsuppressiva und die zunehmende Prävention postoperativer Infektionen möglich (3-6). 1989 beschrieben Starzl et al. bei 1179 lebertransplantierten Patienten eine 1- bzw. 5-Jahres-Überlebensrate von 73% bzw. 64% (7). Um das Jahr 2000 lag die 1-Jahres-Überlebensrate bereits bei über 80%, heute sind 20 Jahre nach der Transplantation Überlebensraten von bis zu 50% möglich (8, 9).

Stand 2019 werden weltweit pro Jahr über 30 000 Lebertransplantationen durchgeführt (10). Im Jahr 2022 wurden in Deutschland 748 Lebertransplantationen durchgeführt (11).

6.1.2 Ursachen/Indikation und Häufigkeit

Die Leber ist, nach der Niere, das am zweithäufigsten transplantierte Organ in Deutschland (12). Als Beispiele für die Vielzahl der Lebererkrankungen, für deren Endstadium die Transplantation oft den besten und einzig kurativen Therapieansatz darstellt, können das akute Leberversagen, Leberzirrhosen unterschiedlicher Genese oder ein früh diagnostiziertes hepatozelluläres Karzinom (HCC) genannt werden (2, 8, 10). Laut der Deutschen Stiftung Organspende waren die drei häufigsten Ursachen für Lebertransplantationen in Deutschland 2022 in absteigender Reihenfolge alkoholische Leberkrankheit, Leberfibrose bzw. -zirrhose, und bösartige Neubildungen der Leber und intrahepatischen Gallengänge (13). In den letzten Jahren ließ sich bezüglich der häufigen Ursachen eine Entwicklung weg von Hepatitis C und hin zu alkoholischer Lebererkrankung und nichtalkoholischer Fettlebererkrankung beobachten (8).

Für eine Transplantation infrage kommende Patienten müssen sorgfältig ausgewählt werden: sie sollten einerseits gesund genug sein, um die Operation zu überleben und andererseits so krank, dass die Vorteile der Transplantation die Risiken überwiegen (3). In dieser Beurteilung wird unter anderem die Mortalität eines Patienten im Falle einer ausbleibenden Transplantation berücksichtigt, welche sich über zwei Scores bestimmen lässt: der Child-Pugh-Score erlaubt, unter Einberechnung der Faktoren Bilirubin, Albumin, INR bzw. Prothrombinzeit, Aszites und hepatischer Enzephalopathie, die Klassifikation des Schweregrads einer Leberzirrhose und die Einschätzung der 1 Jahres Mortalität (14). Der im Folgenden (Kapitel 6.1.3) detaillierter beschriebene MELD-Score beschreibt die kurzfristige 3-Monats-Mortalität.

6.1.3 Organisatorischer Ablauf der Transplantation

Als zugrundeliegendes Kriterium für die Einschätzung der Erkrankungsschwere und die Reihenfolge der Patienten auf der Warteliste, verwendet die Organisation Eurotransplant, die in Deutschland und sieben weiteren europäischen Ländern für die Verteilung der Spender-Organen zuständig ist, den MELD-Score (Model for End-stage Liver Disease) (15, 16). Er beschreibt die Wahrscheinlichkeit, innerhalb der nächsten drei Monate ohne Transplantation an einer vorliegenden Lebererkrankung zu versterben (6, 17, 18). Es handelt sich um einen mathematischen Score, in den die Laborwerte für Bilirubin, INR und Kreatinin einfließen, die bei Lebererkrankungen in der Regel erhöht im Blut vorliegen. Daher steigt der MELD-Score mit der Schwere

der Lebererkrankung und der Mortalität (3, 18). Möglich sind MELD-Scores im Bereich von 6-40, ein Score von 40 bedeutet dabei eine 3-Monats-Mortalität von annähernd 100% ohne Transplantation (6, 18, 19). Auf die Formel zur Berechnung des Scores wird im Material- und Methode-Teil eingegangen.

Es gibt verschiedene Kategorien des MELD-Scores: der *labMELD* wird für die Organzuteilung bei elektiven Lebertransplantationen zugrunde gelegt und besteht rein aus dem mit den genannten Laborwerten errechneten Wert. Der *Exceptional MELD* hingegen berücksichtigt das Vorliegen bestimmter Krankheiten, deren Schwere nicht adäquat durch den labMELD ausgedrückt wird. In Deutschland zählen hierzu beispielsweise HCCs, polyzystische Lebererkrankungen und Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC) (6, 16). Der *Pediatric MELD Score* wird bei Kindern und Jugendlichen unter 16 Jahren angewandt (18). Der *Match MELD* schließlich bezeichnet die MELD-Kategorie, aufgrund derer ein Patient schlussendlich sein Organ zugeteilt bekommt, also entweder labMELD, Exceptional MELD oder Pediatric MELD (16, 18).

Benötigt ein Patient in Deutschland eine Lebertransplantation, so wird er in die zentrale Warteliste von Eurotransplant aufgenommen (15, 16). Die Zuteilung der Spenderorgane durch Eurotransplant erfolgt anhand der Dringlichkeit der Transplantation. Hierbei existieren neben der Kategorie „*Transplantable*“, in welche Patienten fallen, die eine elektive Lebertransplantation benötigen, weitere Kategorien. Höchste Priorität haben Patienten der Kategorie *High Urgency* (HU), die aufgrund einer Lebererkrankung, z.B. akutem Leberversagen oder Transplantatversagen nach Tx, in akuter Lebensgefahr schweben (16, 18). Zweithöchste Priorität haben Patienten der *Approved Combined Organ* (ACO) - Kategorie, welche eine Leber- in Kombination mit einer Pankreas-, Lungen-, Herz- oder Darmtransplantation benötigen (16, 18). Sollte sich der Zustand eines bereits gelisteten Patienten in solchem Ausmaß verschlechtern, dass eine Transplantation nicht möglich ist, so wird dieser als *Not-Transplantable* (NT) gelistet (18). Im Anschluss an die Allokation eines Organs durch Eurotransplant ist die Deutsche Stiftung Organtransplantation für die Koordination der Organspenden in Deutschland zuständig (20, 21).

Neben der Transplantation eines kompletten Organs ist, unter gewissen Voraussetzungen, beispielsweise Alter und Körpergewicht des Spenders, auch eine

sogenannte Split Liver Transplantation möglich, bei der das Spenderorgan geteilt und die Teile anschließend als eigenständige Transplantate transplantiert werden (18). Weiterhin gibt es neben der postmortalen Spende auch die Möglichkeit einer Lebendspende der Leber. 2022 waren 42 der 748 durchgeführten Transplantationen in Deutschland Lebendspenden (22). Obwohl die Anzahl der Lebendspenden in Asien in den letzten Jahren deutlich zugenommen hat, stagniert sie in den westlichen Ländern (5). Durch die vermehrte Durchführung von Lebendspenden könnte jedoch dem zunehmenden Organmangel sowie dem Versterben von Patienten auf der Warteliste entgegengewirkt werden. Settmacher et al. berichten von gutem Kurz- und Langzeitüberleben nach Lebendspenden bei Kindern und Erwachsenen, die Komplikationsraten liegen im Bereich derer nach postmortaler Spende oder sogar darunter (23).

6.1.4 Postoperatives Monitoring nach Lebertransplantation

Es existiert kein grundlegend einheitliches Prozedere bezüglich des postoperativen Managements und Monitorings von Patienten nach einer Lebertransplantation, jedes Zentrum hat diesbezüglich eigene Standards (24). Etabliert sind sowohl laborchemische als auch morphologische Untersuchungen (25). Die Organintegrität wird hauptsächlich indirekt über Leberparameter wie GOT, GPT, γ -GT, AP und Bilirubin beurteilt, welche jedoch akute zelluläre oder antikörper-vermittelte Abstoßungen nicht in ausreichendem Maße erfassen (26-30). Die Transaminasen GOT (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase) bzw. AST (Aspartat-Aminotransferase) und GPT (Glutamat-Pyruvat-Transaminase) bzw. ALT (Alanin-Aminotransferase) sind Marker des Leberparenchym-Schadens, wobei die GPT, wie auch die GLDH, die einen weiteren Marker des Leberzellschadens darstellt, den zusätzlichen Vorteil der Leberzellspezifität bietet (31). Ein Nachteil der Transaminasen besteht in ihrer recht langen Halbwertszeit von 17 Stunden (GOT) bzw. 47 Stunden (GPT), was eine dynamische Beurteilung der Organintegrität und ein frühes Einschätzen des Therapieerfolgs im Falle einer Abstoßung erschwert (32). Die Leberfunktion bzw. die Syntheseleistung der Leber lässt sich beispielsweise anhand der Cholinesterase und der Gerinnungsfaktoren beurteilen, wobei Faktor V durch seine, verglichen mit anderen Gerinnungsfaktoren, verhältnismäßig kurze Halbwertszeit von 12-15 Stunden einen recht dynamischen Parameter darstellt, während Quick bzw. INR hingegen noch von weiteren Einflüssen abhängig sind (25, 31, 33). Als Cholestase-Marker dienen unter anderem γ -GT und Bilirubin (34). Zusätzlich können im Rahmen

von Komplikationen weitere Parameter bestimmt werden: bei Verdacht auf Entzündungsvorgänge beispielsweise das in der Leber synthetisierte CRP sowie, im Falle einer Sepsis, das ubiquitär synthetisierte und daher durch verminderte Leberfunktion nicht eingeschränkte PCT. Im Rahmen von Infektionen und Autoimmunerkrankungen kommen Antikörper-Bestimmungen und PCR der Erreger-DNA bzw. -RNA zum Einsatz (31, 35).

Unter den bildgebenden Verfahren wird vor allem der Sonographie zur Detektion und Verlaufskontrolle von Komplikationen eine wichtige Rolle zuteil (36). Diese und weitere Verfahren wie die Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie (MRCP) und die endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) ermöglichen die Diagnose von Gallengangspathologien. Im Dopplerultraschall können Gefäßpathologien festgestellt werden (35). Eine Computertomographie kann unter anderem zur genaueren Untersuchung von Auffälligkeiten im Ultraschall eingesetzt werden (36).

Die histologische Beurteilung des Transplantats via Leberbiopsie ist einerseits Teil des Routine-Monitorings nach Transplantation und kommt andererseits bei klinischen Ereignissen und Auffälligkeiten zum Einsatz. So stellt sie den Goldstandard zur Beurteilung von Transplantatschaden dar und ist die derzeit einzige Möglichkeit, den Verdacht auf eine Abstoßungsreaktion zu bestätigen (25, 30, 32, 35, 37). Nachteile der Biopsie sind hohe Kosten und hohe Invasivität, lange Durchlaufzeit, sowie begrenzte Sensitivität und Spezifität. Außerdem unterliegt sie einer subjektiven Beurteilung und dem Stichprobenfehler. Nicht zuletzt birgt sie höhere Risiken und eine höhere Belastung für die Patienten als beispielsweise eine Blutentnahme (28, 32, 38-40).

Eine der größten Limitationen der bisherigen Monitoring-Parameter besteht darin, dass eine Vielzahl verschiedener leberpathologischer Ereignisse zu ihrer Erhöhung führt, und sie daher nicht spezifisch für Abstoßungsreaktionen sind. Marker, die eine direkte Aussage über die Organintegrität zulassen und Abstoßungsreaktionen spezifisch erfassen, fehlen bis dato (26, 41). Biomarker mit der Fähigkeit, durch Abstoßungen verursachte Organschäden früh und zuverlässig zu erfassen, könnten, gegebenenfalls in Kombination mit dem Therapeutic Drug Monitoring (TDM), eine Individualisierung der Immunsuppression ermöglichen und dadurch zusätzlich die Verhinderung toxischer Nebenwirkungen erleichtern (29, 40). Insbesondere für die

Detektion subklinischer Abstoßungen wären solche Parameter sehr hilfreich, da man mit ihrer Hilfe die Therapie, insbesondere die Immunsuppression, anpassen könnte, bevor es zu einer manifesten Abstoßungsreaktion kommt. Daher gewinnt die Suche nach neuen, nicht-invasiven Biomarkern für das allgemeine Monitoring sowie die Detektion von Abstoßungen und weiteren Komplikationen zunehmend an Bedeutung (32, 42, 43). Das langfristige Ziel solcher Biomarker ist einerseits die Verhinderung von Abstoßungsreaktionen, die durch zu niedrige Immunsuppression hervorgerufen werden. Andererseits sollen sie einer Über-Immunsuppression entgegenwirken, und dadurch das Langzeit-Überleben der Patienten und Transplantate verbessern (29, 32). In diesem Zusammenhang steht, neben der Untersuchung von Zytokinen, die zellfreie Spender-DNA im Blut der transplantierten Patienten, die sogenannte GcfDNA, im Fokus, welche einen direkten Rückschluss auf die Organintegrität erlaubt (s. Kapitel 6.2) (25, 26, 37, 42, 44).

6.1.5 Immunsuppression

Nach einer Lebertransplantation ist in der Regel eine lebenslange Immunsuppression nötig, die langfristig idealerweise so eingestellt werden sollte, dass keine Abstoßungsreaktionen auftreten und gleichzeitig die unerwünschten Nebenwirkungen möglichst gering gehalten werden (24, 40, 44). Hauptsächlich kommen dabei 4 Medikamentengruppen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen zum Einsatz: Calcineurin-Inhibitoren (CNI z.B. Tacrolimus, Ciclosporin), Antimetabolite (z.B. Mycophenolat-Mofetil, Azathioprin), mTOR-Inhibitoren (Sirolimus, Everolimus) und Kortikosteroide (24). Nebenwirkungen der genannten Wirkstoffklassen sind unter anderem Nephro- und Neurotoxizität, Knochenmarkssuppression, chronische Hepatitis und Entstehung eines metabolischen Syndroms (24, 44, 45).

Die richtige Dosierung der Immunsuppressiva, welche mittels TDM, also der Bestimmung des Wirkspiegels der Medikamente im Blut, überwacht wird, stellt eine Herausforderung dar, da es nur einen geringen Spielraum zwischen abstoßungsbedingtem Schaden am Transplantat und den durch die Immunsuppressiva hervorgerufenen Nebenwirkungen gibt (26, 29, 32, 37, 41). TDM ist außerdem zwar hilfreich, um toxische Überdosierungen mit schwerwiegenden Nebenwirkungen zu vermeiden, lässt aber, aufgrund individuell variabler Empfindlichkeit sowie syn- bzw. antagonistischer Effekte bei Kombination verschiedener Medikamente, wenig Rückschluss auf die effektive Wirksamkeit der

Immunsuppression zu (29, 32, 41). Die genannten Limitationen unterstreichen die Notwendigkeit neuer Biomarker, die dahingehend ein besseres Monitoring und eine Individualisierung der immunsuppressiven Therapie erlauben (32, 40).

Da die Leber von allen Organen die höchste Kapazität hat, mit der Immunantwort des Organ-Empfängers umzugehen, sind nach einer Lebertransplantation generell niedrigere Dosen Immunsuppressiva nötig als nach Transplantation anderer Organe (46). Bei einigen Patienten ist es sogar möglich, bei uneingeschränkter Transplantatfunktion die immunsuppressive Therapie stark zu verringern oder ganz auszuschleichen, ohne dass es zu einer Abstoßungsreaktion oder Zeichen eines anderweitigen Transplantatschadens kommt (5, 24, 47). Diese Patienten haben eine sogenannte „Operational Tolerance“ (48). Benitez et al. stellten in einer prospektiven Multicenter-Studie fest, dass 41,84% der Patienten eine solche Operational Tolerance aufwiesen (49).

6.1.6 Komplikationen

Laut Craig und Heller können die für das Überleben von Patient und Transplantat relevanten postoperativen Komplikationen grundsätzlich in vier Klassen eingeteilt werden: parenchymale Ereignisse, denen auch die Abstoßungsreaktionen zugeordnet werden, vaskuläre Ereignisse, biliäre Komplikationen und maligne Prozesse (sowohl rekurrent als auch neu aufgetreten) (36).

6.1.6.1 Abstoßungsreaktionen

Es wird zwischen T-Zell-vermittelten und antikörpervermittelten sowie zwischen akuten und chronischen Abstoßungsreaktionen unterschieden (24, 37, 44).

Das Risiko für akute Abstoßungsreaktionen ist nach Lebendspenden biologisch verwandter Spender geringer als nach postmortalen Spenden, laut Levitsky et al. beträgt der Unterschied 43% (43). Ein erhöhtes Risiko beobachten die Autoren bei jungen Patienten und solchen mit primär biliärer Cholangitis (PBC), PSC oder Hepatitis C (43). Akute Abstoßungsreaktionen haben eine Inzidenz von etwa 40% und sind mit einem erhöhten Risiko für Transplantatverlust und Tod assoziiert (9, 43). Bei 11,5% der Lebertransplantierten kommt es innerhalb von einem Jahr zu einer akuten Abstoßung, innerhalb von drei Jahren sogar bei 22% (29, 32). Die akute T-Zell-vermittelte Abstoßungsreaktion (TCMR) ist die häufigste Ursache auffälliger Leberwerte bzw. -untersuchungen in der frühen Phase nach der Transplantation (24, 44).

Bei der chronischen Abstoßung handelt es sich in der Regel um einen irreversiblen Prozess (50). Die chronische TCMR entwickelt sich in der Regel aus schwerwiegenden oder persistierenden akuten Abstoßungsreaktionen (37, 44, 50, 51). Chronische antikörpervermittelte Abstoßungsreaktionen hingegen sind eine noch recht neue Entdeckung, eine solche manifeste, histologisch gesicherte Abstoßung tritt nur bei weniger als 1% aller Transplantierten auf (44, 52). Chronische Abstoßungsreaktionen stellen therapeutisch eine Herausforderung dar, da sie nur in der Frühphase erfolgreich behandelt werden können und insgesamt schlecht auf Immunsuppressiva ansprechen (37, 44, 51). Greifen die Therapiemaßnahmen nicht, kommt es zum Transplantatverlust und eine Re-Transplantation wird nötig, welche ein signifikant schlechteres Outcome hat als primäre Transplantationen (37). Chronische Abstoßungsreaktionen treten nach Lebertransplantationen mit 1-5% deutlich seltener auf als nach Transplantation anderer Organe (vgl. Herz-Transplantation: 25-60%) (37, 44, 50).

6.1.6.2 Weitere Komplikationen

Im Bereich der Lebergefäße kann es zu diversen Komplikationen kommen, darunter zu Stenosen bzw. Thrombosen der Arteria hepatica, des Truncus coeliacus, der Vena portae oder der Vena cava inferior (36). Gefäßkomplikationen treten in bis zu 10% der Fälle auf, meist innerhalb des ersten Monats nach der Transplantation (24). Eine Thrombose der A. hepatica tritt bei 2-12% der transplantierten Patienten auf und ist die häufigste Gefäßkomplikation und einer der relevantesten Gründe für Transplantatversagen und Versterben (36). In bis zu 80% der Fälle wird eine Re-Transplantation nötig (36). Komplikationen im Bereich der Portalvenen treten in 1-3% der Fälle auf und sind somit seltener als arterielle Komplikationen (36). Komplikationen im Bereich der Lebervenen und Vena cava inferior betreffen 2-11% der Lebertransplantierten (24, 36).

Gallengangs-Komplikationen treten in der Regel innerhalb von sechs bis zwölf Monaten nach Transplantation und bei 10-25% der Patienten auf (24, 36). Sie manifestieren sich zu 40% in Form von Strikturen, weiterhin als Gallenflüssigkeits-Leckage, bspw. am Ductus cysticus oder im Bereich der Anastomose (5-30%), als Obstruktion oder durch Wiederauftreten der der Transplantation zugrundeliegenden Erkrankung (24, 36).

Grundsätzlich sind transplantierte Patienten durch die dauerhafte Immunsuppression einem elf Mal höheren Malignitätsrisiko ausgesetzt als die Normalbevölkerung (24). Das Risiko ist insbesondere bei nichtalkoholischer Steatohepatitis, alkoholbedingter Lebererkrankung oder Autoimmun-Erkrankungen als Transplantationsursache erhöht (24, 44). Die Ursache maligner Prozesse kann dabei einerseits in einem Wiederauftreten primärer Lebertumore sowie Metastasen liegen (24, 36, 44, 45). Andererseits kann sich de novo eine Tumorerkrankung entwickeln. Dies geschieht bei 3,5% der Lebertransplantierten Patienten innerhalb von einem Jahr und bei 21,7% innerhalb von 10 Jahren (24). Am häufigsten treten Hauttumore sowie rezidivierende HCCs auf (24, 44).

Infektionen stellen, begünstigt durch die Immunsuppression, eine weitere häufige Komplikation dar, und betreffen bis zu einem Fünftel der Transplantierten innerhalb der ersten vier Wochen nach Transplantation (24, 26). Unter den Erregern ist hier vor allem das Cytomegalie-Virus (CMV) zu nennen, welches in den frühen Monaten nach der Transplantation von den Infektionen am häufigsten zur Transplantat-Dysfunktion führt (24). Dabei kann es sich um eine frische Infektion, eine Reaktivierung, aber auch um ein CMV-positives Transplantat bei CMV-negativem Empfänger handeln (24).

Eine weitere mögliche Komplikation stellt das bereits erwähnte Wiederauftreten der der Transplantation ursprünglich zugrundeliegenden Erkrankung dar. Autoimmunkrankheiten wie primär biliäre Cholangitis, primär sklerosierende Cholangitis oder Autoimmunhepatitis (AIH) treten laut Hoppmann et al. insgesamt in 11-22% der Fälle wieder auf (24), die Häufigkeitsangaben zum Wiederauftreten der einzelnen Erkrankungen gehen jedoch in der Literatur auseinander: Nach Hoppmann et al. sowie Gautam et al. tritt die PBC in 16%, die AIH in 23% und PSC in 17% wieder auf (24, 53), nach Russo et al. hingegen in 8,7% (PBC) bzw. 42% (AIH) (25). Die Reinfektionsrate von Hepatitis C lag viele Jahre lang bei 100%, ein Drittel der betroffenen Patienten entwickelte innerhalb von fünf Jahren nach der Transplantation eine Leberzirrhose (24). Durch den zunehmenden Einsatz von direkt antiviral wirkenden Medikamenten haben sich die Bedingungen in den letzten Jahren jedoch deutlich verbessert, sodass heutzutage sogar Lebern HCV-positiver Spender transplantiert werden (54, 55). Das Wiederauftreten von Hepatitis B (HBV) spielt aufgrund der Therapiemöglichkeiten mittels Hepatitis B-Immunglobulin und antiviraler Medikamente heute nur noch eine untergeordnete Rolle (3, 24). HCCs, sofern initial

innerhalb der Mailand-Kriterien gelegen, treten nach der Transplantation bei 10% der Patienten erneut auf, die 5-Jahres-Überlebensrate unterscheidet sich nicht signifikant zu der anderer Transplantationsursachen (24). Für HCCs außerhalb der Mailand-Kriterien liegt die Rate des Wiederauftretens bei 34% (24).

6.1.7 Ausblick

Im Eurotransplant-Raum betrug das 1- bzw. 5-Jahresüberleben elektiv transplantierte Patienten im Zeitraum 2007-2014 80% bzw. 64%. In der HU-Kategorie lag es bei 66% bzw. 56% (16).

Obwohl das Kurzzeit-Outcome nach Lebertransplantation inzwischen hervorragende Ergebnisse erbringt, hat sich das Langzeit-Überleben der Patienten in den letzten Jahren nicht wesentlich verbessert (5, 29). Letzteres wird nach Lebertransplantation hauptsächlich durch zwei Faktoren beeinflusst: chronische Funktionseinschränkungen des Transplantats und schwerwiegende Nebenwirkungen der jahrelangen Immunsuppression (5, 29, 41, 45, 49, 56). Die häufigsten Ursachen für spätes Versterben nach einer Lebertransplantation sind Transplantat-Versagen, Infektionen, maligne Prozesse, kardiovaskuläre Ereignisse und Nierenversagen, wobei letzteres der stärkste Prädiktor für Langzeit-Sterblichkeit nach Lebertransplantation ist (5). Daher kommen in den letzten Jahren zunehmend nierenschonende Immunsuppressions-Schemata zum Einsatz (5). Weiterhin wird zunehmend eine schrittweise Dosisreduktion und nach Möglichkeit ein vollständiges Ausschleichen der Immunsuppressiva angestrebt, wobei man sich die Operational Tolerance zunutze machen kann (5, 49).

Mit Blick in die Zukunft wird eine der größten Herausforderungen der kommenden Jahre die bereits jetzt bestehende und weiter zunehmende Organknappheit bei steigendem Transplantat-Bedarf darstellen. Der Organmangel liegt in Deutschland nicht zuletzt im Rückgang der Spenderzahlen begründet (2, 3, 8, 57). Um dieser Entwicklung entgegenzuwirken, wird derzeit an neuen Ansätzen der regenerativen Medizin geforscht, wie beispielsweise Hepatozyten-Transplantation, Xenotransplantation, der Verwendung von bioartifiziellen Leber-Devices oder biotechnologisch veränderten Organen (2, 10, 57).

6.2 cfDNA

Aufgrund der bereits erwähnten Limitationen des bisherigen Monitorings nach Lebertransplantation besteht weiterhin Bedarf an Biomarkern, welche laut Schütz et

al., Grskovic et al. und weiteren Autoren die Organintegrität des Transplantats direkt messen und Abstoßungsreaktionen, sowie weitere Komplikationen, früh und zuverlässig erfassen sollten (32, 40). Außerdem sollten sie das Monitoring von Minimierung und Individualisierung der Immunsuppression ermöglichen und durch die genannten Eigenschaften insgesamt das Kurz- und Langzeit-Outcome verbessern. Des Weiteren sollten sie kostengünstig, wiederholt bestimmbar, nichtinvasiv und schnell verfügbar sein (32, 40, 58, 59). Als ein solcher potenzieller Biomarker gilt die graft-derived cell-free DNA (GcfDNA), also die aus dem transplantierten Organ stammende, im Blut der Empfänger frei zirkulierende DNA (32).

Zellfreie DNA (cfDNA) bezeichnet DNA-Fragmente, die von Zellen aus physiologischen oder pathologischen Gründen freigesetzt wurden und sich daher extrazellulär in Körperflüssigkeiten, z.B. Blut oder Urin befinden (40, 60, 61). Die Länge der cfDNA-Fragmente ist abhängig von ihrem Freisetzungsmechanismus (62, 63). Im Gegensatz zu längeren Fragmenten aus nekrotischen Zellen (ca. 10 000 Basenpaare), liegt cfDNA aus apoptotischen weißen Blutzellen oft in Form eines oder mehrerer Nukleosomen vor (58, 60, 61, 63, 64). Ihre Länge beträgt entsprechend je nach Literaturquelle meist 162-170 bzw. 180-200 Basenpaare oder ein Vielfaches davon (58, 60, 61, 63, 64).

Im Blut von gesunden Patienten finden sich in der Regel sehr niedrige cfDNA-Spiegel von 0-100 ng/ml bzw. wenigen tausend DNA-Kopien pro Milliliter (42, 62). Erhöhte Spiegel von cfDNA können sowohl physiologische als auch pathologische Ursachen haben. Zu den physiologischen zählen körperliche Anstrengung sowie Schwangerschaft, pathologische Gründe sind beispielsweise maligne Erkrankungen, aber auch Entzündung, Gewebetrauma und Sepsis (30, 60-63). Auch die Transplantation eines Organs sowie insbesondere dessen Abstoßung können zu einer erhöhten cfDNA-Freisetzung führen (30, 60, 61, 63, 65, 66).

Neben den im Folgenden detaillierter beschriebenen Anwendungsgebieten der Organtransplantation, Krebserkrankungen und Pränatalmedizin, findet die cfDNA außerdem Verwendung im Bereich der Epigenetik (40, 60, 67). Weiterhin wurden in den letzten Jahren Studien zur cfDNA im Zusammenhang mit vaskulärer Dysfunktion, Gefäßverkalkung und Endothelschaden durchgeführt, um ihre Rolle als potenzieller Biomarker für Diagnose, Monitoring und Prognose diverser akuter und

chronischer Erkrankungen, wie Gewebeschäden und kardiovaskulärer Krankheitsbilder, zu untersuchen (60).

6.2.1 Anwendung nach Leber-Transplantation

Mit der Transplantation eines Organs transplantiert man gleichzeitig auch das Genom des Spenders, welches in den Zellen des Transplantats vorliegt, in den Körper des Empfängers (29, 38, 42, 63). Aus zugrunde gehenden Zellen des transplantierten Organs wird die DNA des Spenders, welche sich von der cfDNA des Empfängers unterscheidet, ins Blut der Empfänger freigesetzt (68). Aufgrund des unterschiedlichen Genotyps kann man die vom Empfänger und Spender stammende cfDNA getrennt voneinander quantifizieren (42). Anhand der Höhe der GcfDNA (also der vom Spender stammenden cfDNA) können Rückschlüsse auf Integrität und eventuell vorliegende Schäden des transplantierten Organs gezogen werden (29, 38, 42, 63). Im Gegensatz zu vielen organbezogenen Markern, beispielsweise den Transaminasen, lässt die GcfDNA dabei einen direkten Rückschluss auf die Integrität des Spenderorgans zu (29, 32). Die Menge der aus der Leber (oder anderen Organen) freigesetzten GcfDNA ist direkt assoziiert mit der Anzahl zugrunde gehender Leberzellen (32). Konventionelle Marker sind hingegen von diversen weiteren Faktoren abhängig, beispielsweise der Enzym- oder Produktsynthese im Falle von Transaminasen und Bilirubin (32).

Aufgrund der hohen Regenerationsrate der Hepatozyten und dem größeren Organvolumen der Leber lassen sich nach Lebertransplantationen höhere GcfDNA-Spiegel beobachten als nach Nieren- und Herz-Transplantation (41, 59). Sehr hohe GcfDNA-Anteile von über 90% werden während der Reperfusionphase und unmittelbar nach der Transplantation beobachtet und mit dem Ischämie- bzw. Reperfusionsschaden in Zusammenhang gebracht (28, 41). Kurz nach der Reperfusion des Organs können GcfDNA-Konzentrationen von 2000-72 000 ng/ml vorkommen (28). In der Folge lassen sich meist ein rascher Abfall der GcfDNA innerhalb von zehn Tagen und anschließend, in Abwesenheit von Komplikationen, ein niedriger Basis-Level von in der Regel unter 10% der gesamten zellfreien DNA beobachten (28, 29, 32, 41, 59, 60). Ein rascher postoperativer Abfall gilt dabei als guter Prognoseindikator (32, 60). Beck et al. beschreiben für den Transplantationstag einen GcfDNA-Anteil von über 90%, zehn Wochen postoperativ ist dieser bereits auf unter 15% gesunken. Der GcfDNA-Anteil halbiert sich dabei laut der Autoren durchschnittlich alle 24-48 Stunden (41). Die physiologische Halbwertszeit der

GcfDNA liegt, z.B. laut Schütz et al. und weiteren Autoren, bei unter 1,5 Stunden bzw. 30 Minuten bis 2 Stunden (32, 58, 59, 63). Beck et al. berichten weiterhin, dass die GcfDNA im Blut von stabilen Patienten über sechs Monate nach einer Lebertransplantation unterhalb von 6,8% liegt (41). In einer prospektiven Beobachtungsstudie von Schütz et al., in welcher die Eignung der GcfDNA zum Monitoring nach LTx mit konventionellen Leberparametern verglichen wird, weisen stabile Patienten nach LTX einen GcfDNA-Median von 3,3% auf, Hepatitis C-positive Patienten haben einen etwas höheren Anteil (5,9%), ebenso Patienten mit Cholangitis (5,3%) und Cholestase (<9,9%). Bezogen auf den in der Studie definierten Grenzwert des GcfDNA-Anteils von 10% weist keine dieser Patientengruppen einen erhöhten GcfDNA-Anteil auf (32). Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Oellerich et al und Beck et al (29, 41). Sie stellen fest, dass bei Patienten mit Cholestase und Cholangiopathie ohne Anzeichen einer Abstoßungsreaktion zwar deutlich erhöhte Leberparameter (GOT, γ -GT), jedoch keine Erhöhung der GcfDNA vorliegt (29, 41). Diese Beobachtungen lassen sich als Hinweis auf eine hohe Spezifität der GcfDNA für Abstoßungsreaktionen deuten (29).

Zusammengefasst legen die Ergebnisse der erwähnten Studien einen GcfDNA-Grenzwert von maximal 10% für stabile Patienten nach Lebertransplantation nahe (26, 32, 41). Bekräftigt wird dies durch die Ergebnisse aus Untersuchungen, die ergeben, dass auch unter physiologischen Bedingungen ohne vorangegangene Transplantation circa 10% der zirkulierenden zellfreien DNA aus der Leber stammen (32).

Hiervon grenzen sich deutlich die Werte bei Patienten mit vorliegender, histologisch bestätigter akuter Abstoßungsreaktion ab: bei zwei Patienten der Untersuchung von Beck et al. werden Abstoßungsreaktionen beobachtet, die jeweils mit einem Anstieg des GcfDNA-Anteils einhergehen. In einem dieser Fälle bestätigt eine Biopsie an Tag 43 nach der Transplantation die Abstoßung, ein Anstieg der GcfDNA bis auf maximal 60% zeigt sich jedoch bereits ab Tag 31. Die GOT-Werte im zugehörigen Zeitraum sind schwankend (41). Schütz et al. stellen bei Patienten mit vorliegender Abstoßung einen medianen GcfDNA-Anteil von 29,6% fest, wobei in allen Fällen der Untersuchung, in denen GcfDNA-Werte aus den Tagen vor dem ersten klinischen Abstoßungs-Verdacht vorliegen, bereits 8-15 Tage vor deren histologischer Bestätigung erhöhte GcfDNA-Anteile nachweisbar waren (Median 34,3%) (32). Oellerich et al. beschreiben GcfDNA-Anteile von bis zu 50% während akuter

Abstoßungsreaktionen und ein zeitliches Vorausgehen des GcfDNA-Anstiegs um 6-10 Tage vor der Manifestation der Abstoßungsreaktion (29). Auch Schütz et al. sowie Knight et al. berichten von erhöhten GcfDNA-Anteilen 1-2 Wochen vor Anstieg der Transaminasen oder Bestätigung einer Abstoßung mittels Biopsie (32, 59), welche nach erfolgreicher Therapie rasch wieder in den Bereich des Baseline-Levels sanken (59). GcfDNA-Messungen können also auch bei der Erfassung subklinischer Abstoßungsreaktionen zum Einsatz kommen (32). Dieses Potenzial arbeiten auch García Moreira et al. für Patienten nach Nierentransplantation sowie Grskovic et al. für Patienten nach Herztransplantation heraus (40, 69).

Die Autoren Schütz et al. stellen in ihrer Untersuchung eine geringe statistisch signifikante Korrelation zwischen der GcfDNA und den Leberparametern AST, ALT, γ -GT und Bilirubin fest und kommen zusammenfassend, ebenso wie Knight et al., zu dem Schluss, dass die GcfDNA bei der Erfassung von Abstoßungsreaktionen den konventionellen Leberwerten überlegen ist und daher einen nützlichen Marker der Organintegrität darstellt (32, 59). Weiterhin schlussfolgern sie, dass, auch in der frühen Phase nach Transplantation mit noch postoperativ erhöhten GcfDNA-Anteilen, ein GcfDNA-Wert von mehr als dem 2,5-fachen des Median-Wertes für den entsprechenden postoperativen Tag den Verdacht einer Abstoßungsreaktion aufbringen sollte (32).

Neben dem Monitoring der Organintegrität stellt die individuelle Dosisfindung der Immunsuppression und die dadurch resultierende Vermeidung von unerwünschten Nebenwirkungen und Toxizität ein weiteres potenzielles Einsatzgebiet der GcfDNA dar, insbesondere während des Wechsels von einem initial verwendeten auf ein alternatives Immunsuppressivum (28, 29, 38, 40, 42, 60). Oellerich et al. sowie Schütz et al. berichten, dass das Monitoring der Organintegrität mittels GcfDNA helfen kann, die Untergrenze der therapeutischen Breite von Immunsuppressiva zu finden und einer unnötig starken Immunsuppression vorzubeugen (26, 32).

Besonders hilfreich ist hierbei die im Gegensatz zu konventionellen Leberparametern deutlich kürzere Halbwertszeit der GcfDNA, welche einen Organschaden durch Unterimmunsuppression früh anzeigen kann (32). Die GcfDNA kann daher potenziell als Leitparameter zur Reduktion der Medikamente und zur Unterscheidung von Patienten mit Operational Tolerance von solchen, die dauerhafte Immunsuppression benötigen, verwendet werden (29). Bei Letzteren lässt sich im Verlauf der Reduktion ein Anstieg der GcfDNA beobachten, welcher mithilfe der GcfDNA früh genug

detektiert werden kann, um die Dosis wieder zu erhöhen, bevor sich eine manifeste Abstoßungsreaktion ausbildet. Bei Patienten mit Operational Tolerance hingegen wäre kein entsprechender Anstieg zu verzeichnen (29). In der Untersuchung von Oellerich et al. zeigen sich, mit Ausnahme von zwei Proben, bei allen Proben, bei denen die Tacrolimus-Konzentration im Blut im Zielbereich liegt, GcfDNA-Anteile unter 10%, was den Grenzwert für unbeeinträchtigte Organintegrität der Untersuchung darstellt. Bei Patienten mit subtherapeutischen Tacrolimus-Spiegeln zeigt sich hingegen in 45% der Fälle ein erhöhter GcfDNA-Spiegel (29). Die GcfDNA kann also sowohl zur Dosisfindung der Immunsuppression und Bestimmung der therapeutischen Breite als auch zum Monitoring der individuellen Immunlage und Organintegrität verwendet werden und hat somit Potenzial, sowohl das Patienten- als auch das Transplantatüberleben zu verbessern (26, 29).

Ein weiterer großer Vorteil der cfDNA im Allgemeinen und GcfDNA im Speziellen ist ihre bereits erwähnte kurze Halbwertszeit, durch die eine Änderung des GcfDNA-Levels sehr zeitnah Auskunft über die geänderte Organintegrität gibt. Dies macht die GcfDNA zu einem dynamischen Indikator des Transplantatschadens. Hierdurch wird beispielsweise die frühe Beurteilung des Therapieerfolgs bei Abstoßungsreaktionen möglich (26, 29, 30, 32, 39, 61, 69, 70).

6.2.2 Anwendung bei Transplantation anderer Organe (Herz/Niere/Lunge)

Die Dynamik der GcfDNA nach Nierentransplantation ähnelt für komplikationslose Verläufe der nach einer Lebertransplantation (28). Innerhalb der ersten zwei Wochen nach Transplantation findet nach initial erhöhten Werten ein exponentieller Abfall auf einen medianen Baseline-Level von 0,21-0,46% statt (63). In Untersuchungen zeichnet sich ein Grenzwert von 1% für die Unterscheidung zwischen Abstoßung und unkompliziertem Verlauf ab (66, 70). Der Baseline-Level ist dabei nach Nierentransplantation ähnlich dem einer Herz-Transplantation und niedriger als nach Lungen- und Leber-Transplantation (66, 70). Im 5-Jahres-Verlauf wird bei stabilen Patienten ein GcfDNA-Anstieg auf bis 2,1% beobachtet (63). Bei akuten Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantation kann ein Anstieg der GcfDNA auf bis zu das zehnfache des Ausgangswertes und höher beobachtet werden, oft bereits Tage bis Wochen vor der klinischen Manifestation der Abstoßung (42, 63, 70). Ein Anstieg der Gesamtmenge sowohl der gesamten zellfreien DNA als auch der GcfDNA wird jedoch auch unter anderen Einflüssen, wie akuter tubulärer Nekrose und Infektionen, beobachtet. Daher kommen verschiedene Autoren zu dem Schluss,

dass cfDNA und GcfDNA allein nicht ausreichen, um zwischen Abstoßungsreaktionen und anderen Ereignissen zu unterscheiden (69, 71). In Kombination mit weiteren Werten, wie PCT, können sie aber bei einem selektierteren Einsatz von Nierenbiopsien helfen (69). Ob die Höhe der GcfDNA nach Nierentransplantation durch die Nephrotoxizität von Immunsuppressiva beeinflusst wird, ist bisher nicht bekannt (29).

Auch nach Herztransplantationen finden sich initial erhöhte GcfDNA Werte, de Vlaminck et al. beschreiben einen Mittelwert von 3,8% am ersten postoperativen Tag (38). Der folgende Abfall geht im Vergleich zu anderen transplantierten Organen etwas langsamer vonstatten, der Baseline-Level nach Herztransplantation ist niedriger als nach einer Lungen- oder Lebertransplantation (59, 66, 70). Im Blut stabiler, herztransplantierte Patienten liegt die GcfDNA-Konzentration in der Regel bei unter 1%, während Abstoßungsreaktionen kann es zu einem Anstieg auf bis zu 5% kommen, laut de Vlaminck et al. sowie Gielis et al. korreliert die Höhe des Anstiegs dabei mit der Schwere der Abstoßung (28, 30, 38, 39, 41, 60, 70). Auch Beck et al. berichten 2015 von mehr als fünffach erhöhten GcfDNA-Werten bei Vorliegen einer Abstoßung, welche biochemischen und klinischen Anzeichen zeitlich vorausgehen (42). Ein zeitliches Vorausgehen des GcfDNA-Anstiegs um bis zu fünf Monate vor der histologischen Bestätigung beobachten auch diverse weitere Autoren (38, 39, 59, 60). Mehrere Quellen kommen daher zu dem Schluss, dass die GcfDNA potenziell geeignet ist, die Endomyokardbiopsie im Monitoring nach Herztransplantation zu ergänzen oder sogar zu ersetzen (38, 39).

Zou et al. stellen im Rahmen ihrer Untersuchung fest, dass die GcfDNA nach Lungentransplantation als früher Abstoßungsmarker verwendet werden kann. Sie beobachten unmittelbar postoperativ zunächst erhöhte Werte, im Verlauf bei stabilen Patienten einen durchschnittlichen GcfDNA-Wert von 1,71%. Dagegen liegen während Abstoßungsreaktionen signifikant höhere Werte vor (durchschnittlich 10,3%) (65). Grskovic et al. berichten, dass erhöhte GcfDNA-Werte mit der Schwere der Abstoßung in der transbronchialen Biopsie korrelieren (40). Als nachteilig in der Verwendung nach Lungentransplantation erwies sich, dass die GcfDNA auch während Infektionsereignissen vorübergehend ansteigt. Laut der Autoren kann die diagnostische Spezifität durch Kombination mit spezifischen Infektionsmarkern, z.B. einer Virus-PCR, gesteigert werden (65).

6.2.3 Verwendung in der Tumor- und Pränatal-Diagnostik

Nachdem die cfDNA 1948 von Mandel und Metais entdeckt worden war, stellte man in den folgenden Jahren fest, dass im Blut von Kranken, insbesondere Tumorpatienten, höhere cfDNA-Spiegel vorlagen als bei gesunden Vergleichspersonen und untersuchte die potenzielle Bedeutung der cfDNA daher vermehrt im Zusammenhang mit Krebserkrankungen (60). Nachdem nachgewiesen war, dass die erhöhten cfDNA-Mengen aus der Tumormasse stammen, wurde sie in diesem Zusammenhang in der Folge auch als „circulating-tumoral DNA (ctDNA)“ bezeichnet (60).

Die cfDNA als Biomarker kann heute im Rahmen von Krebserkrankungen zu diversen Zwecken verwendet werden (60, 61): in der Diagnostik können Fragmentierungs- und Methylierungsmuster, welche als organspezifisch angesehen werden, sowie Genduplikationen oder -deletionen der cfDNA Aufschluss über den zugrundeliegenden Tumor geben (60, 61, 64). Der Nachweis tumorspezifischer Varianten in Protoonkogenen wie beispielsweise KRAS oder BRAF auf cfDNA-Ebene, kann für Diagnose, Therapieentscheidung und Monitoring sowie bei der Beurteilung des Therapieansprechens hilfreich sein (60, 61). Es wurde beobachtet, dass je nach Art des Tumors die Höhe der ctDNA-Spiegel variierte, sie kann zum Teil mehrere hunderttausend Nanogramm pro Milliliter betragen. Bei gewissen Krebsarten wurde die ctDNA-Konzentration als Prädiktor für das Outcome der Erkrankung identifiziert (60). Campos et al. beschreiben, dass die cfDNA als „flüssige Biopsie“ minimalinvasiv ein molekulares Profil des vorliegenden Tumors liefern kann und dadurch besonders bei solchen Erkrankungen hilfreich ist, bei denen eine klassische Gewebebiopsie nicht unkompliziert zu erhalten ist, beispielsweise bei Pankreas- oder Lungentumorerkrankungen oder in Fällen, in denen andernfalls eine Knochenmarkspunktion nötig wäre (62).

1997 wurde erstmals fetale cfDNA im Blut der Mutter nachgewiesen, was den Bedeutungs- und Einsatzbereich der cfDNA um die nichtinvasive pränatale Diagnostik erweiterte. Heute wird die fetale cfDNA beispielsweise bei Vaterschaftstests, zur Detektion von Trisomien und monogenen Erkrankungen sowie bei der Geschlechtsidentifizierung verwendet (60, 61, 64, 67).

6.2.4 Methoden zur Detektion und Quantifizierung

Die meist nur geringen Anteile der GcfDNA an den unter physiologischen Bedingungen bereits sehr niedrigen Mengen der gesamten zellfreien DNA im Blut der Patienten machen die Quantifizierung der GcfDNA zu einer Herausforderung und erfordern sehr sensitive und präzise Methoden (28, 40, 42, 64, 65, 67).

Zellfreie DNA kann, je nach diagnostischer Fragestellung, mit verschiedenen Nachweis-Methoden und Techniken quantifiziert werden. Unter den heutzutage gängigen Methoden befinden sich Real-Time bzw. quantitative PCR (qPCR), die in unserer Untersuchung verwendete ddPCR (digital droplet PCR) (s. Kapitel 6.3) und Sequenzierungsmethoden wie Next Generation Sequencing (26, 30, 32, 39-42, 60, 63). Letztere haben den Nachteil, dass sie verhältnismäßig teuer und zeitaufwändig sind. Außerdem weisen sie nur eine limitierte analytische Sensitivität auf. Unter diesen Gesichtspunkten sind die PCR-Methoden den übrigen überlegen (29, 32, 41, 63-65). Der Vorteil der digitalen PCR gegenüber der qPCR, die eine ähnliche, oder sogar noch höhere Sensitivität hat, ist ihre große Präzision (72).

Um die zellfreie DNA, die vom Transplantat freigesetzt wird (GcfDNA), von der des Empfängers zu unterscheiden, gibt es, unabhängig von der verwendeten Technik, verschiedene Strategien: Eine Möglichkeit ist die Amplifikation von Genen, welche auf dem Y-Chromosom liegen, im Blut von weiblichen Patientinnen, die das Organ eines männlichen Spenders erhalten haben (28, 29, 39). Der größte Nachteil dieser Methode ist, dass sie aufgrund der Geschlechter-Kombination nur bei ca. 25% der Transplantierten angewendet werden kann (28, 29). Breiter anwendbar ist die Untersuchung genetischer Polymorphismen, also das Vorliegen unterschiedlicher Allele eines Gens in Empfänger- und Spender-Genom. Hierfür eignen sich, neben der unterschiedlichen Kopien-Zahl bestimmter Sequenz-Abschnitte, insbesondere die Untersuchung sogenannter Single Nucleotid Polymorphismen (SNPs). Dies kann mittels der bereits genannten Techniken erfolgen (28, 29, 39-41, 65).

In dieser Arbeit wurden SNPs mit hoher Minor Allele Frequenz (MAF) zur Unterscheidung von Spender- und Empfänger-cfDNA verwendet. Dabei handelt es sich um SNPs, deren beide Allele in der Gesamtbevölkerung eine ähnlich hohe Häufigkeit aufweisen, idealerweise mit einer MAF von etwa 0,4-0,5 bzw. 40-50%, und damit eine hohe Wahrscheinlichkeit haben, auch im Genom von Spender und Empfänger in unterschiedlicher Ausprägung vorzuliegen (42, 63). Zunächst werden

hierfür in der Empfänger-DNA homozygote SNPs identifiziert (41, 42). Anschließend kann die Spender-DNA gezielt auf diese SNPs hin untersucht werden (41). Liegt kein Spender-Gewebe zur Genotypisierung der DNA vor, kann alternativ wie folgt vorgegangen werden (detaillierte Beschreibung im Ergebnisteil): in einer zeitnah nach der Transplantation entnommenen Blutprobe des Empfängers, in der ein sehr hoher und somit sicher nachweisbarer GcfDNA-Anteil zu erwarten ist, werden gezielt die im ersten Schritt als homozygot identifizierten SNPs untersucht (41). Finden sich dabei SNPs, die positiv für das beim Empfänger nicht vorliegende Allel sind, stammen diese vom Spender (42, 63). SNPs, die bei Spender und Empfänger in unterschiedlicher Ausprägung vorliegen (entweder heterolog homozygot oder Empfänger homozygot und Spender heterozygot), eignen sich zur Quantifizierung der GcfDNA (41, 42, 63). Im Anschluss kann ein ddPCR Assay gewählt werden, der diese SNPs erfasst und für jede weitere GcfDNA-Quantifizierung dieses Patienten verwendet werden (41, 42). Ergebnisse können so innerhalb von fünf Stunden nach Probeneingang vorliegen (42).

Die Nachweis- bzw. Quantifizierungsgrenze dieses Verfahrens lag in Studien bei ca. 10 Kopien GcfDNA pro Milliliter Plasma, was etwa einem GcfDNA-Anteil von 0,15% entspricht (42, 63).

6.3 ddPCR

Die ddPCR ist eine hochpräzise Quantifizierungsmethode von DNA-Zielsequenzen, welche in Forschung und Diagnostik Anwendung findet (73).

Für die Quantifizierung der GcfDNA mittels ddPCR wird zunächst eine Probe, welche die Ziel- und Hintergrund-DNA enthält, per Zufall in 20 000 nanoliter-große Tröpfchen aufgeteilt, welche aus einer Wasser-Öl-Emulsion bestehen (29, 68, 72, 73). Die Tröpfchen enthalten jeweils eine zufällige Menge Ziel-DNA (GcfDNA) sowie Hintergrund-DNA (gesamte cfDNA). Dann wird für jedes Tröpfchen eine PCR-Amplifikation mit zwei allel-spezifischen Sonden durchgeführt (29, 73). Hiernach gibt jedes Tröpfchen entweder ein fluoreszenz-positives oder -negatives Signal ab, in Abhängigkeit davon, ob DNA-Moleküle im Tröpfchen enthalten waren oder nicht (29, 73). Die positiven Tröpfchen lassen sich weiterhin nach HEX- und FAM-Fluoreszenz unterscheiden, je nachdem, ob Spender- oder Empfänger-SNPs und damit -DNA oder beide enthalten waren (73). Durch die zufällige Verteilung der DNA auf die Tröpfchen sind in manchen Tröpfchen keine, in anderen hingegen gleich mehrere

Ziel- bzw. Hintergrund-DNA-Fragmente vorhanden (73). Sämtliche Tropfen, leer oder fluoreszierend, werden in einem 2D-Plot aufgetragen. Somit ergeben sich 4 Cluster, auf die sich die Tröpfchen verteilen (s. Abbildung 1): eines, das FAM- und HEX-negativ ist, je eines für Tröpfchen, die für einen der beiden Fluoreszenzfarbstoffe ein positives Signal abgeben und eines für jene Tröpfchen, in denen beide Farbstoffe nachgewiesen werden können (73). Die Anzahl fluoreszenz-positiver und negativer Tröpfchen wird in einer speziellen Durchflusszytometrie gemessen und, basierend auf dem Poisson-Algorithmus, die mittlere Konzentration der Allele pro Tröpfchen, sowie daraus folgend die Gesamtmenge an GcfDNA, berechnet (29, 72).

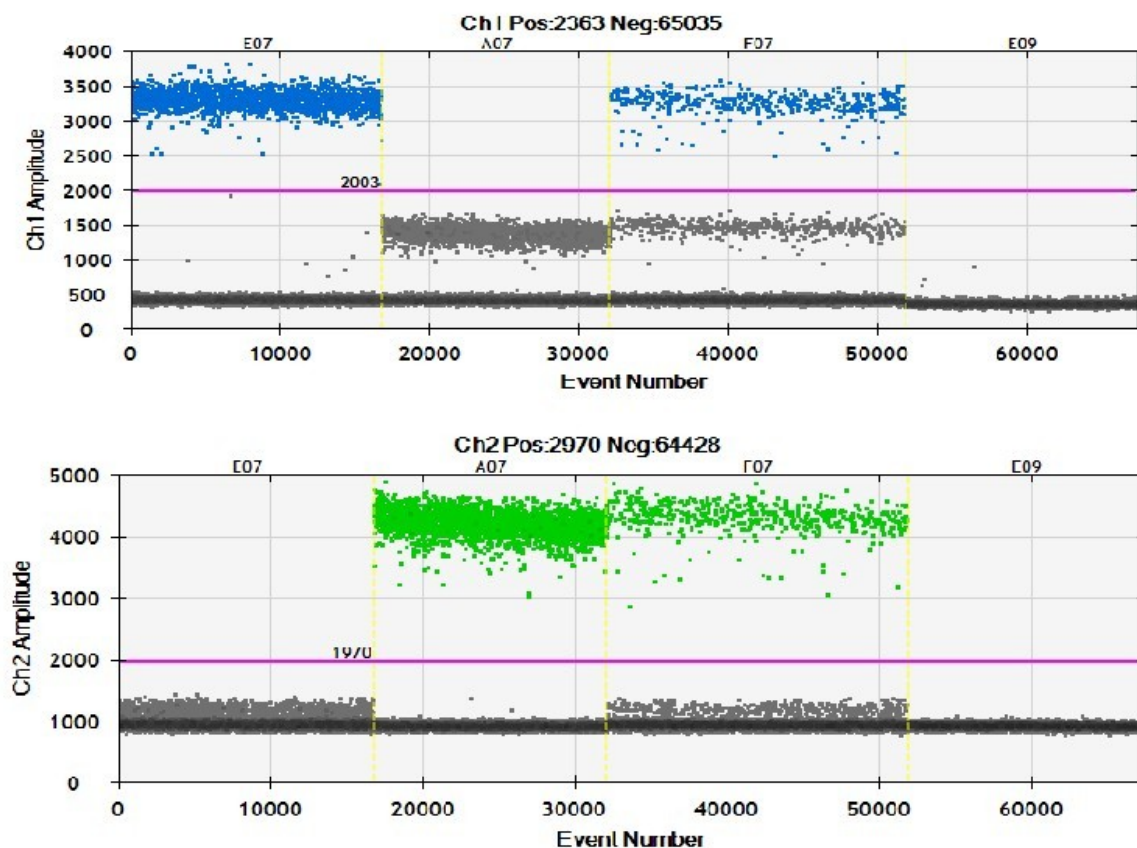


Abbildung 1 - 1D-Plot nach Auslesen der Tröpfchen

Es lassen sich 4 Cluster der fluoreszenzmarkierten Tröpfchen erkennen: ganz links diejenigen Tröpfchen, die nur für einen Farbstoff positiv sind, rechts daneben die Tröpfchen, die nur für den anderen Farbstoff positiv sind. Es folgt ein Cluster mit Tröpfchen, die für beide Farbstoffe positiv sind (zu erkennen daran, dass sowohl im grünen als auch im blauen Plot Tröpfchen aufgetragen sind) und zuletzt die Tröpfchen, die keinen Farbstoff enthalten. In grau schattiert sind die Tröpfchen mit aufgetragen, welche den jeweils anderen Farbstoff enthalten.

Die Ergebnisse der Quantifizierung können entweder in Prozent als Anteil der GcfDNA an der gesamten cfDNA, oder als absolute Molekülzahl pro Milliliter Plasma angegeben werden (29, 32, 42). In der Literatur wird die untere Quantifizierungsgrenze mit 0,15-0,25% angegeben (29, 42, 65).

Im Vergleich zu bisher etablierten Methoden, wie beispielsweise der qPCR, weist die ddPCR eine deutlich höhere Linearität sowie höhere Präzision und bessere Reproduzierbarkeit auf (62, 64, 68, 72). Zusätzlich sind die Ergebnisse der ddPCR weniger anfällig für Schwankungen, da sie sich aus den Ergebnissen von mehreren tausend einzelnen PCR-Reaktionen zusammensetzen (68, 72, 73). Weiterhin erlaubt die ddPCR eine absolute Quantifizierung der GcfDNA, ohne dabei, wie die qPCR auf eine externe Referenz bzw. Kalibrierung angewiesen zu sein (68, 72). Verglichen mit der Quantifizierung mittels Next Generation Sequencing stellt sie bei gleichem Ergebnis eine kostengünstigere und schnellere Alternative dar (38, 58).

6.4

7 Material und Methode

7.1 Untersuchungsablauf

Der Durchführung dieser Untersuchung lagen zwei grundsätzliche Überlegungen zugrunde: zum einen wollten wir die Qualität des zum Zweck der GcfDNA-Quantifizierung entwickelten ddPCR-Assays überprüfen, wofür bereits etablierte Monitoring-Parameter als Vergleichswerte benötigt wurden. Im Falle des hiesigen Kollektivs lebertransplantierten Patienten konnten wir zu diesem Zweck auf etablierte Leberparameter zurückgreifen und die Qualität des Assays in Zusammenschau dieser mit den Ergebnissen der GcfDNA-Quantifizierungen und den klinischen Verläufen der Patienten beurteilen. Zum anderen bestand die Frage, ob die Dynamik der GcfDNA der gängigen Leberparameter in Bezug auf das Monitoring nach einer Transplantation überlegen ist, insbesondere im Zusammenhang mit leberpathologischen Ereignissen wie beispielsweise Cholestase oder Virus-Hepatitis.

Im Zuge der Untersuchung wurden folgende Arbeitsschritte unternommen, auf die im Verlauf des Kapitels detaillierter eingegangen wird: zunächst erfolgte die Identifizierung und Erfassung eines geeigneten Kollektivs lebertransplantierten Patienten und im Anschluss die Identifizierung geeigneter SNPs für die jeweilige Kombination aus Leber-Empfänger und -Spender. Daraufhin wurde die Isolierung und Quantifizierung der GcfDNA aus dem Blut der Empfänger durchgeführt. Schließlich erfolgte die Abfrage relevanter laborchemischer Parameter und deren Überführung in eine geeignete Struktur, sowie die Sichtung, Auswertung und Codierung der individuellen Krankheitsverläufe des Kollektivs unter anamnestischen, klinischen, bildgebenden und mikrobiologischen Gesichtspunkten.

7.1.1 Erfassung des Patientenkollektivs

In die Untersuchung wurden ausschließlich volljährige Patienten eingeschlossen, die im Zeitraum von April 2017 bis Dezember 2017 eine Lebertransplantation in der Transplantationschirurgie der Universitätsmedizin Mainz erhielten und schriftlich in die Teilnahme eingewilligt hatten. Patientin 1 wurde retrospektiv erfasst und ins Kollektiv eingeschlossen, bei allen weiteren Patienten erfolgte die Einwilligung vor der Transplantation und die Erfassung dementsprechend prospektiv. Abbildung 2 zeigt schematisch den Ablauf der Kollektiverfassung.

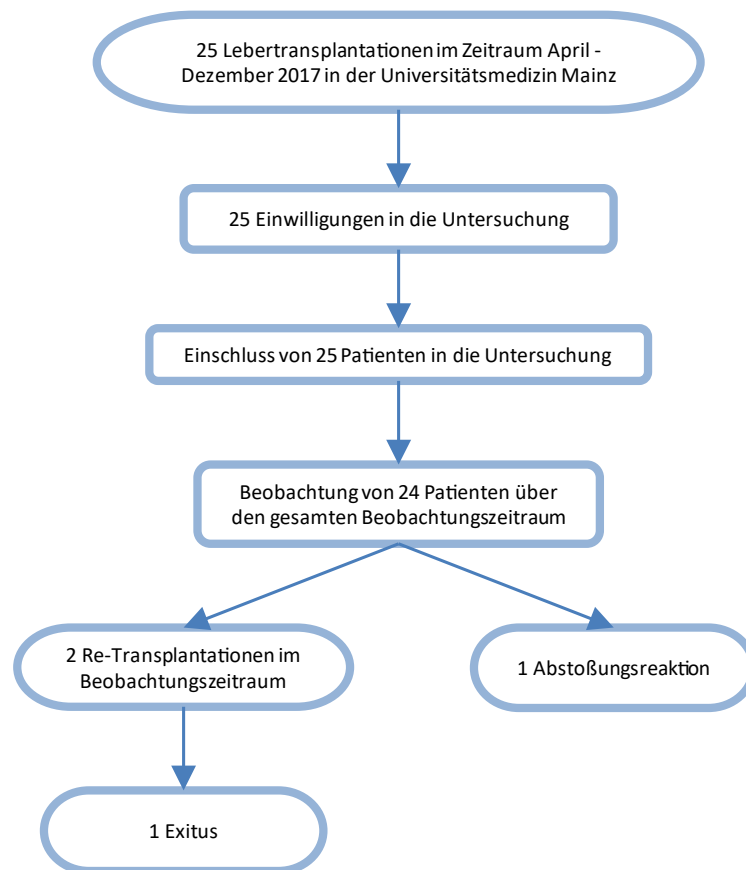


Abbildung 2 - Flowchart: Untersuchungsablauf

7.1.2 Beobachtungszeitraum

Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich von maximal sieben Tagen vor bis 450 Tagen nach Transplantation und umfasste den stationären Aufenthalt im Rahmen der Transplantation, eventuell folgende stationäre Aufenthalte, beispielsweise aufgrund von Komplikationen oder invasiven Untersuchungen, sowie die ambulante Nachsorge in der Transplantationsambulanz. Diese erfolgte in Form von Kontrollterminen in der Transplantationssprechstunde und umfasste neben der Beschwerdeanamnese auch Wundkontrollen, laborchemische und mikrobiologische Untersuchungen und bildgebende Verfahren.

Im Zeitraum von 339 bis 450 Tagen nach der Transplantation fand als Teil des Nachsorgeprozederes eine ausführliche Check-Up-Untersuchung inklusive sonographischer Bildgebung und Leberpunktion statt. Im Falle der Patienten 4, 14 und 25 lag die Untersuchung außerhalb des Beobachtungszeitraumes, bei den Patienten 5, 9, 12 und 18 lagen keine Angaben bezüglich der Durchführung der Untersuchung vor. Da Patientin 22 25 Tage nach ihrer Re-Transplantation verstarb, fand in ihrem Fall kein Check-Up statt.

7.1.3 Vergabe der Spenderorgane und MELD-Scores

Die Zuteilung der Spenderorgane durch Eurotransplant mit dem MELD-Score als maßgebliches Vergabekriterien (18). Im Rahmen dieser Dissertation erfolgte die Berechnung des labMELD-Scores zum Tag der Transplantation in Microsoft Excel mithilfe der im Eurotransplant-Manual angegebenen Formel „ $MELD\ Score = 0.957 \times \log_e(creatinine\ mg/dL) + 0.378 \times \log_e(bilirubin\ mg/dL) + 1.120 \times \log_e(INR) + 0.643$ “ (18). Der errechnete Wert wird laut Manual anschließend mit dem Faktor 10 multipliziert und auf die nächstgelegene ganze Zahl gerundet. Für Kreatinin kann maximal ein Wert von 4mg/dl angerechnet werden. Die Durchführung einer Dialyse an mindestens zwei Tagen der vorangegangenen Woche wird mit einem Kreatinin-Wert von 4mg/dl gleichgesetzt (16, 18).

Zu beachten ist hierbei, dass die Zuteilung der Organe nicht immer rein aufgrund des labMELD-Wertes erfolgte: In drei Fällen (Patientinnen 1 und 8, Patient 10) erfolgte die Zuteilung aufgrund einer High-Urgency-Priorität, zusätzlich wurde Patientin 12 nach der ersten Transplantation infolge einer Thrombose der Arteria hepatica mit HU-Priorität erneut gelistet und re-transplantiert. Patientin 7 war bereits zu Beginn der Beobachtung in der Kategorie Exceptional MELD gelistet und erhielt ihr Organ letztlich aufgrund einer zentrumsinternen Priorisierungsliste. Den Patienten 12 (Transplantation 1), 17 und 23 wurde aufgrund ihrer Vorerkrankungen ebenfalls ein Exceptional MELD angerechnet.

7.2 Gewinnung und Quantifizierung der GcfDNA

Die Isolierung der genomischen DNA (gDNA) der Patienten sowie die Detektion und Quantifizierung der GcfDNA erfolgte aus Restmaterial der stationären und ambulanten Blutentnahmen.

7.2.1 Gewinnung der Empfänger-DNA und Identifizierung geeigneter SNPs

Die Blutproben der ins Kollektiv aufgenommenen Patienten trafen in EDTA-Röhrchen im Labor ein. Das verbliebene Restmaterial daraus wurde zentrifugiert, um das Plasma vom Blutkuchen zu trennen. Die zweimalige Zentrifugation erfolgte spätestens zwei Stunden nach der Blutentnahme, sodass einer Kontamination des cfDNA-Gehalts der Probe durch freigesetzte gDNA aus zerfallenen, kernhaltigen Blutzellen zuvorgekommen wurde. Plasma und zelluläre Blutbestandteile wurden durch Pipettieren voneinander getrennt, anschließend wurden beide Komponenten bis zur weiteren Verwendung separat bei -80°C gelagert.

Aufgrund der Reichhaltigkeit des Blutkuchens an qualitativ hochwertiger DNA erfolgte hieraus zunächst die Genotypisierung der Leberempfänger. Hierfür wurde aus dem Blutkuchen der ersten eingegangenen EDTA-Monovette des jeweiligen Patienten die genomische DNA mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Diese wurde im Anschluss an ihre Isolierung auf das Vorliegen von SNPs hin untersucht, die sich für den Nachweis der GcfDNA eignen. Hierfür wurde in Anlehnung an die von Beck et al. in ihrem Paper „Digital Droplet PCR for Rapid Quantification of Donor DNA in the Circulation of Transplant Recipients as a Potential Universal Biomarker of Graft Injury“ (41) beschriebenen Verfahrensweise vorgegangen. Die in dieser Untersuchung verwendeten und von der Firma IDT (Coralville, Iowa, USA) hergestellten Sonden sind in dem Paper „One fits all: a highly sensitive combined ddPCR/pyrosequencing system for the quantification of microchimerism after hematopoietic and solid organ transplantation“ aufgeführt, in welches Daten aus dieser Arbeit eingeflossen sind (68).

Bei Verwendung von SNPs mit bekannter MAF nahe 0,5 ($p=0,5$, $q=0,5$) ist nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz ($p^2+2pq+q^2=1$) (74) davon auszugehen, dass diese zu ca. 25% pro Allel homozygot bei Spender und Empfänger vorliegen, da in diesem Falle $p^2=q^2=(0,5)^2=0,25=25\%$ gilt. Mit einer Wahrscheinlichkeit von circa 12,5% liegen daher also heterolog homozygote Allele bei Spender und Empfänger vor (z.B. „GG“ und „CC“). SNPs dieser Konstellation suchten wir für die Beantwortung unserer Fragestellung. Um drei dieser heterolog homozygoten SNPs pro Kombination aus Patient und Spender zu identifizieren, genotypisierten wir initial 30 SNPs jedes Patienten, da unter diesen bei einer Wahrscheinlichkeit von 12,5% drei bis vier heterolog homozygote SNPs zu erwarten sind. Somit konnten wir davon ausgehen, durch die Analyse von 30 SNPs mindestens drei geeignete SNPs zu identifizieren.

In Abbildung 3 ist der Ablauf der Identifizierung der geeigneten SNPs schematisch dargestellt.

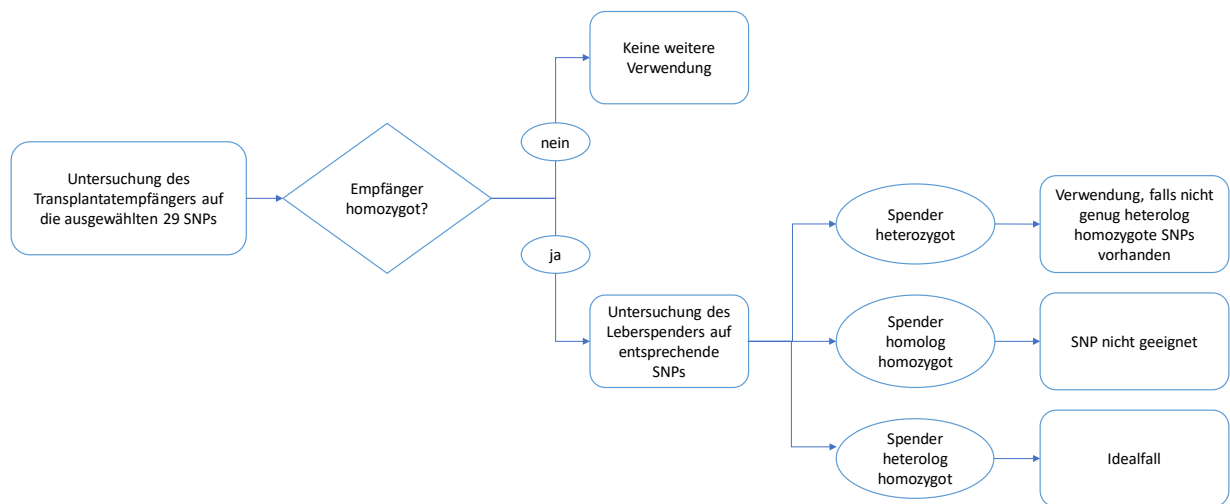


Abbildung 3 - Flowchart: Identifizierung der geeigneten SNPs

7.2.2 Gewinnung der Spender-DNA und Überprüfung der SNPs

Die DNA der Leberspender wurde aus dem von Eurotransplant mit dem Spenderorgan mitgesendeten Gewebe gewonnen, bei welchem es sich um Milzgewebe, Blutproben oder Gefäßwand-Abschnitte handelte. Aufgrund dieser verhältnismäßig geringen Material- und folglich geringen DNA-Menge hatten wir uns dazu entschieden, zunächst die Empfänger-DNA wie oben geschildert und erst im Anschluss die Spender-DNA zu genotypisieren. Hierzu wurde das Gewebe im Anschluss an die Transplantation aus dem OP-Trakt abgeholt, im Labor grob zerkleinert und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingelagert. Die DNA wurde nach Homogenisierung des Gewebes mit einem Dispergiergerät (Ultra-Turrax, IKA) in phosphatgepufferter Salzlösung zerkleinert und im Folgenden ebenfalls mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) isoliert. Anschließend wurden alle SNPs, für die sich der Leberempfänger als homozygot erwiesen hatte, auch in der Spender-DNA genotypisiert. Schlussendlich wurden im Schnitt drei Assays pro Patient ausgewählt: im Idealfall enthielt jeder Assay einen SNP, für den Spender und Empfänger heterolog homozygot waren.

Im Falle der Patienten 15, 16, 23 und 25 lag keine mitgesendete Gewebeprobe zur Bestimmung des Spender-Genotyps vor. In diesem Fall erfolgte die Bestimmung durch Rückrechnung aus der Gesamtmenge der cfDNA (s. Ergebnisteil).

7.2.3 Isolierung der Gesamt-cfDNA und Qualitätsprüfung

Die Gesamt-cfDNA wurde mithilfe des QIAamp MinElute ccfDNA Kit (Qiagen) isoliert und mittels Picogreen quantifiziert. Die Qualität der Messung wurde mit der TapeStation2100 (Agilent) überprüft. Abbildung 4 zeigt die Auswertung der

Qualitätsverifizierung exemplarisch für Patient 23. Neben den Peaks für den Lower und Upper Endmarker wurde ein einziger weiterer Peak bei einer Länge von 168 Basenpaaren registriert, was der durchschnittlichen Länge von cfDNA-Molekülen entspricht. Somit war nachgewiesen, dass vornehmlich cfDNA aus dem Plasma isoliert wurde.

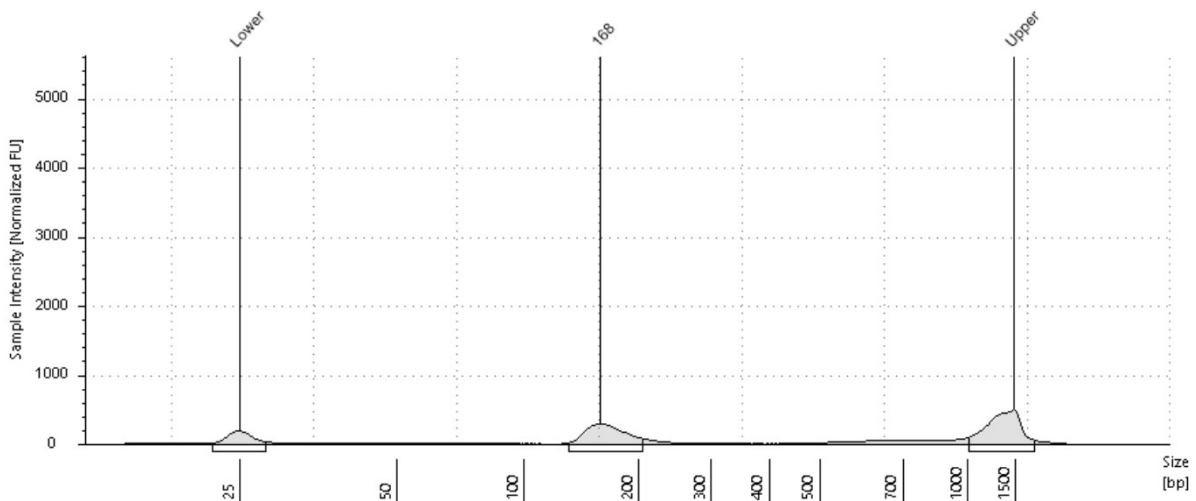


Abbildung 4 - Qualitätsverifizierung der GcfDNA-Messung (Patient 23)
Neben Lower und Upper Marker ist ein weiterer Peak bei einer Länge von 168 Basenpaaren erkennbar – dies entspricht der durchschnittlichen Länge der cfDNA-Moleküle

7.2.4 Quantifizierung der GcfDNA

Nach der Gewinnung der Gesamt-cfDNA konnte die Quantifizierung der Empfänger- und Spender-DNA mittels ddPCR durchgeführt werden. Hierfür wurden das QX200 Droplet Digital PCR System inklusive des QX200 Droplet Generator und des QX200 Droplet Reader (Bio-Rad, Feldkirchen, Deutschland), des ddPCR Supermix for Probes (Bio-Rad) und der bereits erwähnten Sonden verwendet. Jene Sonden und die Primer, welche für den Reaktionsansatz der ddPCR benötigt wurden, wurden lyophilisiert angeliefert und dann so aufbereitet, dass eine Endkonzentration von 900 nM für die Primer und 250 nM für die Sonden resultierte. Die DNA der Patienten wurde anfänglich testweise mit allen in der Untersuchung von Beck et al. verwendeten Sonden untersucht. Im weiteren Verlauf entschieden wir uns gegen die weitere Verwendung einzelner Sonden. Gründe hierfür waren beispielsweise, dass ihre Zielsequenz neben dem Minor Allel eine weitere Variante enthielt, die Einfluss auf die Fluoreszenzamplitude der Droplets hatte oder dass die Zielsequenz auf einem Gonosom lag, was sich je nach Geschlechterverhältnis von Spender und Empfänger als suboptimal erwies. Die übrigen, geeigneten Sonden wurden für die

Durchführung der ddPCR verwendet. Der PCR-Ansatz erfolgte nach Angaben des Herstellers mit gleichen Teilen FAM- und HEX-markierter Sonden.

Die Auswertung erfolgte mit der Quantasoft-Software Version 1.3.2.0. (Bio-Rad) unter Zuhilfenahme des Poisson-Algorithmus. Die endgültige Berechnung des GcfDNA-Anteils an der Gesamtmenge der cfDNA erfolgte mit der in der Software enthaltenen „Rare Event Detection“-Funktion.

Um schlussendlich aus den gemessenen Einzelwerten der jeweiligen verwendeten SNPs einen Wert zu erhalten, der den prozentualen Anteil der GcfDNA an der Gesamtmenge der zellfreien DNA für den jeweiligen Quantifizierungszeitpunkt wiedergibt, wurde aus den am jeweiligen Tag gemessenen Werten der einzelnen SNPs der Mittelwert berechnet. In den Fällen, in denen heterozygote Spender-SNPs in die Quantifizierung mit eingeflossen waren, wurde der für die heterozygoten SNPs berechnete Wert verdoppelt, um einen dem tatsächlichen Anteil entsprechenden Wert zu erhalten.

Der Standardfehler wurde von der Quantasoft-Software für jeden SNP und für jede Quantifizierung berechnet.

7.3 Auswertung laborchemischer Parameter

Um die Dynamik der GcfDNA im Hinblick auf Komplikationen und Ereignisse zu beurteilen und mit den bisher etablierten Möglichkeiten des Monitorings zu vergleichen, benötigten wir laborchemische Vergleichsparameter. Zu diesem Zweck erstellten wir zunächst eine Auswahl von 25 repräsentativen Parametern, welche in Tabelle 1 aufgeschlüsselt sind. Die in den stationären und ambulanten Blutentnahmen bestimmten Patientenwerte für diese Parameter wurden im Rahmen der Routinediagnostik an der Universitätsmedizin Mainz erhoben und, exklusive der Ergebnisse der Blutgasanalysen, über die elektronische Datenverarbeitung des Instituts für Klinische Chemie und Labormedizin mittels einer SQL-Datenbankabfrage aus *Swisslab* (Nexus, Berlin), dem verwendeten Laborinformationssystem, abgefragt.

Die vom Institut zugrunde gelegten Referenzbereiche der einzelnen Laborparameter finden sich im Anhang (s. Tabelle 19, Anhang 1). Innerhalb des Beobachtungszeitraums wurde für keinen der 25 Patienten der lösliche Interleukin-2-Rezeptor bestimmt, daher kann, obwohl er einer der 25 gewählten Parameter ist,

über dessen Dynamik und Verlauf in Bezug auf unsere Fragestellung keine Aussage gemacht werden.

Tabelle 1 - Liste der ausgewerteten Laborparameter

Kategorie	Parameter	Besondere Relevanz
Leberzellschaden	GPT (ALT)	leberzellspezifisch, Marker für Parenchymschaden, Indikator hepatischer Entzündungen
	GOT (AST)	Marker für Parenchymschaden, steigt v.a. bei Alkoholhepatitis und hepatischen Durchblutungsstörungen
	GLDH	leberzellspezifisch, erhöht v.a. bei HCC und fulminanter Hepatitis
Lebersynthese	Albumin	Synthese ausschließlich in Leber
	ADAM-TS13	Synthese überwiegend in Leber, erniedrigte Aktivität bei TTP-like Syndrome nach Leber-Transplantation
	Cholinesterase	Synthese überwiegend in Leber, erniedrigt z.B. bei Leberzirrhose und akuter Intoxikation
Cholestase	Gesamt-Cholesterin	Synthese und Abbau v.a. in Leber, erhöht z.B. bei PBC
	γ-GT	Spezifisch für Leber und Gallengangssystem, v.a. bei metabolisch-toxischen Ereignissen erhöht
	Gesamt-Bilirubin	Bestandteil des MELD-Scores
Gerinnung	Direktes Bilirubin	Gibt Aufschluss über v.a. exkretorische Leberfunktion
	Quick	Gibt Aufschluss über Leberfunktion
	INR	Bestandteil des MELD-Scores, gibt Aufschluss über Leberfunktion
Gerinnung	Faktor V	Gibt Aufschluss über Lebersyntheseleistung, dynamischer als Quick-Wert
	Thrombozyten	vermindert z.B. bei chronischen Lebererkrankungen und TTP-like Syndrome nach Leber-Transplantation
	D-Dimere	Hinweis auf Thrombenbildung, bspw. bei TTP-like Syndrome
Nierenparameter	Kreatinin	harnpflichtige Substanz, Bestandteil des MELD-Scores
	eGFR	Aufschluss über Filtrationsleistung der Niere
Entzündungsparameter:	CRP	sehr sensitiv, Synthese in Leber, Akute-Phase-Protein
	PCT	Synthese außerhalb Leber, dynamischer Sepsis-Marker, v.a. bei bakterieller Infektion
	Ferritin	Akute-Phase-Protein
Immunologie:	IgG	Verlaufsparameter für Infektionen, z.B. Virus-Hepatitis; erhöhte z.B. bei PSC, PBC
	IgM	Verlaufsparameter für Infektionen, z.B. Virus-Hepatitis, erhöht z.B. bei PBC
	sIL2R	früher Marker für Abstoßungsreaktionen
Weitere:	Hämoglobin	Peri- und postoperativer Verlaufs-Marker
	Kreatinkinase	Marker für Muskulaturschaden, perioperativer Marker (z.B. im Rahmen maligner Hyperthermie)
Zusätzliche Parameter:	Dialyse ja/nein	Bestandteil des MELD-Scores
	MELD	Aussage über Schwere und Überlebenschancen einer Leberpathologie

Als Marker der Leberzellschädigung entschieden wir uns für die Transaminasen GPT und GOT. Die Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) bzw. Alanin-Aminotransferase (ALT) eignet sich aufgrund ihrer Leberzellspezifität einerseits bestens als Marker für Leberzellschaden und gilt besonders als Indikator für hepatische Entzündungen (75, 76). Andererseits stellt sie einen etablierten Monitoring-Parameter für die Beurteilung der Organintegrität nach Transplantation dar und bietet sich somit als Referenz- und Vergleichswert für die Beurteilung der Eignung der GcfDNA zum Monitoring nach einer Lebertransplantation an (41). Auch die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) bzw. Aspartat-Aminotransferase (AST) spielt eine wichtige Rolle als gängiger

Routinemarker der Leberzellschädigung und steigt beispielsweise im Rahmen einer akuten Alkoholhepatitis oder Durchblutungsstörung stärker an als die GPT (31). Außerdem wählten wir als Parameter dieser Kategorie noch die Glutamat-Dehydrogenase (GLDH), welche gleichsam der GPT leberspezifisch ist und als mitochondriales Enzym vor allem im Rahmen schwerer leberpathologischer Ereignisse mit Nekrosebeteiligung wie fulminanter Hepatitiden und hepatozellulärer Karzinome steigt (31, 76).

Als Vertreter der Kategorie Syntheseparameter entschieden wir uns unter anderem für Albumin, welches ausschließlich in der Leber gebildet wird und daher eine zuverlässige Aussage über deren Funktion erlaubt (31). Die Protease ADAM-TS13, ebenfalls überwiegend in der Leber synthetisiert, zeigt nach Lebertransplantationen im Rahmen des gelegentlich auftretenden TTP-like Syndromes eine erniedrigte Aktivität, jedoch nicht in gleichem Maße erniedrigt wie bei Vorliegen einer TTP (77). Auch die Butyrylcholinesterase entstammt zum überwiegenden Teil der Leber und steigt bzw. fällt mit deren Syntheseleistung. So ist sie beispielsweise bei Vorliegen einer Leberzirrhose oder einer akuten Intoxikation in der Regel erniedrigt (31). Die Höhe des Gesamtcholesterins wird ebenfalls von der Syntheseleistung der Leber beeinflusst und kann beispielsweise bei Vorliegen einer PBC deutlich erhöht sein (76, 78).

Als Parameter der Cholestase interessierte uns einerseits die γ -Glutamyltransferase, bei der es sich um ein Leber- und Gallengangs-spezifisches Enzym handelt, und die aufgrund dieser Eigenschaften einen sehr empfindlichen Parameter für hepatobiliäre Pathologien darstellt. Sie gilt insbesondere als Indikator metabolisch-toxischen Schadens, beispielsweise im Rahmen von Alkohol-Abusus (31). Andererseits betrachteten wir das direkte und das Gesamt-Bilirubin, wobei das direkte Bilirubin zusätzlich zu seiner Funktion als Cholestaseparameter vor allem Aufschluss über die exkretorische Leberfunktion gibt und das Gesamt-Bilirubin einen Bestandteil der Formel zur Berechnung des MELD-Scores darstellt (18, 76, 79).

Weiterhin stellt die Blutgerinnung einen wichtigen Aspekt dar, da die Leber durch die Synthese der Gerinnungsfaktoren I, II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII XIII und der gerinnungshemmenden Enzyme Antithrombin III, Protein C und Protein S direkten Einfluss auf die Gerinnungskaskade der sekundären Hämostase hat (33). Zumindest die Faktoren II, V, VII, IX und X spiegeln sich beispielsweise in der Höhe des Quick-

Wertes und der INR wider, welche wir aus diesem Grund in die Beobachtung mit einbezogen. Die INR fließt ebenfalls in die Berechnung des MELD-Scores mit ein (18). Ein Vorteil der Betrachtung des in der Leber synthetisierten Gerinnungsfaktors V ist, dass er sich durch seine kurze Halbwertszeit dynamischer verhält als andere Gerinnungsfaktoren oder beispielsweise der Quick-Wert, welcher von zusätzlichen Faktoren abhängt (33). Somit gibt er nicht nur Aufschluss über die Gerinnungssituation, sondern auch zeitnah über die Syntheseleistung der Leber.

Im Rahmen diverser, leberpathologischer Zustände, zum Beispiel akuter Hepatitiden oder Leberzirrhosen oder auf während eines Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) kann es zu Thrombozytopenien und erhöhten D-Dimeren kommen, weswegen wir beide in unsere Auswahl laborchemischer Parameter mit aufnahmen (33, 77).

Im Bereich der Nierenparameter galt unsere Aufmerksamkeit zum Einen dem Kreatinin, welches als harnpflichtige Substanz einerseits bereits einen Rückschluss auf die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) zulässt, andererseits ein Bestandteil der Berechnungsformel des MELD-Scores ist (18). Andererseits betrachteten wir die geschätzte glomeruläre Filtrationsrate, welche mithilfe der CKD-EPI-Formel berechnet wurde (80). Zusätzlich nahmen wir die Durchführung eines Nierenersatzverfahrens mit in die Auswertung auf, da eine regelmäßige Dialyse (definiert als die Durchführung von zwei oder mehr Dialysen in der vorangegangenen Woche) den MELD-Score dahingehend verändert, dass zur Berechnung ein Kreatininwert von 4 mg/dl zugrunde gelegt wird (18). Die Informationen zur Durchführung einer Dialyse stammten aus den Arztbriefen der jeweiligen Patienten.

Bei den Entzündungsparametern legten wir uns auf eine Auswahl an Akute-Phase-Proteinen fest. Wir wählten C-reaktives Protein (CRP) als sehr sensitiven Parameter für Entzündungsvorgänge im Körper und etablierten Marker in deren Verlauf. Der Nachteil an CRP als Entzündungsmarker war im vorliegenden Fall jedoch, dass dieses in der Leber synthetisiert wird und damit von deren Syntheseleistung abhängig ist (31). Somit kann, gerade bei einer in der Syntheseleistung eingeschränkten Leber, ein zu erwartender Anstieg im Rahmen einer Entzündung, Infektion oder Sepsis ausbleiben oder nur schwach ausfallen. Daher bezogen wir uns zusätzlich auf Procalcitonin (PCT), welches, im Gegensatz zu CRP, bei Gesunden in den C-Zellen der Schilddrüse, in der Lunge und im Pankreas synthetisiert wird, im

Rahmen von Entzündungsvorgängen oder bakteriellen Infektionen sogar in allen parenchymatösen Organen (31). Durch seine rasche Dynamik bei Vorliegen einer bakteriellen Infektion im Gegensatz zu ausbleibendem oder nur moderatem Anstieg bei viralen und systemischen Pilz-Infektionen eignet es sich sehr gut als Marker zur Unterscheidung zwischen bakterieller und viraler Sepsis (31). Somit konnte ein beispielsweise durch eine geschädigte oder frisch transplantierte Leber gegebenenfalls ausbleibender CRP-Anstieg im Rahmen eines pathologischen Ereignisses über einen PCT-Anstieg dennoch detektiert werden. Als weiteres Akute-Phase-Protein wählten wir Ferritin.

Gesamt-IgG und Gesamt-IgM wurden aufgrund ihrer Rolle als Verlaufsparemeter im Rahmen von Infektionen wie beispielsweise Virus-Hepatitis berücksichtigt (31). Zusätzlich kann die IgG-Konzentration im Blut beispielsweise bei Vorliegen einer, gegebenenfalls auch nach der Transplantation rekurrent auftretenden PBC oder PSC erhöht sein, auch IgM kann bei einer PBC erhöht sein (31). Der lösliche Interleukin-2-Rezeptor sIL-2R war wegen seiner Eigenschaft, kurz vor der Abstoßung transplanterter Organe anzusteigen, ein interessanter Marker der Organintegrität (31). Hämoglobin sowie Creatin-Kinase flossen als peri- und postoperative Monitoring-Marker mit in die Auswertung ein (31).

Für die Datenauswertung wurden, sofern für einzelne Tage mehrere Erhebungen für einen Parameter vorlagen, nur die jeweils ersten Werte des Tages berücksichtigt. An einzelnen Tagen fehlende Werte konnten nicht nachträglich erhoben werden, da es sich zwar um eine prospektive Untersuchung handelte, die Auswahl der auszuwertenden Parameter jedoch erst nach Ende des Beobachtungszeitraums getroffen wurde.

7.4 Klinischer Verlauf und weitere Befunde

Die Auswertung der klinischen Verläufe der einzelnen Probanden erfolgte durch eine umfassende SAP-Recherche. SAP ist das von der Universitätsmedizin Mainz verwendete Patientenorganisations- und -verwaltungsprogramm. Für die Untersuchung erfolgte die Auswertung der im System hinterlegten Daten aller 25 Patienten des Kollektivs für den gesamten Beobachtungszeitraum bis 450 Tage nach Transplantation.

Initial war die Vergleichbarkeit der einzelnen Fälle aus mehreren Gründen nicht gegeben. Einerseits lagen bereits vor der Transplantation und damit vor

Untersuchungsbeginn für jeden Patienten individuelle Bedingungen vor: von verschiedenen Transplantationsursachen und diversen Vorerkrankungen über den dementsprechend unterschiedlich stark reduzierten Allgemeinzustand bis hin zu Alters- und Geschlechtsunterschieden. Die postoperativen Verläufe gestalteten sich ebenfalls individuell unterschiedlich, es traten verschiedene Komplikationen auf, die wiederum entsprechende Therapiemaßnahmen nach sich zogen. Bakterielle und virale Infektionen mit diversen Erregern traten bei mehreren Probanden auf und beeinflussten deren weiteren Heilungs- und Regenerations-Verlauf. Andere Probanden hingegen zeigten einen komplikationslosen Heilungsverlauf. Die postoperative Immunsuppression wurde individuell für jeden Patienten festgelegt, um den jeweiligen medizinischen Anforderungen bestmöglich gerecht zu werden. Weiterhin konnten die prä- und postoperativen Blutentnahmen und Untersuchungen nicht ausschließlich standardisiert verlaufen, sondern wurden individuell an den jeweiligen Verlauf und gegebenenfalls auftretende Komplikationen angepasst. Die größte Informationsquelle bezüglich der klinischen Verläufe waren die schriftlichen Verlegungs- und Entlass-Briefe sowie die Arztbriefe der Nachsorgetermine in der Transplantationssprechstunde.

Um eine Vergleichbarkeit der individuellen Verläufe und Ereignisse zu erzielen (soweit dies überhaupt möglich ist), war es nötig, stationäre Aufenthalte und relevante Ereignisse wie chirurgische Komplikationen, Infektionen und invasive Untersuchungsmethoden (bspw. Leberpunktion, ERCP) herauszufiltern und mit einem System zu codieren. Hierfür wurde bei jedem Probanden nach einem festen, identischen Schema verfahren. Alle im SAP vorhandenen Arztbriefe und Verlegungsberichte des Untersuchungszeitraumes wurden gesichtet und auf die folgenden Punkte hin ausgewertet: Transplantationsursache, relevante Vorerkrankungen des jeweiligen Probanden, Dauer der stationären Aufenthalte und Komplikationen. Hierzu zählten sowohl intra- und postoperativ aufgetretene chirurgische, internistische und weitere Fachdisziplinen betreffende Komplikationen, als auch in den Arztbriefen erwähnte Infektionen, die Durchführung von Dialyse oder invasiven Untersuchungen. Im Anschluss erfolgte die Auswertung der mikrobiologischen Untersuchungsergebnisse, um in den Arztbriefen erwähnte Infektionen zu verifizieren und, falls möglich, deren Dauer zu bestimmen.

Anschließend wurden die im Kollektiv aufgetretenen Infektionen, die chirurgischen, internistischen, hämatologischen, neurologischen, psychiatrischen,

schmerzmedizinischen und pharmakologischen Komplikationen und weitere Ereignisse, wie beispielsweise Bluttransfusionen oder invasive Therapiemaßnahmen, welche sich gegebenenfalls in der laborchemischen Auswertung widerspiegeln, zusammengetragen. Die Gesamtheit dieser aufgetretenen Komplikationen, Ereignisse und Infektionen wurde anschließend auf eine Auswahl von acht repräsentativen Vertretern reduziert (s. Tabelle 2). Hierbei wurden sowohl überdurchschnittlich häufiges Vorkommen der jeweiligen Komplikation als auch deren besondere Leberpathogenität berücksichtigt. Diese ausgewählten Ereignisse waren: Infektionen mit Hepatitis-C- oder E-Virus (HCV bzw. HEV), Cytomegalie-Virus (CMV), Epstein-Barr-Virus (EBV), Herpes-Simplex-Virus (HSV), das Auftreten einer Anastomoseninsuffizienz bzw. -stenose, Cholestase und das Auftreten von Fieber.

*Tabelle 2 - Ausgewertete klinische Ereignisse und Komplikationen
Die Auswahl erfolgte sowohl aufgrund von Häufigkeit des Auftretens als auch aufgrund leberpathologischer Relevanz*

Ausgewählte Komplikationen
HCV-Infektion
HEV-Infektion
CMV-Infektion
EBV-Infektion
HSV-Infektion
Cholestase
Anastomosen-Insuffizienz/-Stenose
Fieber

Diese Auswahl sowie stationäre Aufenthalte der Patienten wurden im nächsten Schritt mit „1“ für ihr Vorliegen beziehungsweise „0“ für ihr Nicht-Vorliegen kodiert. Somit waren die individuell unterschiedlichen Verläufe in den wichtigsten Gesichtspunkten in eine vergleichbare und für die statistische Auswertung geeignete Form überführt worden.

Um einen Zusammenhang zwischen den gewählten Ereignissen und der Höhe der GcfDNA zu beurteilen, entschieden wir uns dazu, die Laborwerte und gegebenenfalls bestimmten GcfDNA-Werte in einem Zeitraum von jeweils 14 Tagen vor und nach dem Auftreten des Ereignisses zu betrachten.

7.5 Statistik und verwendete Programme

Sofern nicht anders angegeben, wurde die Datenauswertung mit Microsoft Excel und GraphPad Prism durchgeführt. Die statistische Auswertung wurde freundlicherweise zum Teil vom Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik mit dem Statistikprogramm R durchgeführt. Die Literaturrecherche erfolgte mit PubMed. Die schriftliche Arbeit wurde mit Microsoft Word erstellt. Grafiken und Abbildungen wurden mit Microsoft PowerPoint, Microsoft Excel und GraphPad Prism erstellt.

Die Verwendung von Restmaterial für die Evaluation und Validierung diagnostischer Tests an der Universitätsmedizin Mainz ist von der Ethik-Kommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz zugelassen. Die Zustimmung zur Verwendung des Materials wurde von den Patienten bei Aufnahme gegeben.

8 Ergebnisse

8.1 Erfasstes Patientenkollektiv und Auswahl endgültiger Laborparameter

Das Kollektiv umfasste nach Ende des Erfassungszeitraumes 25 Patienten, darunter neun Frauen (36%) und 16 Männer (64%) (s. Tabelle 3). Der Altersmedian der weiblichen Patientinnen lag bei 62 Jahren, der der männlichen Patienten bei 58,5 Jahren. Für das gesamte Kollektiv ergab sich somit ein Altersmedian von 59 Jahren. Die jüngste Patientin war zum Zeitpunkt der Transplantation 34, der jüngste Patient 42 Jahre alt. Das höchste Alter am Transplantationstag lag sowohl bei den weiblichen als auch den männlichen Patienten bei 69 Jahren.

Tabelle 3 - Zusammensetzung des Patientenkollektivs

Patient	Geschlecht	Alter	labMELD	Ursache	Besonderheit
1	f	34	36	medikamentös-toxisches akutes Leberversagen	
2	m	67	16	äthyltoxische Zirrhose	
3	m	50	33	äthyltoxische Zirrhose	akut-auf-chronisches Leberversagen
4	m	52	16	äthyltoxische Zirrhose	
5	f	62	13	äthyltoxische Zirrhose mit HCC	Hepatitis C-Ko-Pathogenese
6	f	69	16	Primär Biliäre Cholangitis mit HCC	
7	f	44	28	Primär Sklerosierende Cholangitis mit Zirrhose	
8	f	69	37	akutes Leberversagen unklarer Genese	
9	m	69	26	kryptogene Zirrhose	
10	m	59	38	Hepatitis B-Reaktivierung	akut-auf-chronisches Leberversagen
11	m	51	12	äthyltoxische Zirrhose	
12.1	f	58	7	Adulte Polyzystische Degeneration der Leber	Re-Transplantation
12.2	f	58	15	Thrombose der Arteria hepatica	
13	m	65	13	äthyltoxische Zirrhose+ HCC	
14	m	58	25	äthyltoxische Zirrhose	
15	m	44	26	äthyltoxische Zirrhose	
16	f	56	40	Primär Sklerosierende Cholangitis mit Zirrhose	
17	m	45	22	Primär Sklerosierende Cholangitis mit Zirrhose	
18	m	55	39	Hepatitis B-Zirrhose mit HCC	
19	m	64	10	Hepatitis C-Zirrhose mit HCC	
20	m	63	21	äthyltoxische Zirrhose	
21	m	42	23	Zirrhose bei Budd-Chiari-Syndrom	
22.1	f	66	20	äthyltoxische Zirrhose	Re-Transplantation
22.2	f	66	40	Stenose der Vena Cava	Exitus
23	m	66	16	äthyltoxische Zirrhose mit HCC	
24	f	64	17	kryptogene Zirrhose	
25	m	66	21	äthyltoxische Zirrhose	

Der Mittelwert der labMELD-Scores des gesamten Patientenkollektivs am Transplantationstag betrug 23,19, wobei die Re-Transplantationen von Patientin 12 und Patientin 22 jeweils als eigenständiger Wert in diese Berechnung miteingingen. Die Patientinnen 16 und 22 hatten mit einem labMELD von 40 den höchsten Wert des Kollektivs. Den niedrigsten labMELD-Score mit einem Wert von 7 wies Patientin 12 am Tag ihrer ersten Transplantation auf.

Nach Sichtung aller laborchemischen Daten der Patienten und unter Berücksichtigung der klinischen Verläufe und Komplikationen beschlossen wir, den Fokus der statistischen Auswertung auf die Korrelation der GcfDNA-Dynamik mit zwei repräsentativen Parametern zu legen, die sowohl Aufschluss über die Organ- bzw. Transplantatfunktion geben als auch als Indikator diverser Komplikationen fungieren: wir wählten hierfür einerseits die Glutamat-Pyruvat-Transaminase als

leberspezifischen Marker für die Organfunktion und andererseits das Gesamt-Bilirubin als Cholestase-Parameter.

8.2 Transplantationsursachen

Die weitaus führende Transplantationsursache des erfassten Kollektivs waren Leberzirrhosen unterschiedlicher Genese (n=21). In zwölf Fällen und somit am häufigsten handelte es sich um Zirrhosen äthyltoxischen Ursprungs, in einem Fall mit Hepatitis-C-bedingter Ko-Pathogenese. Weitere Ursachen für eine Zirrhose waren PSC (n=3), HBV (n=1), HCV (n=1), kryptogene Zirrhosen (n=2), Budd-Chiari-Syndrom (n=1) und PBC (n=1). Sechs dieser zwölf Patienten hatten zusätzlich zu der Zirrhose ein hepatozelluläres Karzinom entwickelt.

Nur bei vier Patienten lag die Transplantationsursache nicht in einer Zirrhose begründet. In diesen Fällen war der Grund für die Transplantation je einmal ein medikamentös-toxisches, akutes Leberversagen, ein akutes Leberversagen unklarer Genese, eine Adulte Polyzystische Degeneration der Leber (APDL) und die Reaktivierung einer Hepatitis B-Infektion mit konsekutivem, akut-auf-chronischen Leberversagen.

8.3 SNP-Auswahl und Genotypisierung von Empfängern und Spendern

Alle Patienten des Kollektivs, respektive alle Transplantatempfänger, wurden zunächst auf die gleiche Auswahl von 30 SNPs genotypisiert, welche zu Übersichtlichkeitszwecken im Rahmen der Untersuchung mit Nummern versehen wurden (s. Tabelle 20, Anhang 2). Im Anschluss an die Genotypisierung der Transplantatempfänger wurden diejenigen SNPs, für die sich die Empfänger als homozygot erwiesen hatten, auch bei den Leberspendern untersucht.

Bei der Auswahl der passenden SNPs für die jeweilige Kombination aus Empfänger und Spender kamen zwei verschiedene Vorgehensweisen zum Einsatz, abhängig davon, ob von den Leberspendern Gewebeproben zur DNA-Bestimmung vorlagen oder nicht.

8.3.1 Konstellation 1: Spender-DNA verfügbar → Genotypisierung der SNPs in der DNA von Empfängern und Spendern

In der Mehrzahl der Fälle waren eine Gewebeprobe oder EDTA-Blut der Leberspender von Eurotransplant mit der Spenderleber mitgeschickt worden. In diesem Fall wurde nach der bereits im Methodenteil beschriebenen Verfahrensweise

vorgegangen und es wurden nach der Isolierung der Spender-DNA diejenigen SNPs darin genotypisiert, für die sich der Empfänger als homozygot herausgestellt hatte.

8.3.2 Konstellation 2: keine Spender-DNA verfügbar → Rückrechnung des Spendergenotyps aus der Gesamt-cfDNA:

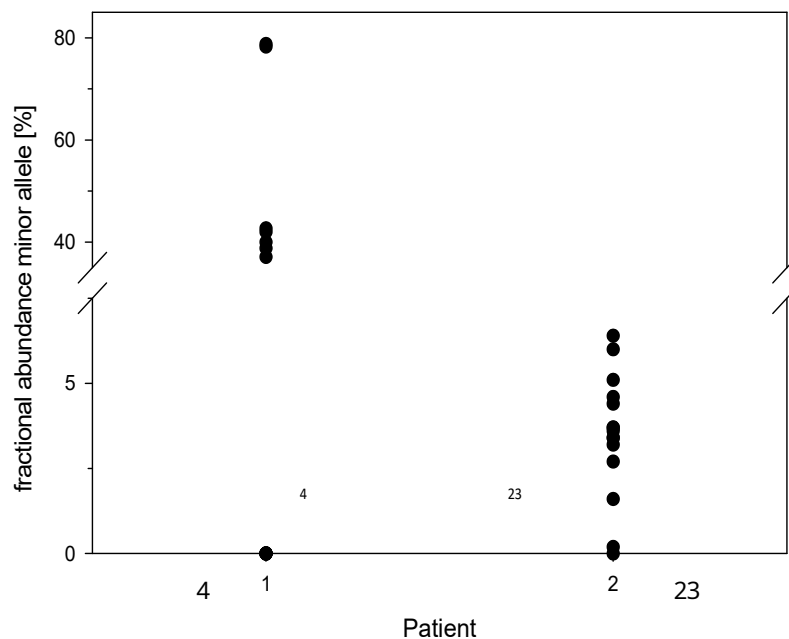
Bei den Patienten 15, 16, 23 und 25 lag keine Spender-DNA zur Identifizierung geeigneter SNPs vor. Für diese Patienten erfolgte die Bestimmung des Spender-Genotyps durch Rückrechnung aus der Gesamt-cfDNA und dem Genotyp des jeweiligen Empfängers. Das Vorgehen für solch einem Fall wird hier beispielhaft dargestellt an Patient 4, für den Spendergewebe zur Genotypisierung vorlag, sodass die Ergebnisse im Anschluss an die Rückrechnung miteinander verglichen werden und die Rechenmethode somit validiert werden konnte.

Der Patient hatte für SNP 1 („rs3909244“) den Genotyp „GG“, war also homozygot für diesen SNP. In der cfDNA-Quantifizierung wurde nun für diesen SNP ein Anteil von ca. 38,8% mit abweichendem Genotyp nachgewiesen, dieser musste demnach vom Spender stammen. Betrachtet man nun SNP 17 („rs954783“), für den der Patient ebenfalls den Genotyp „GG“ hatte, so lässt sich feststellen, dass im Falle dieses SNPs der Anteil mit abweichendem Genotyp, also der vom Spender stammende Anteil, circa 77,2 % betrug. Vergleicht man die Anteile des abweichenden Genotyps miteinander, so lässt sich schlussfolgern, dass der Leberspender heterozygot für SNP 1 war und homozygot für SNP 17, da das Signal für SNP 17 näherungsweise doppelt so hoch war wie für SNP 1. Aus dem bekannten Genotyp „GG“ des Empfängers für beide SNPs ließ sich daher ableiten, dass der Genotyp des Spenders für SNP 1 „CG“ und für SNP 17 „CC“ lauten musste.

Neben der heterolog homozygoten und der heterozygoten Ausprägung der SNPs existiert noch eine weitere mögliche Konstellation, die bei Patient 4 beispielsweise für SNP 18 („rs12550832“) vorlag: der untersuchte SNP kann homolog homozygot, also bei Spender und Empfänger in der exakt gleichen Ausprägung, vorliegen. In diesem Fall lässt sich logischerweise kein abweichender Anteil nachweisen.

Abbildung 5 zeigt deutlich, dass sich bei Patient 4 in der Abnahme einen Tag nach der Transplantation (linke Säule) die Anteile des Minor Alleles, respektive des abweichenden Genotyps, auf ca. 40% und 80% konzentrieren, was der heterozygoten bzw. homozygoten Ausprägung des jeweiligen Spender-SNPs entspricht. In der Abbildung sieht man außerdem, dass es Messungen mit 0%

abweichendem Genotyp gab. Hierbei handelt es sich um homolog homozygot vorliegende SNPs.



*Abbildung 5 - Verteilung des prozentualen Anteils des Minor Allels an der GcfDNA
 Prozentualer GcfDNA-Anteil (y-Achse) der einzelnen SNPs an der Gesamt-cfDNA in der ersten Quantifizierung
 (x-Achse) bei Patient 4 (Tag 1) und Patient 23 (Tag 5) nach Tx (Häuser et al., 2023): einen Tag nach Tx lässt
 sich deutlich eine Gruppierung der einzelnen SNPs auf GcfDNA-Anteile von 0%, 40% und 80% erkennen, 5 Tage
 nach Tx ist keine eindeutige Aufteilung mehr erkennbar*

In der Abbildung wird weiterhin deutlich, dass sich im Falle von Patient 23 (rechte Säule), bei dem die Abnahme fünf Tage nach der Transplantation erfolgte, die Höhe der abweichenden Genotyp-Anteile nicht mehr so deutlich trennen ließ, da die GcfDNA-Konzentration im Blut in der Zwischenzeit bereits deutlich gesunken war. Dies unterstreicht die Bedeutung einer Abnahme und Bestimmung zeitnah nach der Transplantation, falls die Ergebnisse in der Bestimmung des Spender-Genotyps Verwendung finden sollen.

Tabelle 4 zeigt die für die einzelnen Patienten identifizierte Anzahl homolog vorliegender SNPs und ihre homolog homozygote, heterolog homozygote oder heterozygote Ausprägung in der DNA der Leberspender.

*Tabelle 4 - Ausprägung der SNPS der Leberempfänger
Anzahl der bei den jeweiligen Patienten homolog vorliegenden SNPs und ihre Ausprägung in der DNA der
Leberspender*

Patient	Anzahl homozygoter SNPs	Spender heterolog homozygot	Spender homolog homozygot	Spender heterozygot
1	15	5	5	5
2	16	4	3	9
3	18	2	8	8
4	14	2	6	6
5	13	6	7	0
6	15	3	4	8
7	22	9	7	6
8	16	4	2	10
9	18	2	6	10
10	10	1	1	8
11	18	7	4	7
12.1	18	3	3	12
12.2	18	4	4	10
13	19	4	5	10
14	17	4	7	6
15	11	2	6	3
16	13	5	1	7
17	13	2	6	5
18	14	4	3	7
19	11	2	4	5
20	16	4	7	5
21	17	5	7	5
22	18	4	7	7
23	17	4	4	9
24	16	5	3	8
25	15	5	4	5

Von den 30 untersuchten SNPs lagen bei den Patienten des Kollektivs mindestens zehn (Patient 10) und maximal 22 (Patientin 7) SNPs homozygot vor. Im Median lagen pro Patient 16 homozygote SNPs vor.

8.3.3 Endgültige Zusammensetzung der SNP-Auswahl

Insgesamt wurden für jeden Patienten zwei bis sechs geeignete SNPs identifiziert und ausgewertet. Tabelle 5 gibt einen Überblick, wie viele und welche SNPs schlussendlich für die jeweiligen Patienten ausgewählt wurden. Bei denjenigen Patienten, bei denen keine drei heterolog homozygoten SNPs ausgewählt werden

konnten, wurden entweder lediglich zwei verwendet oder, zusätzlich zu den homozygoten, auch heterozygote Marker verwendet.

*Tabelle 5 - Ausprägung der SNPs der Leberspender
Anzahl, rs-Identifizier und Genotyp des Leberspenders der für die einzelnen Patienten ausgewerteten SNPs*

Patient	Anzahl verwendeter SNPs	Spender heterolog homozygot	Spender heterozygot	rs-Identifizier
1	3	3	0	rs942571 rs989309 rs2766535
2	3	3	0	rs1883284 rs10228737 rs3822607
3	2	2	0	rs6436409 rs2766535
4	2	2	0	rs954783 rs13185616
5	4	3	1	rs2312356 rs942571 rs989309 (Spender heterozygot) rs13185616
6	3	3	0	rs10734083 rs13333451 rs741384
7	3	3	0	rs942571 rs13185616 rs11610836
8	3	3	0	rs1883284 rs942571) rs2766535
9	2	2	0	rs12064796 rs11610836
10	3	1	2	rs3909244 rs2072042 (Spender heterozygot) rs3822607 (Spender heterozygot)
11	3	3	0	rs1883284 rs8092926 rs13185616
12.1	3	3	0	rs2312356 (beide Spender homozygot) rs13333451 rs12064796
12.2	6	4	1	rs3909244 rs2312356 (beide Spender homozygot) rs6436409 rs13333451 (Spender homolog homozygot) rs954783 rs12064796 (Spender heterozygot)

Patient	Anzahl verwendeter SNPs	Spender heterolog homozygot	Spender heterozygot	rs-Identifizier
13	4	3	1	rs1883284 rs13333451 rs7171 rs11610836 (Spender heterozygot)
14	3	3	0	rs1883284 rs4632826 rs10228737
15	3	3	0	rs13317873 rs35736520 rs7072759
16	4	4	0	rs12064796 rs1265094 rs2072042 rs3822607
17	2	2	0	rs3909244 rs942571
18	3	3	0	rs10164176 rs7171 rs1265094
19	2	2	0	rs10164176 rs1522662
20	3	3	0	rs2766535 rs954783 rs13185616
21	3	3	0	rs8092926 rs7072759 rs13185616
22.1	4	3	1	rs8092926 rs13333451 rs12064796 (Spender heterozygot) rs251022
22.2	-	-	-	-
23	3	3	0	rs4632826 rs251022 rs3822607
24	3	3	0	rs12550832 rs3822607 rs11610836
25	3	3	0	rs4632826 rs2072042 rs11610836

Eine besondere Situation lag bei Patientin 12 vor: Bezüglich der ersten Transplantation wurden drei SNPs identifiziert, für die sich Patientin und Spender als heterolog homozygot erwiesen (SNP 2, 10, 19). Für die zweite Transplantation fanden sich ebenfalls drei SNPs, für die eine solche Konstellation vorlag (SNP 1, 7, 17). Zusätzlich war Spender 2 verglichen mit Patientin 12 auch für SNP 2, der ursprünglich für Transplantation 1 ausgewählt worden war, heterolog homozygot. Für

SNP 10 erwies sich der zweite Leberspender als homolog homozygot, für SNP 19 als heterozygot. So lagen für die Beobachtung nach der zweiten Transplantation vier SNPs in gewünschter Form vor (SNP 1, 2, 7, 17), zusätzlich wurden die beiden ursprünglich für Transplantation 1 ausgewählten SNPs 10 und 19 weiter ausgewertet. In die Auswertung von Patientin 12 flossen nach ihrer zweiten Transplantation also insgesamt sechs SNPs ein.

Da Patientin 22 25 Tage nach ihrer Re-Transplantation ohne erneute GcfDNA-Quantifizierung verstarb, liegen für die Konstellation der Patientin mit ihrem zweiten Leberspender keine Informationen bezüglich der SNP-Ausprägung vor.

8.4 Ergebnisse der GcfDNA-Quantifizierungen: Höhe, zeitlicher Verlauf

Im Rahmen der Untersuchung wurden sowohl die Gesamt-Menge der zellfreien DNA als auch der prozentuale GcfDNA-Anteil an dieser Gesamtmenge bestimmt.

Abbildung 6 zeigt den Verlauf des GcfDNA-Anteils des Gesamtkollektivs über den Beobachtungszeitraum, zusammengefasst für bestimmte Zeitintervalle nach der Transplantation. Einen Überblick über die in den einzelnen Quantifizierungen gemessene cfDNA-Gesamtmenge und die jeweiligen GcfDNA-Anteile gibt Tabelle 6. Bei einigen Patienten lag nach der Genotypisierung und der Bestimmung des GcfDNA-Anteils nicht mehr genug Probenmaterial für die Quantifizierung der Gesamtmenge der zellfreien DNA vor. In diesen Fällen findet sich in der Tabelle kein Wert.

Insbesondere in den ersten Tagen nach der Transplantation wurde die GcfDNA bei allen Patienten mit Ausnahme von Patientin 1, welche retrospektiv erfasst wurde, teils mehrfach quantifiziert: bei 24 Patienten geschah dies innerhalb des ersten bis fünften und bei 22 Patienten erneut im Zeitraum des sechsten bis zehnten postoperativen Tages. Nach Abschluss des Beobachtungszeitraums lagen für jeden Patienten insgesamt zwei bis acht Messungen vor, für das gesamte Kollektiv insgesamt 109 Messungen. Für jeden Probanden wurde im Durchschnitt vier Mal die GcfDNA bestimmt.

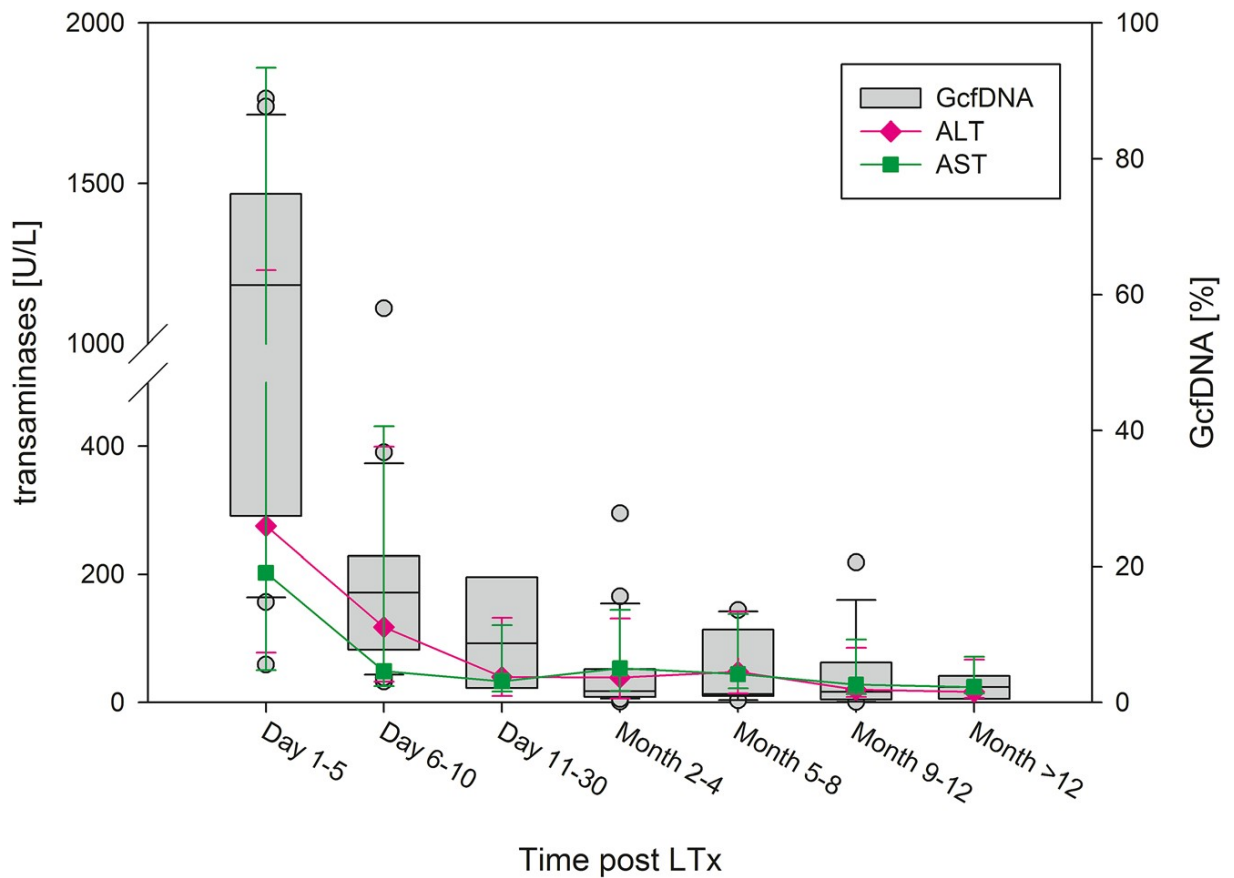


Abbildung 6 - Verlauf des GcfDNA-Anteils und der Transaminasen des Kollektivs
 Aufgetragen sind die Verläufe der GcfDNA (grau), GOT (AST; grün) und GPT (ALT; pink) des Kollektivs für verschiedene Zeiträume nach Tx; Box: 25%-75%-Konfidenzintervall, Median: durchgehender Strich innerhalb der Box (GcfDNA grau, ALT pink, AST grün), Whisker: 5%- und 95%-Konfidenzintervall, Punkte: Ausreißer. Sind keine Whisker eingezeichnet, war die Datenmenge für deren Berechnung zu klein. (Häuser et al. 2023)
 Nach unmittelbar postoperativ noch deutlich erhöhten Werten für GcfDNA und Transaminasen lässt sich ein rascher Abfall in den folgenden Tagen und Monaten erkennen

Tabelle 6 - Absolute cfDNA-Menge und GcfDNA-Anteile im Kollektiv an den einzelnen Abnahmetagen mit oberem und unterem Standardfehler

Patient	Tag nach Tx	cfDNA-Menge [ng/μl]	GcfDNA-Anteil	Standardfehler ↑	Standardfehler ↓
1	24	0,48566648	11,90%	1,50%	1,40%
	153	0,54097007	0,91%	0,32%	0,33%
	307	0,22801177	1,83%	0,90%	1,20%
	384	0,18814174	3,33%	2,00%	2,60%
2	2	0,79776736	84,60%	1,70%	1,60%
	9	0,14484203	18,23%	3,20%	3,20%
	313	0,38020382	2,30%	0,90%	1,20%
3	3	0,33261701	61,40%	2,70%	2,50%
	7	0,0878236	25,70%	3,70%	3,70%
	200	0,16327656	10,70%	3,10%	3,30%
4	1	2,66351328	78,37%	0,90%	0,90%
	8	0,19671594	21,55%	3,10%	3,33%
	91	0,17313689	1,35%	1,10%	1,50%
	158	0,21515047	1,75%	0,70%	0,80%
	369	-	4,05%	1,50%	1,90%
5	3	-	66,35%	1,60%	1,60%
	9	0,16670624	14,65%	1,90%	1,80%
6	0	0,16842108	0,08%		
	2	1,95957146	28,53%	0,80%	0,80%
	8	0,13112331	7,43%	3,20%	3,60%
	115	0,19328626	1,07%	1,00%	1,10%
	123	0,09168199	0,53%	0,80%	0,90%
	172	0,12297782	1,00%	0,90%	0,90%
	270	0,15084397	0,48%	0,45%	0,44%
	368	0,26959664	0,25%	0,30%	0,38%
7	3	0,19965496	16,47%	3,60%	4,10%
	9	0,19879754	21,60%	3,70%	3,80%
	62	0,28374407	14,30%	1,90%	2,20%
	129	0,15856075	12,60%	2,60%	2,60%
8	2	1,77565487	14,77%	0,90%	1,00%
	8	2,19493325	36,80%	1,60%	1,80%
	194	1,54286534	0,29%	0,12%	0,21%
	390	0,3450496	1,20%	0,50%	0,50%
9	2	2,36084402	74,85%	0,80%	0,90%
	8	0,26488083	16,50%	2,20%	2,40%
	66	0,18256851	1,85%	1,20%	1,40%
	115	0,36477026	0,49%	0,35%	0,38%

Patient	Tag nach Tx	cfDNA-Menge [ng/μl]	GcfDNA-Anteil	Standardfehler ↑	Standardfehler ↓
10	2	16,5635776	87,65%	1,90%	1,90%
	8	0,31718345	20,33%	2,40%	2,50%
	32	-	2,00%	1,00%	1,10%
	36	0,14220782	5,67%	2,00%	2,10%
	67	0,18336398	15,63%	3,40%	4,30%
	85	0,11097394	27,80%	3,40%	3,60%
	246	-	9,57%	1,30%	1,40%
317	-	5,53%	1,50%	1,60%	
11	2	5,10544544	70,43%	1,40%	1,30%
	9	0,55297395	16,90%	1,30%	1,40%
	29	0,30775183	3,57%	1,10%	1,20%
	33	0,26145115	3,37%	1,10%	1,30%
	40	0,21000595	4,87%	1,90%	2,00%
	117	0,30818054	5,13%	1,40%	1,60%
	274	0,60141818	1,39%	0,51%	0,59%
12.1	3	18,5446465	63,40%	1,40%	1,40%
12.2	4	9,80796543	24,91%	1,00%	1,20%
	7	1,62774992	8,70%	1,50%	1,80%
	207	0,40764126	4,79%	1,80%	1,90%
	238	0,54954427	20,63%	3,20%	3,10%
13	0	0,25716405	2,50%	1,50%	1,50%
	2	2,4414415	80,52%	1,00%	1,10%
	21	-	0,67%	0,46%	0,54%
	71	-	1,09%	0,60%	0,60%
14	2	0,57741042	36,83%	2,50%	2,60%
	9	0,39692351	8,43%	1,80%	1,70%
	237	0,1435559	1,17%	0,70%	1,10%
	330	0,11911943	2,53%	1,70%	1,90%
15	2	0,40121061	56,50%	3,60%	3,50%
	10	0,56883622	4,30%	1,20%	1,20%
	82	0,21472176	8,37%	2,40%	2,70%
	230	0,09039586	12,90%	4,60%	5,40%
	281	0,1607043	5,73%	2,10%	2,30%
16	2	1,1253018	88,84%	2,80%	1,10%
	9	0,12383524	5,78%	3,50%	3,80%
	124	0,14527074	1,23%	1,00%	1,10%
	257	0,13369557	1,68%	1,30%	1,40%

Patient	Tag nach Tx	cfDNA-Menge [ng/μl]	GcfDNA-Anteil	Standardfehler ↑	Standardfehler ↓
17	3	0,38834931	40,15%	1,60%	1,60%
	100	0,23958694	0,56%	0,55%	0,52%
18	4	1,03649688	39,57%	2,00%	2,20%
	8	1,21018638	57,97%	1,40%	1,40%
	90	0,4693755	0,91%	0,50%	0,60%
19	4	1,4939924	22,05%	1,70%	1,90%
	7	1,83781782	3,63%	0,50%	0,60%
	150	0,32189926	3,05%	0,90%	0,90%
	181	0,32661507	2,85%	0,80%	1,00%
	216	0,25244824	1,65%	0,70%	1,00%
20	4	0,69273341	52,80%	2,10%	2,20%
	10	0,12340653	11,77%	2,80%	3,00%
	77	0,46680324	0,77%	0,44%	0,52%
	248	0,35705348	0,71%	0,39%	0,40%
21	3	-	27,43%	1,50%	1,50%
	9	-	7,90%	1,00%	1,10%
	268	0,73474699	0,57%	0,21%	0,23%
22	6	0,17442302	15,86%	6,00%	7,00%
	9	0,07667714	18,78%	4,00%	4,20%
23	5	-	5,57%	2,50%	3,20%
	8	0,47752099	13,57%	2,20%	2,50%
	191	2,45215925	0,09%	0,06%	0,07%
	262	-	0,11%	0,07%	0,07%
	275	2,910817	0,06%	0,03%	0,05%
24	3	0,48566648	68,60%	2,80%	2,70%
	7	0,14484203	31,40%	5,00%	6,00%
	169	0,12983718	1,53%	1,30%	1,90%
	180	0,10540071	2,27%	1,40%	1,50%
	208	0,31675474	1,24%	1,20%	1,30%
	238	0,64214563	0,55%	0,23%	0,25%
	259	0,74846571	0,28%	0,13%	0,28%
25	3	0,18471206	45,40%	4,80%	5,20%
	8	1,33879938	3,07%	0,60%	0,90%
	110	1,47512916	0,75%	0,24%	0,26%
	171	3,39832222	0,67%	0,22%	0,26%

8.4.1 Betrachtung des Gesamtkollektivs

Die Ergebnisse der Quantifizierungen (s. Tabelle 6) sowie Abbildung 6 zeigen, dass sowohl die Gesamtmenge der zellfreien DNA als auch der GcfDNA-Anteil an dieser Gesamtmenge in allen Fällen des Kollektivs unmittelbar postoperativ deutlich erhöht sind, ebenso die Transaminasen. Während der folgenden Beobachtungszeit sinken die absolute zellfreie DNA-Menge, der Anteil der GcfDNA und die Transaminasen bei den meisten Patienten rasch ab. An der Tabelle lässt sich weiterhin erkennen, dass das Verhalten der Gesamt-cfDNA tendenziell dem der GcfDNA entspricht und umgekehrt. Steigt der GcfDNA-Spiegel von einer Abnahme zur nächsten an, so lässt sich in den meisten Fällen ein entsprechendes Verhalten auch bei der Gesamtmenge der zellfreien DNA erkennen. Ebenso fällt der GcfDNA-Anteil, wenn auch die Gesamt-cfDNA abfällt.

Der Median des GcfDNA-Anteils des Gesamtkollektivs lag in der ersten Quantifizierung nach der Transplantation (Tag 1-5) bei 54,65%, die Range reichte dabei von 5,57% (Patient 23, Tag 5) bis 88,84% (Patientin 16, Tag 2), letzteres war zugleich der höchste aller gemessenen Werte im Beobachtungszeitraum. Für Patientin 12 floss jeweils die erste Abnahme nach der ersten und zweiten Transplantation in die Berechnung ein. Die erste Abnahme bei Patient 13 erfolgte noch vor der Transplantation, daher floss in seinem Fall erst das Ergebnis der zweiten Quantifizierung (Tag 2) mit ein. Für die retrospektiv erfasste Patientin 1 fand die erste Quantifizierung erst an Tag 24 statt, der GcfDNA-Wert war dementsprechend mit 11,9% deutlich niedriger als der Median des Kollektivs. Im Zeitraum zwischen sechs und zehn Tagen nach Transplantation war mediane GcfDNA-Anteil des Kollektivs bereits auf 15,26%, an Tag 11-30 auf 3,57% gesunken. Zwei bis vier Monate (Tag 60-120) nach der Transplantation betrug er 1,22%, nach 5-8 Monaten (Tag 150-240) 1,35% und nach 9-12 Monaten (Tag 270-360) 2,07%. Nach über 12 Monaten (>360 Tage) betrug der mediane GcfDNA-Anteil 3,33%. Der niedrigste Anteil des Kollektivs im gesamten Beobachtungszeitraum wurde mit 0,06% bei Patient 23 an Tag 275 gemessen.

8.4.2 Auffälligkeiten im GcfDNA-Verlauf

In den meisten Fällen erbrachte die erste Quantifizierung nach der Transplantation den höchsten GcfDNA-Anteil des jeweiligen Patienten. Bei den Patienten 7, 8, 18, 22 und 23 zeigte sich jedoch ein über die erste Abnahme hinaus anhaltender Anstieg

der GcfDNA. Auf die möglichen Ursachen hierfür wird in der Ergebnisdiskussion eingegangen.

Bei einigen Patienten, beispielsweise bei Patient 10, dessen Fall im Folgenden noch detaillierter beschrieben wird, zeigte sich im Verlauf der Beobachtung ein teils diskreter, teils deutlicher ausgeprägter Wiederanstieg des GcfDNA-Anteils nach dem initialen Abfall. Mögliche Ursachen hierfür sind physiologische Schwankungen (z.B. Pat. 1, 14, 24) aber auch diverse leberpathologische Ereignisse. Im erfassten Kollektiv kommen unter anderem Thrombosen der lebersorgenden Gefäße, Cholestase oder Infektionen bzw. Re-Infektionen mit leberpathogenen Viren wie CMV oder EBV infrage. Weiterhin wurde in manchen Fällen ein Einpendeln des GcfDNA-Anteils auf einem Niveau oberhalb von 10% (Pat. 3, 7, 15) beobachtet. Eine Ursache hierfür war aus den vorliegenden Akten nicht mit Sicherheit zu identifizieren. Auch war die Differenzierung zwischen einem Wiederanstieg der GcfDNA und einem dauerhaft erhöhten Level aufgrund der teils langen Intervalle zwischen den GcfDNA-Quantifizierungen nicht immer definitiv möglich.

8.5 Qualitätsverifizierung der Gesamt-cfDNA-Quantifizierungen

Wie bereits im Kapitel „Material und Methoden“ erwähnt, wurde die Qualität der Gesamt-cfDNA-Quantifizierung mit der TapeStation2100 (Agilent) überprüft. Ergänzend zu dem bereits im Methodenteil aufgeführten Ergebnis der Qualitätsverifizierung der dritten cfDNA-Bestimmung von Patient 23 (s. Abbildung 4) lassen sich aus dem Vergleich mit der Qualitätsverifizierung der fünften cfDNA-Quantifizierung dieses Patienten weitere Informationen gewinnen. In Abbildung 7 ist das Ergebnis dieser Qualitätsverifizierung abgebildet. Einerseits bestätigt das Ergebnis, dass auch bei dieser Messung nur Moleküle mit einer Länge von 168 Basenpaaren in die Abbildung einfließen. Andererseits wird deutlich, dass mit zunehmend verstrichener Zeit nach der Transplantation nicht nur der prozentuale GcfDNA-Anteil, sondern auch die Menge der Gesamt-cfDNA abnimmt. Diese war in der Untersuchung der dritten Abnahme noch deutlich höher als in der der fünften.

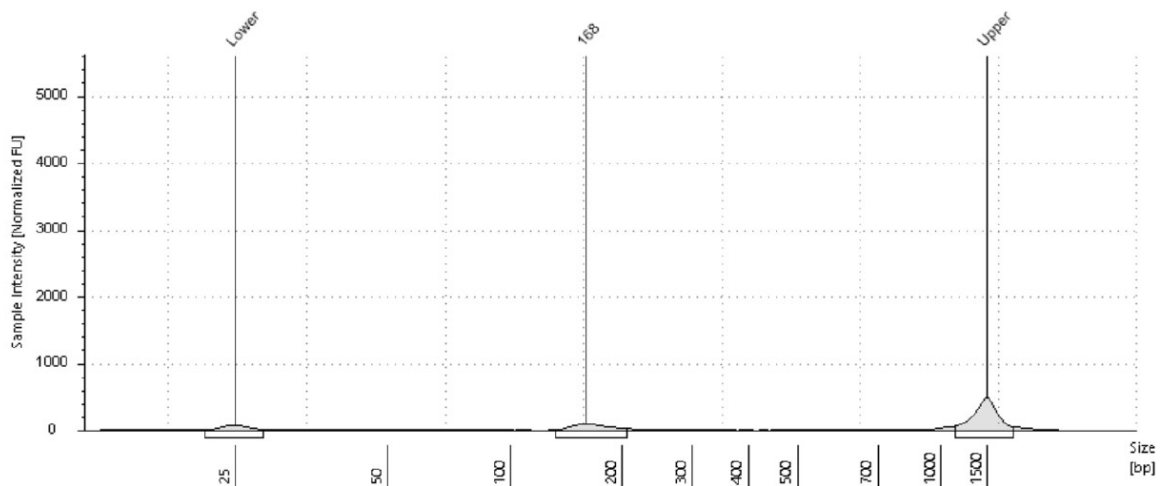


Abbildung 7 - Qualitätskontrolle der fünften cfDNA-Quantifizierung von Patient 23
 Es fällt eine deutlich niedrigere Menge an GcfDNA auf als in der Verifizierung der dritten Abnahme (s. Abbildung 4)

8.6 GcfDNA im Zusammenhang mit Leber-Markern und klinischen Ereignissen

Das Ziel unserer Untersuchung war die Beantwortung zweier Fragestellungen:

Einerseits wollten wir wissen, ob die Dynamik der GcfDNA bezüglich leberpathologischer Ereignisse und Zustände sensitiver und schneller ist, als die der etablierten Leberwerte, und ob die GcfDNA diesen als Monitoring-Parameter gegebenenfalls überlegen ist. Als Vergleichsparameter wählten wir hierfür die GPT als leberspezifischen Marker der Organfunktion und das Gesamt-Bilirubin als Cholestase-Parameter. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse der Korrelationsberechnung der GcfDNA mit diesen beiden Werten zu sehen.

*Tabelle 7 - Korrelation von GcfDNA mit GPT und Gesamt-Bilirubin
Anzahl der miteinander korrelierten Datenpaare und die jeweiligen Korrelationskoeffizienten sowie statistische Signifikanz ($p < 0,05$)*

Patient	Anzahl Datenpaare	Korrelation GcfDNA und GPT		Korrelation GcfDNA und Gesamt-Bilirubin	
		Korrelationskoeffizient r	Statistische Signifikanz	Korrelationskoeffizient r	Statistische Signifikanz
1	4	0,9679	ja	0,9800	ja
2	3	0,9935	nein	-0,2463	nein
3	3	0,5765	nein	0,9747	nein
4	5	0,9445	ja	0,9711	ja
5	2	-	-	-	-
6	7	0,9616	ja	0,1433	nein
7	4	-0,0697	nein	0,2479	nein
8	4	0,9056	nein	0,9979	ja
9	4	0,9886	ja	0,7494	nein
10	8	0,9752	ja	0,8421	ja
11	7	0,9888	ja	0,2428	nein
12	5	0,8020	nein	-0,7043	nein
13	3	1,0000	ja	-0,9998	ja
14	4	0,9367	nein	0,0237	nein
15	5	0,8910	ja	0,8002	nein
16	4	0,9992	ja	0,9825	ja
17	2	-	-	-	-
18	3	0,8283	nein	0,7991	nein
19	5	0,9196	ja	-0,5690	nein
20	4	0,9959	ja	0,9992	ja
21	3	0,9862	nein	0,9969	ja
22	2	-	-	-	-
23	5	0,4439	nein	0,7070	nein
24	7	0,9821	ja	0,9298	ja
25	4	0,9932	ja	0,2286	Nein
Kollektiv:	107	0,7223	ja	0,1074	nein

Andererseits interessierte uns der Zusammenhang bestimmter nicht-quantitativer, leberpathologischer Ereignisse mit dem Verhalten der GcfDNA, um herauszufinden, ob und wie stark ein signifikanter Zusammenhang zwischen beiden Komponenten besteht und anhand dessen ebenfalls die Eignung der GcfDNA als Monitoring-Parameter beurteilen zu können.

8.6.1 GcfDNA-Dynamik versus GPT-Dynamik

8.6.1.1 Korrelation von GcfDNA und GPT

Das Ergebnis für die Berechnung der Korrelation nach Pearson ergab, dass zwischen den beiden Variablen eine lineare Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von $r=0,72$ besteht (s. Abbildung 8). Das 95%-Konfidenzintervall betrug 0,62 bis 0,80. Das Ergebnis ist bei einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ und einem durch t-Test ermittelten p-Wert von $p<0,0001$ statistisch signifikant. In die Berechnung flossen 107 Datenpaare aus GcfDNA- und GPT-Wert ein. Für Patient 23 war an Tag 8 die GcfDNA, jedoch nicht die GPT quantifiziert worden. Um den GcfDNA-Wert dennoch bei der Berechnung der Korrelation berücksichtigen zu können, wurde der nächstgelegene GPT-Wert (Tag 9) zugrunde gelegt.

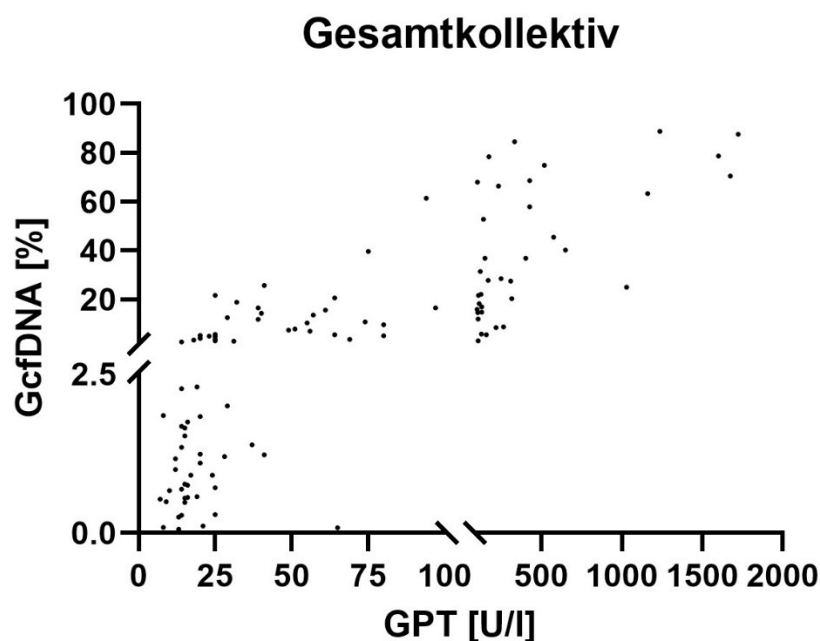


Abbildung 8 - Korrelation GcfDNA und GPT im Kollektiv
GcfDNA (y-Achse) und GPT (x-Achse) im Kollektiv am gleichen oder nächstgelegenen Abnahmetag: es zeigt sich eine statistisch signifikante, lineare Korrelation mit Korrelationskoeffizienten von $r=0,72$ und $p<0,0001$ bei einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$.

Eine statistisch signifikante Korrelation ergab sich bei insgesamt 14 Patienten (56%). In acht Fällen (32%) konnte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden, bei den restlichen drei Patienten (Patient 5, 17, 22) konnte die Korrelation aufgrund von nur zwei vorliegenden GcfDNA-Quantifizierungen nicht berechnet werden. Betrachtet man nur die Fälle, in denen genug Daten zur Berechnung der Korrelation vorlagen,

so lag in 63,64% eine statistische Signifikanz vor, wohingegen in 36,36% keine statistische Signifikanz erreicht wurde.

An den beispielhaften Werten einzelner Patienten wird der lineare Zusammenhang noch deutlicher.

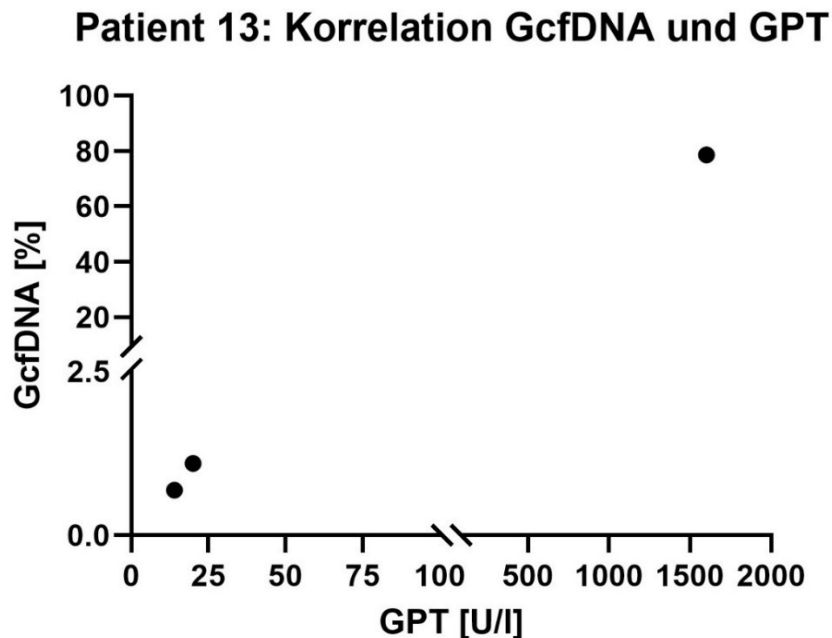


Abbildung 9 - Korrelation für GPT und GcfDNA für Patient 13
GPT (x-Achse) und GcfDNA (y-Achse): statistisch signifikante, lineare Korrelation mit $r=1,0$ und $p\text{-Wert}=0,0008$ bei einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$

Die höchste Korrelation bzw. der höchste p-Wert wurde bei Patient 13 nachgewiesen (s. Abbildung 9). Es ergab sich ein Korrelationskoeffizient von $r=1,0$ bei einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ und einem p-Wert von $p=0,0008$. Für diesen Patienten wurden drei GcfDNA-Quantifizierungen durchgeführt, es konnten also drei Datenpaare miteinander verglichen werden. Bei Betrachtung der anderen Patienten des Kollektivs zeigt sich, dass auch bei einigen Patienten mit mehr Datenpaaren eine deutliche, statistisch signifikante Korrelation erkennbar war.

Bei Patient 11 lagen nach den sieben GcfDNA-Quantifizierungen ebenso viele Datenpaare für die Korrelations-Berechnung vor (s. Abbildung 10). Es ergab sich auch hier eine statistisch signifikante, lineare Korrelation der beiden Parameter mit einem Korrelationskoeffizienten von $r=0,9888$ bei einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ und einem p-Wert von $p<0,0001$.

Patient 11: Korrelation GcfDNA und GPT

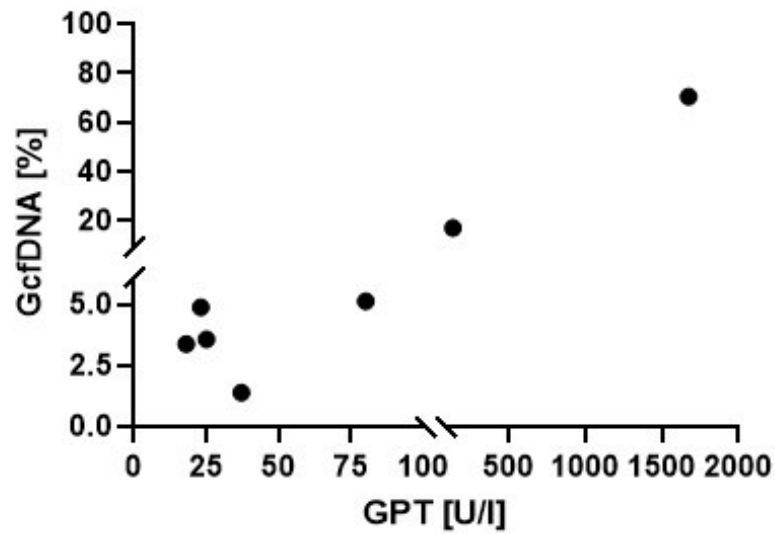


Abbildung 10 - Korrelation von GPT und GcfDNA für Patient 11
 GPT (x-Achse) und GcfDNA (y-Achse) statistisch signifikante, lineare Korrelation mit $r=0,9888$ und p-Wert $<0,0001$ bei einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$

Für Patient 10 waren acht Datenpaare vorhanden (s. Abbildung 11). Es ergab sich auch hier eine statistisch signifikante, lineare Korrelation beider Parameter mit einem Korrelationskoeffizienten von $r=0,9752$ bei oben genanntem Signifikanzniveau und p-Wert.

Patient 10: Korrelation GcfDNA und GPT

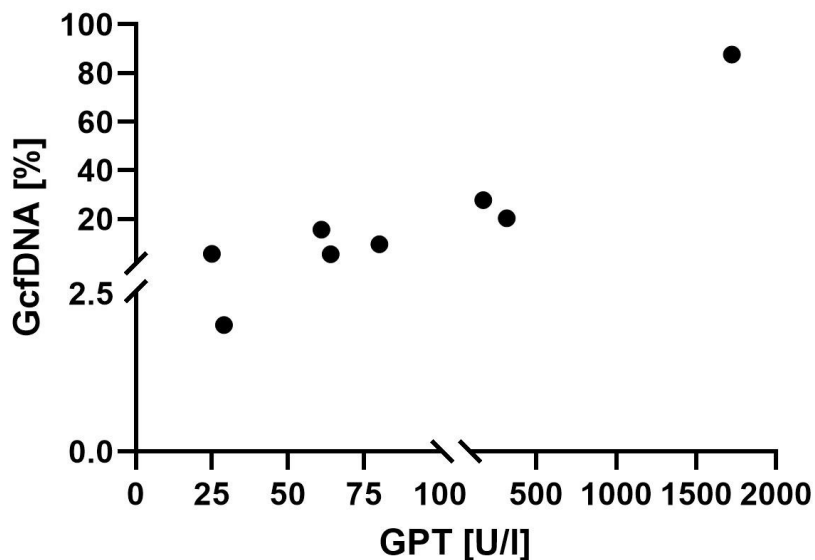
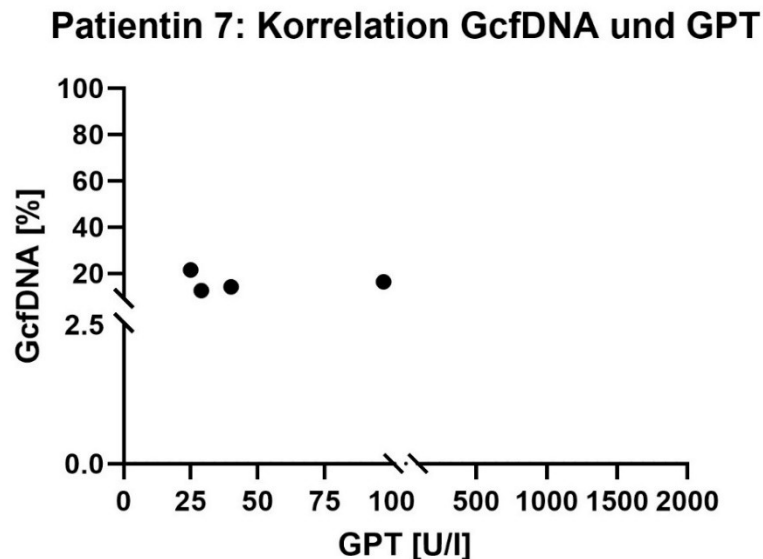


Abbildung 11 - Korrelation von GPT und GcfDNA für Patient 10
 GPT (x-Achse) und GcfDNA (y-Achse) statistisch signifikante, lineare Korrelation mit $r=0,9752$ und p-Wert $<0,0001$ bei einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$

Nur bei Patientin 7 ergab sich ein negativer Korrelationskoeffizient von $r=-0,06972$ (s. Abbildung 12). In ihrem Fall waren vier GcfDNA-GPT-Paare miteinander verglichen worden. Die negative Korrelation war jedoch bei einem p-Wert von 0,9303 und dem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ nicht statistisch signifikant.



*Abbildung 12 - Korrelation von GPT und GcfDNA für Patientin 7
GPT (x-Achse) und GcfDNA (y-Achse): keine statistisch signifikante Korrelation bei $r=-0,06972$ und $p=0,9303$ für das Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$*

Zusammengefasst geht aus der Untersuchung also hervor, dass sowohl für das Gesamtkollektiv als auch die Mehrheit der einzelnen Patienten des Kollektivs ein linearer, statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe der GcfDNA und der Höhe der GPT besteht.

8.6.1.2 Zeitliches Vorausgehen einer GcfDNA-Erhöpfung vor einer GPT-Erhöpfung

Nach Durchführung der statistischen Auswertung ergab sich kein signifikanter Hinweis darauf, dass im erfassten Kollektiv eine relative Änderung der GcfDNA-Menge im Rahmen leberpathologischer Ereignisse einer relativen Änderung der GPT-Menge zeitlich vorausgeht. Nichtsdestotrotz gab es Patienten im Kollektiv, bei denen ein solches Vorausgehen zumindest vermutet werden, jedoch durch die teils langen Intervalle zwischen den GcfDNA-Quantifizierungen nicht sicher bestätigt werden kann. Zu nennen ist hier beispielsweise Patient 10 (s. Patientenbeispiel).

8.6.2 GcfDNA-Dynamik versus Bilirubin-Dynamik

8.6.2.1 Korrelation von GcfDNA mit Gesamt-Bilirubin

Bezüglich der Korrelation des GcfDNA-Anteils und der Bilirubin-Höhe im Kollektiv ergab sich für die Korrelation nach Pearson ein Korrelationskoeffizient von $r=0,1074$ mit einem p-Wert von 0,2709 bei einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ (s. Abbildung 13). Es konnte also bei 107 miteinander verglichenen Datenpaaren keine statistisch signifikante, lineare Korrelation der beiden Parameter miteinander nachgewiesen werden. In einigen Fällen war der Gesamt-Bilirubin-Wert an Tagen, an denen GcfDNA-Quantifizierungen durchgeführt wurden so niedrig, dass er durch das Laborinformationssystem mit „<0,3 mg/dl“ angegeben wurde. Um trotzdem eine Korrelation für diese Tage berechnen zu können, wurde für Berechnung ein Gesamt-Bilirubin-Wert von 0 mg/dl zugrunde gelegt.

Gesamtkollektiv: Korrelation GcfDNA und gBil

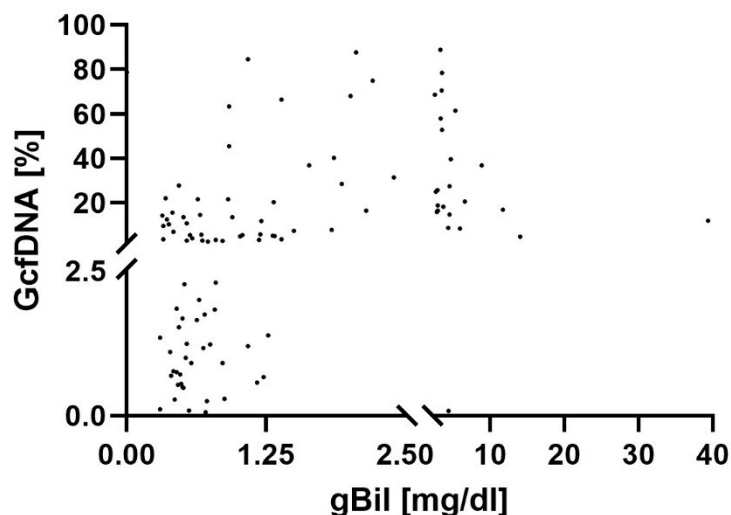


Abbildung 13 - Korrelation GcfDNA und Gesamt-Bilirubin im Kollektiv
GcfDNA (y-Achse) und Gesamt-Bilirubin (x-Achse) im Kollektiv am gleichen oder nächstgelegenen Abnahmetag: es zeigt sich keine statistisch signifikante Korrelation nach Pearson bei einem Korrelationskoeffizienten von $r=0,1074$ und $p=0,2709$ bei einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$.

Betrachtet man die einzelnen Patienten, so ließ sich in neun Fällen, also bei 36% des Gesamtkollektivs, eine signifikante Korrelation nach Pearson feststellen (Pat. 1, 4, 8, 10, 13, 16, 20, 21, 24). Wie auch schon für die Korrelation mit der GPT reichten die zwei vorliegenden Datenpaare der Patienten 5, 17 und 22 auch in diesem Fall nicht für eine Berechnung der Korrelation aus. Für die restlichen 13 Patienten (52%) konnte keine statistisch signifikante Korrelation zwischen Gesamt-Bilirubin und GcfDNA festgestellt werden.

Patient 20: Korrelation GcfDNA und gBil

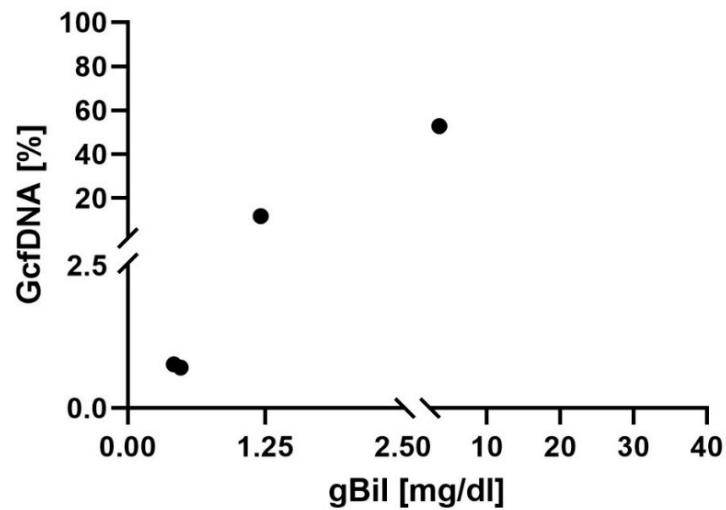


Abbildung 14 - Korrelation von Gesamt-Bilirubin und GcfDNA für Patient 20
Gesamt-Bilirubin (x-Achse) und GcfDNA (y-Achse): statistisch signifikante, lineare Korrelation mit $r=0,9992$ und p -Wert $0,0008$ bei einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$

Von den Patienten, für die eine Korrelation nachgewiesen wurde, hatte Patient 20 mit $r=0,9992$ den höchsten Korrelationskoeffizienten (s. Abbildung 14). Der p -Wert lag für das bereits erwähnte Signifikanzniveau bei $p=0,0008$, verglichen wurden vier Datenpaare.

Den niedrigsten Korrelationskoeffizienten, für den noch eine statistische Signifikanz nachgewiesen werden konnte, wies Patient 10 auf ($r=0,8421$, $p=0,0087$, acht Datenpaare) (s. Abbildung 15).

Patient 10: Korrelation GcfDNA und gBil

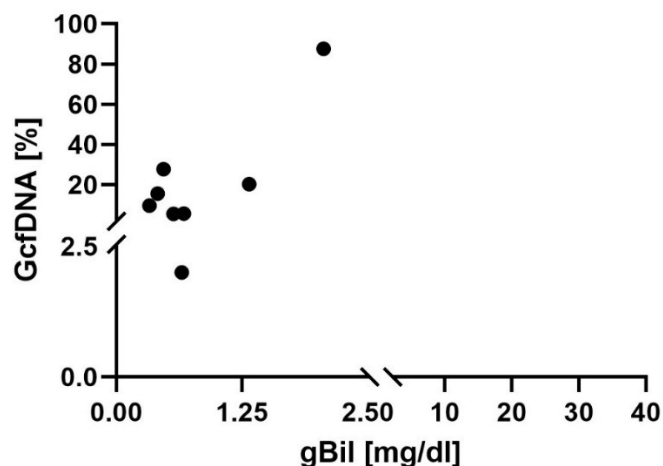


Abbildung 15 - Korrelation von Gesamt-Bilirubin und GcfDNA für Patient 10
Gesamt-Bilirubin (x-Achse) und GcfDNA (y-Achse): statistisch signifikante, lineare Korrelation mit $r=0,8421$ und p -Wert $0,0087$ bei einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$.

Drei Patienten (Pat. 2, 12, 19) wiesen negative Korrelationskoeffizienten auf, der niedrigste lag bei $r=-0,7043$ (Pat. 12).

8.6.2.2 Zeitliches Vorausgehen einer GcfDNA-Erhöhung vor einer Bilirubin-Erhöhung

In Bezug auf den Vergleich der GcfDNA-Dynamik mit der Dynamik des Bilirubins erbrachte die statistische Auswertung keinen signifikanten Hinweis darauf, dass die relative Änderung der GcfDNA-Menge unter leberschädigenden Einflüssen der der Bilirubin-Menge zeitlich vorausgeht. Jedoch muss auch hier berücksichtigt werden, dass Bilirubin in deutlich kürzeren Intervallen bestimmt wurde als die GcfDNA. Ein eventuell dem Bilirubin vorausgehender Anstieg der GcfDNA konnte dadurch gegebenenfalls nicht detektiert werden.

8.6.3 GcfDNA versus leberpathologische, nicht-quantitative Ereignisse

8.6.3.1 Häufigkeit der jeweiligen Komplikationen

Die bereits genannten klinischen Komplikationen, die wir in die statistische Auswertung miteinbezogen, sind in Tabelle 8 mit Angabe ihrer Häufigkeit im Kollektiv und der betroffenen Patienten aufgeführt.

Tabelle 8 - Häufigkeit der Komplikationen im Kollektiv

Ereignis:	Anzahl des Auftretens:	Patient Nr.:
Hepatitis A-Infektion	0	-
Hepatitis B-Infektion	0	-
Hepatitis C-Reinfektion	1	19
Hepatitis D-Infektion	0	-
Hepatitis E-Infektion	1	1
CMV-(Re-)Infektion:	14	4, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 25
EBV-(Re-)Infektion:	8	4, 5, 8, 15, 16, 19, 22, 24
HSV-(Re-)Infektion:	4	3, 6, 8, 9
Anastomosens-Stenose/-Insuffizienz:	8	8, 11, 13, 14, 16, 22, 24, 25
Cholestase/Cholangitis:	9	1, 10, 12, 13, 15, 16, 22, 24, 25
Fieber:	10	7, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 20, 22, 25

Im Beobachtungszeitraum wurde jeweils eine Infektion mit Hepatitis C- und E-Virus beobachtet (Patient 19, Patientin 1). Hepatitis A-, B-, oder D-Infektionen traten nicht auf und konnten daher nicht bezüglich ihres Einflusses auf die GcfDNA-Höhe untersucht werden.

In 14 Fällen kam es zur Infektion mit oder Reaktivierung von Cytomegalie-Virus, es handelte sich hierbei um die häufigste Komplikation. Eine EBV-Infektion bzw. -Reaktivierung trat acht Mal auf, HSV vier Mal. Anastomosen-Insuffizienzen oder -Stenosen wurden bei acht Patienten diagnostiziert. Zu Cholestase oder Cholangitis kam es in neun Fällen, zu Fieberepisoden bei zehn Patienten (zweithäufigste Komplikation).

8.6.3.2 Dynamik der GcfDNA bei Auftreten der jeweiligen Komplikationen

Zur Beurteilung der GcfDNA-Dynamik vor und während der genannten Komplikationen wurde deren Auftreten im Zeitraum von 14 Tagen vor bis 14 Tagen nach den einzelnen GcfDNA-Messungen berücksichtigt. Aus diesem Grund kann es sein, dass nicht jedes Auftreten der einzelnen Komplikationen in die statistische Auswertung einfluss, beispielsweise beim Auftreten von Fieberepisoden im Zeitraum zwischen den ambulanten Kontrollterminen. Auch die Hepatitis C-Reinfektion von Patient 19 floss aus diesem Grund nicht in die statistische Auswertung mit ein. Sie wurde zu einem Zeitpunkt diagnostiziert, zu dem 14 Tage zuvor und danach keine Blutentnahme und keine GcfDNA-Quantifizierung durchgeführt wurde. Über einen Zusammenhang der GcfDNA-Höhe mit einer Hepatitis C-Infektion kann daher im Rahmen dieser Untersuchung keine Aussage getroffen werden.

Es stellte sich heraus, dass in einem univariaten Regressionsmodell, in dem die jeweilige Komplikation den Regressor, also die unabhängige Variable, und der GcfDNA-Anteil den Regressanden, also die abhängige Variable, darstellte, das Auftreten von Fieber einen stark signifikanten Einfluss auf die GcfDNA hatte. Eine Infektion mit bzw. Reaktivierung von HSV-Viren hatte sogar einen sehr stark signifikanten Einfluss. Das Auftreten einer Anastomosen-Insuffizienz oder -stenose hatte einen schwach signifikanten Einfluss. Keinen Einfluss auf die GcfDNA hatten Infektionen mit oder Reaktivierungen von CMV und EBV sowie Cholestase.

Bei Anwendung eines multiplen Regressionsmodell hatten nur noch HSV-Infektionen oder -reaktivierungen einen moderat signifikanten Einfluss auf die Höhe des GcfDNA-Anteils.

Aus diesen Beobachtungen lässt sich ableiten, dass sich die signifikanten Komplikationen in ihrem Effekt, also dem Anstieg der GcfDNA, zumindest teilweise überschneiden.

8.7 Exemplarische Patientenverläufe

Wie bereits im Material- und-Methode-Teil erwähnt, erstreckte sich der Beobachtungszeitraum über maximal 450 Tage nach der Transplantation. Nach Abschluss dieses Zeitraumes waren 24 Patienten über den gesamten Zeitraum beobachtet worden. Patientin 22 verstarb 25 Tage nach der zweiten und 105 Tage nach der ersten Transplantation nach komplikationsreichem Verlauf.

Bei Patient 15 ergab sich an Tag 118 der Verdacht auf eine akute Abstoßungsreaktion, welcher sich in der Histologie bestätigte. Durch eine Umstellung der Immunsuppression konnte die Abstoßung erfolgreich therapiert und eine Re-Transplantation vermieden werden. Bei Patientin 12 trat an Tag 212 nach ihrer Re-Transplantation der Verdacht auf eine chronisch-humorale Abstoßungsreaktion auf (s. Patientenbeispiel). Im restlichen Kollektiv traten im Beobachtungszeitraum keine weiteren akuten oder chronischen Abstoßungsreaktionen auf. Allerdings kam es bei zwei Patientinnen zu schwerwiegenden Komplikationen, die eine Re-Transplantation nach sich zogen: im Falle der bereits erwähnten Patientin 12 trat zwei Tage nach der Operation eine Thrombose der A. hepatica auf (s. Patientenbeispiel), bei Patientin 22 eine Stenose der Vena cava 74 Tage nach der initialen Transplantation, bei beiden Patientinnen kam es zu einem konsekutiven Transplantatversagen.

Im Folgenden werden repräsentativ die Verläufe dreier Patienten detaillierter geschildert mit besonderem Schwerpunkt auf dem klinischen Verlauf, dem Verlauf der Laborparameter und der Dynamik der GcfDNA. Im Einzelnen handelt es sich um einen unkomplizierten Verlauf, einen komplikationsreichen Verlauf mit Wiederanstieg der GcfDNA und eine der beiden re-transplantierten Patientinnen.

8.7.1 Beispiel 1: Unkomplizierter Verlauf (Patient 17)

8.7.1.1 Klinischer Verlauf und Verlauf der Laborparameter

Patient 17 war zum Transplantationszeitpunkt 45 Jahre alt. Die Ursache der Transplantation war in seinem Fall eine Leberzirrhose auf dem Boden einer Primär Sklerosierenden Cholangitis, welche zehn Jahre zuvor diagnostiziert worden war. Zusätzlich war eine Colitis Ulcerosa bekannt. In der Woche vor der Transplantation zeigten sich deutlich erhöhte Parameter für γ -GT (210 U/l) und Transaminasen (GOT 302 U/l, GPT 525 U/l) sowie Gesamt- und direktes Bilirubin (9,53 mg/dl bzw. 7,25 mg/dl). CRP lag im hochnormalen Bereich (max. 4,3 mg/l). Der labMELD-Score des

Patienten lag am OP-Tag bei 22 Punkten, der Patient war jedoch aufgrund seiner Vorerkrankung mit einem ExceptionalMELD bei Eurotransplant registriert.

Die Operation am Transplantationstag verlief bis auf eine intraoperative Zwerchfellverletzung komplikationslos. Postoperativ bestand ein leichter Überhang an Muskelrelaxanzien, von dem der Patient sich jedoch rasch erholte. Auch der sich anschließende stationäre Verlauf gestaltete sich unter Immunsuppression mit Tacrolimus, Methylprednisolon und Mycophenolat-Mofetil ohne Komplikationen.

Tabelle 9 - Patient 17: Labor und GcfDNA der ersten postoperativen Tage

	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 6	Tag 8
GcfDNA-Anteil [%]	-	-	-	40,15	-	-	-
γ -GT [U/l]	173	187	145	152	187	-	153
GOT [U/l]	161	604	520	208	103	61	74
GPT [U/l]	276	672	845	650	443	282	222
Gesamt-Bilirubin [mg/dl]	9,53	3,27	2,43	1,86	1,86	1,55	1,05
Direktes Bilirubin [mg/dl]	7,25	-	-	1,56	-	-	-
CRP [mg/l]	4,3	66	75	26	11	10	8,4

Die initial im Rahmen der Operation deutlich angestiegenen Transaminasen (s. Tabelle 9) sowie die an Tag 1 gestiegene γ -GT waren rasch rückläufig. Einzig ein neuerlicher, leichter Anstieg der γ -GT an Tag 4 sowie der GOT an Tag 8 fielen auf, welche allerdings ohne klinisches Korrelat blieben. Weiterhin trat eine, am ehesten im Rahmen der Operation zu deutende CRP-Erhöhung an Tag 1 und 2 auf. Auch die zunächst noch eingeschränkte Gerinnung (INR max. 2,5, Quick min. 28% an Tag 1) normalisierte sich im postoperativen Setting zügig. Am Tag der Entlassung (Tag 8) lagen noch etwas erhöhte Werte für γ -GT, GOT und GPT vor, das Gesamt-Bilirubin lag zu diesem Zeitpunkt bereits wieder im Normbereich.

Die ambulante Weiterbehandlung des Patienten gestaltete sich unter anamnestischen, klinischen und laborchemischen Gesichtspunkten ohne Komplikationen. Bei der ersten ambulanten Blutentnahme an Tag 100, sowie in den folgenden ambulanten Kontrollen, lagen die Werte der Transaminasen und γ -GT sowie das Gesamt-Bilirubin und CRP durchgehend im Normbereich (s. Abbildung 17). Die Check-Up-Untersuchung ein Jahr nach Transplantation erbrachte unauffällige Ergebnisse, in der pathologischen Untersuchung des Leberpunktats (Tag 387) konnten keine Pathologien nachgewiesen werden.

8.7.1.2 Verlauf der GcfDNA

Patient 17

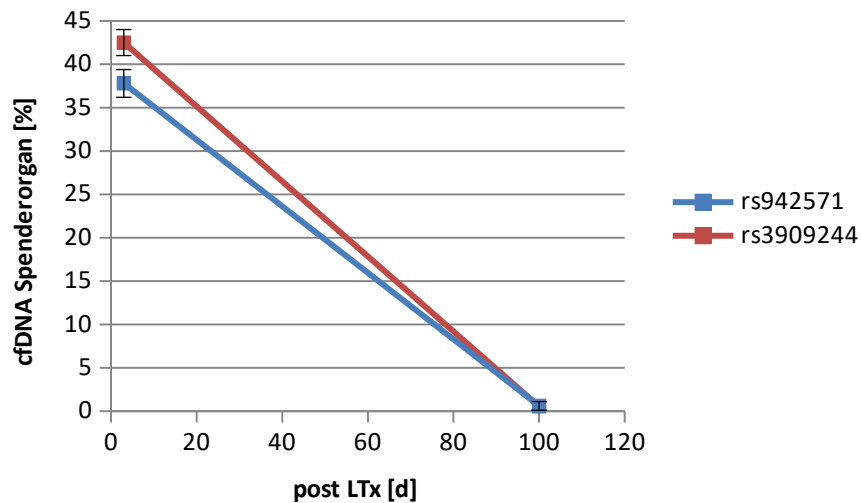


Abbildung 16 - GcfDNA-Verlauf von Patient 17
Abgebildet sind die Verläufe der untersuchten SNPs „rs942571“ (SNP 4) und „rs3909244“ (SNP1) über die Zeit, aus deren Mittelwert sich der GcfDNA-Anteil ergibt. Es zeigt sich an Tag 3 ein deutlich erhöhter GcfDNA-Anteil, welcher bis zur zweiten Quantifizierung an Tag 100 stark abfällt

Patient 17 - Verlauf GcfDNA, GPT, Bilirubin

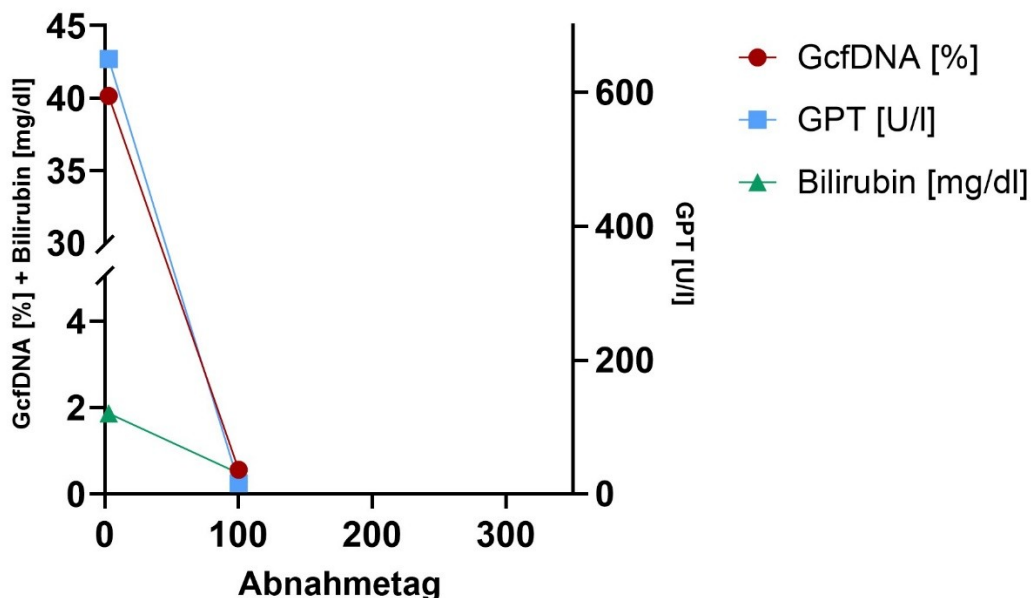


Abbildung 17 - Verlauf GcfDNA, GPT und Bilirubin für Patient 17
Es lässt sich, entsprechend dem Verlauf der GcfDNA, ein Abfall der initial erhöhten Werte für GPT und Bilirubin in den Normbereich erkennen

Die GcfDNA des Patienten wurde zu zwei Zeitpunkten bestimmt (s. Abbildung 16, Abbildung 17). Drei Tage nach der Operation lag der GcfDNA-Wert im Blut des Patienten bei 40,15% und war somit erwartungsgemäß, gleichsam der

Leberparameter, durch die erst kurz zurückliegende Transplantation und den damit verbundenen Reperfusionsschaden deutlich erhöht. In der Folge sank der GcfDNA-Anteil und lag 100 Tage nach der Transplantation nurmehr bei 0,56% (s. Tabelle 10).

Tabelle 10 - Patient 17: GcfDNA-Anteile der einzelnen SNPs an den Quantifizierungstagen

	Tag 3	Tag 100
rs3909244 (SNP 1) [%]	42,50	0,55
rs942571 (SNP 4) [%]	37,80	0,62
GcfDNA [%]	40,15	0,56

Aufgrund des langen Zeitintervalls zwischen erster und zweiter Quantifizierung und mangelnder folgender Bestimmungen kann keine Aussage zur Geschwindigkeit des GcfDNA-Abfalls gemacht werden, ebenso wenig zu einem eventuellen Wiederanstieg in der Zwischenzeit oder nach der zweiten Entnahme. Aufgrund des anamnestisch und klinisch unauffälligen Verlaufs scheint ein solcher Anstieg jedoch unwahrscheinlich. Der Verlauf der GcfDNA passt hingegen vielmehr zu dem komplikationslosen klinischen Verlauf sowie den nach der Operation rasch in den Referenzbereich gesunkenen Laborparametern des Patienten.

8.7.2 Beispiel 2: Komplizierter Verlauf (Patient 10)

8.7.2.1 Klinischer Verlauf und Verlauf der Laborparameter

Im Fall von Patient 10, zum Transplantationszeitpunkt 59 Jahre alt, lag der Transplantation eine 2001 diagnostizierte chronische Hepatitis B zugrunde. Weiterhin waren bei ihm eine 2-Gefäß-KHK sowie ein Diabetes mellitus Typ II bekannt.

Während einer Urlaubsreise hatte der Patient seine Medikamente zuhause vergessen und konnte daher für die Dauer des Urlaubs das Hepatitis-B-Immunglobulin (Hepatect®) nicht einnehmen. Hierdurch kam es zu einer Reaktivierung der chronischen Hepatitis mit konsekutivem, akut-auf-chronischem Leberversagen, in dessen Verlauf sich eine hepatische Enzephalopathie bis hin zum Coma hepaticum entwickelte. Laborchemisch imponierten in den Tagen vor der Transplantation massiv erhöhte Transaminasen, wobei die GOT an Tag 4 vor Tx bei 4637 U/l lag, die GPT bei 3813 U/l. Auch die γ -GT (288 U/l) und das gesamte und direkte Bilirubin (22,84 mg/dl bzw. 14,51 mg/dl) waren stark erhöht, das CRP lediglich moderat (8,7 mg/l) mit sinkender Tendenz bis zum Transplantationstag, eine

Beobachtung, welche möglicherweise auch auf die mangelnde Syntheseleistung der Leber zurückzuführen ist. Weiterhin zeigten sich pathologisch niedrige Gerinnungswerte an Tag 4 vor Tx mit einem Quick-Wert von 14% und einer maximalen INR von 4,7 sowie deutlich erhöhte D-Dimere an Tag 3 vor Tx (12,46 mg/l FEU). Am Transplantationstag selbst lag ein labMELD-Score von 8 Punkten vor, wegen des akuten Leberversagens war der Patient bei Eurotransplant jedoch mit High Urgency-Priorität gemeldet worden und bekam zeitnah ein Spenderorgan zugeteilt.

Während der Transplantation kam es zu einem erhöhten Blutverlust von ca. 4000 ml, dem durch die Gabe von insgesamt 10 Erythrozyten-Konzentraten (EK) und 20 Fresh Frozen Plasma (FFP), 2g Fibrinogen und 1200 IE Prothrombinkomplex-Konzentrat entgegengewirkt wurde. Aufgrund der postoperativ anhaltenden Anämie und Koagulopathie (Hb min. 7,1 g/dl an Tag 12, Thrombozyten min. 73/nl an Tag 2, Quick und INR 67-98% bzw. 1-1,3 an Tag 1-2) erhielt der Patient erneut EKs und FFPs.

Tabelle 11 - Patient 10: Labor und GcfDNA der ersten postoperativen Tage

	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 6	Tag 8
GcfDNA-Anteil [%]	-	-	87,65	-	-	-	20,33
γ -GT [U/l]	136	72	92	132	224	354	529
GOT [U/l]	1130	2138	1149	427	723	93	37
GPT [U/l]	1860	1186	1723	1279	1722	841	317
Gesamt-Bilirubin [mg/dl]	22,12	6,10	2,06	1,77	1,78	1,49	1,32
Direktes Bilirubin [mg/dl]	8,90	-	-	-	-	-	1,08
CRP [mg/l]	3	38	116	78	113	105	86

Infolge der Transplantation kam es zu einem raschen Absinken einiger zuvor erhöhter Laborwerte (s. Tabelle 11): das Gesamt-Bilirubin war am dritten postoperativen Tag bereits unter 2 mg/dl gefallen, auch die GOT lag neun Tage nach der Operation wieder im Referenzbereich. Die Creatin-Kinase fiel nach einem Peak an Tag 2 in den folgenden Tagen ebenfalls rasch in den Normbereich. Die GPT schwankte in den ersten vier Tagen nach der Operation im erhöhten Bereich, sank aber anschließend kontinuierlich und war 21 Tage nach der Transplantation ebenfalls normwertig. Die γ -GT hingegen stieg in den ersten zehn Tagen nach der Transplantation kontinuierlich an, bis zu einem Höchstwert von 676 U/l. CRP zeigte einen fluktuierenden Verlauf mit Höchstwerten zwei, vier und sieben Tage nach der

Operation. Ferritin war am elften postoperativen Tag einmalig bestimmt worden und zu diesem Zeitpunkt mit 642 ng/ml noch deutlich erhöht.

Neben einer hypertensiven Entgleisung und Sinustachykardie kam es in der ersten Woche nach der Transplantation zusätzlich zur respiratorischen Erschöpfung des Patienten sowie zur Ausbildung von Pleuraergüssen, sodass eine intermittierende nicht-invasive Beatmung sowie die Anlage eines Pleurakatheters erfolgten. Weiterhin entwickelte der Patient eine hydrope Dekompensation, welche mit Furosemid therapiert wurde. Der Kreatininwert stieg in diesem Zeitraum bis auf 2,3 mg/dl (eGFR nicht bestimmt) am fünften postoperativen Tag, anschließend sank er wieder in seinen Referenzbereich. Bei Diarrhöen und schwach positiver CMV-PCR an Tag 15 nach Transplantation erfolgte zum Ausschluss einer CMV-Kolitis eine Koloskopie (CRP zu diesem Zeitpunkt 61mg/l mit abnehmender Tendenz). Aufgrund unauffälliger Ergebnisse erfolgte zunächst keine virostatistische Therapie, eine Woche später jedoch nach nun klar positiver PCR bei weiterhin fallendem CRP die Verabreichung von Valganciclovir (Valcyte®). Der Patient wurde an Tag 22 nach Transplantation in die ambulante Weiterbehandlung entlassen.

Die ambulanten Verlaufskontrollen der folgenden zwei Monate gestalteten sich anamnestisch und klinisch unauffällig. In den Blutentnahmen der ambulanten Nachsorge fielen jedoch bereits erhöhte Leberparameter auf. So zeigte sich 67 Tage nach der Transplantation eine γ -GT von 403 U/l und eine diskret erhöhte GPT von 61 U/l. GOT und Bilirubin waren normwertig (s. Tabelle 13). Der GcfDNA-Anteil lag an diesem Tag bei 15,63%, somit zeigte sich auch hier bereits eine Erhöhung der GcfDNA im Vergleich zu den zuvor niedrigeren Werten (s. Tabelle 12). An Tag 89 ergab sich in der ambulanten Kontrolle aufgrund wiederholt erhöhter Laborparameter der Verdacht auf Ischemic Type Biliary Lesions (ITBL), welcher in einer MRCP bestätigt wurde. Zusätzlich zeigte sich hier eine komplexe Hilusstenose. Es erfolgte die stationäre Aufnahme des Patienten an Tag 94, der zu diesem Zeitpunkt über ein Exanthem, Pruritus und ein Stechen im linken Oberbauch klagte sowie über entfärbten Stuhl und dunkel gefärbten Urin. In diesem Zeitraum zeigten sich kontinuierlich steigende Werte für γ -GT und GPT, sowie fluktuierende Werte für GOT (s. Tabelle 13). Auch der GcfDNA-Anteil stieg weiter auf 27,8% (Tag 85). Das Gesamt-Bilirubin hingegen war allzeit im Normbereich (direktes Bilirubin nicht bestimmt). An Tag 99 gelang in der ERCP die endoskopische Dilatation des Ductus hepatocholedochus und der Hilus-Stenose, in der Folge zeigte sich ein rasches

Abfallen sowohl der γ -GT als auch der Transaminasen. Der Patient wurde an Tag 106 aus der stationären Behandlung entlassen, allerdings bereits drei Tage später mit gleichem Beschwerdebild und erneuter ITBL mit Hilusstenose wieder aufgenommen. Zum Zeitpunkt waren die γ -GT (1326 U/l), GOT (141U/l) und GPT (457 U/l) sowie CRP (max. 62 mg/l an Tag 111) wieder deutlich erhöht. Es wurde eine erneute ERCP mit teilweiser Dilatation des Ductus hepatocholedochus an Tag 110 durchgeführt. An Tag 117 erfolgte aufgrund einer Stenose der Arteria hepatica propria die Durchführung einer perkutanen transluminalen Angioplastie (PTA) mit Einlage eines Stents, sowie an Tag 121 die Anlage einer perkutanen transhepatischen Cholangiodrainage (PTCD). Die γ -GT sank infolge dieser Interventionen auf 185 U/l an Tag 127, das Gesamt-Bilirubin von max. 7,19 mg/dl bis auf 3,04 mg/dl, ebenso sanken die Transaminasen innerhalb weniger Tage bis in den Normbereich. Lediglich der CRP-Wert stieg weiter bis max. 166 mg/l an Tag 128, was sich durch am Vortag durchgeführten Drainagenwechsel und das infolge der Intervention entwickelte Fieber sowie den Nachweis diverser Keime in den Drainagen erklärt. Ebenfalls zeigten sich ab Tag 129 erneut steigende Werte für γ -GT und Transaminasen, sowie eine steigende Thrombozytenzahl mit Peak an Tag 136 (γ -GT 1194U/l, GOT 52 U/l, GPT 145 U/l, Thrombozyten 1029/nl). An Tag 132 wurde der Patient in die ambulante Weiterbehandlung entlassen.

In den folgenden Monaten kam es wiederholt zu Cholangitiden, weswegen an Tag 147, 159, 215 und 285 nach Transplantation jeweils erneute stationäre Aufnahmen stattfanden. Es erfolgten jeweils Drainagenwechsel, teilweise konnten im Drainagesekret Keime nachgewiesen werden. Die Cholestase- und Leberparameter zeigten sich während dieser Episoden meist deutlich erhöht, der Peak lag für γ GT (894 U/l), GOT (118 U/l), GPT (177 U/l) und Gesamt-Bilirubin (1,87 mg/dl) an Tag 158, für CRP (83 mg/l) an Tag 283.

Im verbleibenden Beobachtungszeitraum traten bei dauerhaft erhöhten γ -GT-, GOT-, GPT-, und CRP-Werten keine weiteren Cholangitiden mehr auf.

Im 1-Jahres-Check-Up mit Leberpunktion an Tag 339 (γ -GT zu diesem Zeitpunkt 523 U/l, GOT 44 U/l, GPT 62 U/l, CRP 13 mg/l) zeigten sich eine minimale Hepatitis sowie eine beginnend septenbildende Fibrose und eine leichtgradige Steatose. Eine therapeutische Konsequenz ergab sich hieraus nicht.

8.7.2.2 Verlauf der GcfDNA

Patient 10

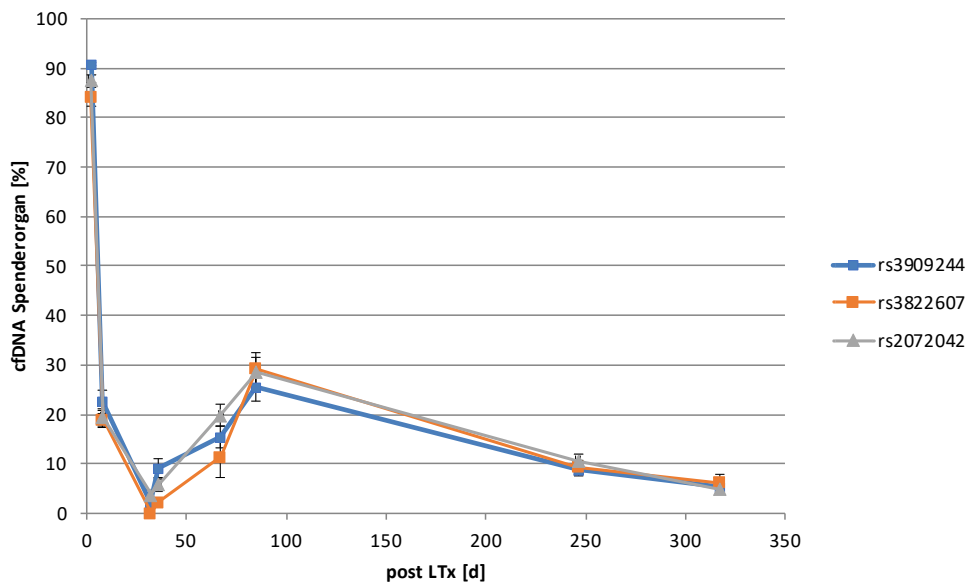


Abbildung 18 - GcfDNA-Verlauf von Patient 10

Abgebildet ist der GcfDNA-Verlauf, der sich aus den Mittelwerten der untersuchten SNPs „rs3909244“ (SNP 1), „rs3822607“ (SNP 28) und „rs2072042“ (SNP 25) für die einzelnen Quantifizierungstage ergibt. SNP 25 und 28 lagen beim Spender in heterozygoter Ausprägung vor und erbrachten daher nur in etwa halb so hohe Ergebnisse wie SNP 1 (s. Tabelle 12). Für die Berechnung des tatsächlichen GcfDNA-Anteils (sowie für die Darstellung in der Grafik) wurden die für sie ermittelten Werte daher verdoppelt. Nach einem initialen Abfall der GcfDNA zeigt sich ein deutlicher Wiederanstieg, anschließend sinkt der GcfDNA-Anteil erneut.

Tabelle 12 - Patient 10: GcfDNA-Anteile der einzelnen SNPs an den Quantifizierungstagen

Die Werte von SNP 25 und 28 sind nur circa halb so hoch wie die Werte von SNP 1, da SNP 25 und 28 im Gegensatz zu SNP 1 bei diesem Patienten heterozygot vorliegen. Für die Darstellung in Abbildung 18 wurden die Ergebnisse der heterozygoten SNPs bereits verdoppelt

	Tag 2	Tag 8	Tag 32	Tag 36	Tag 67	Tag 85	Tag 246	Tag 317
rs3909244 (SNP 1) [%]	90,95	22,60	2,20	9,00	15,50	25,60	8,70	5,40
rs2072042 (SNP 25) [%]	43,90	9,70	1,90	2,90	10,00	14,30	5,30	2,50
rs3822607 (SNP 28) [%]	42,10	9,50	0,00	1,10	5,70	14,60	4,70	3,10
GcfDNA [%]	87,65	20,33	2,00	5,67	15,63	27,80	9,57	5,53

Patient 10 - Verlauf GcfDNA, GPT, Bilirubin

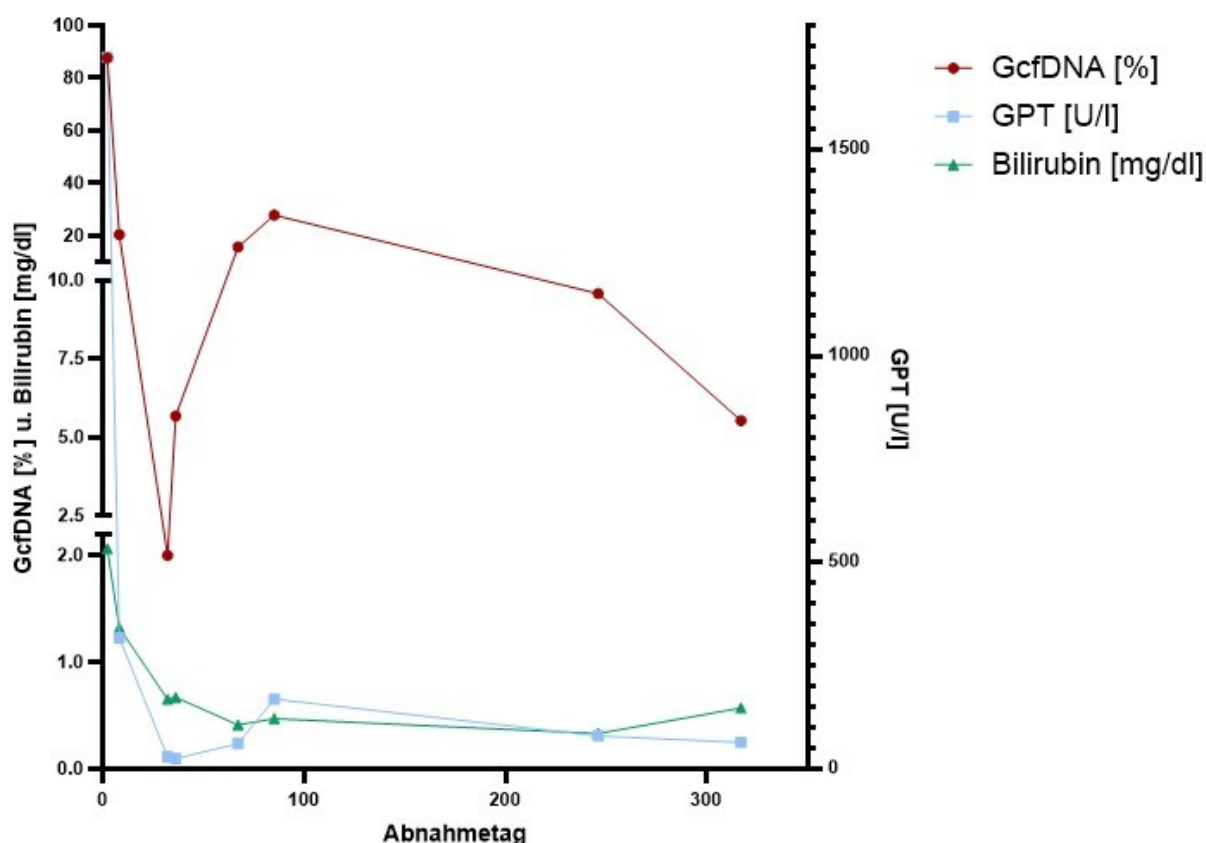


Abbildung 19 - Verlauf GcfDNA, GPT und Gesamt-Bilirubin für Patient 10

Nach initialem Abfall zeigt sich ein deutlicher Wiederanstieg der GcfDNA, mit etwas zeitlichem Versatz auch der GPT. Im Verlauf ist ein erneuter Abfall von GcfDNA und GPT erkennbar. Der Bilirubinverlauf hingegen zeigt keinen Wiederanstieg.

Die GcfDNA wurde für Patient 10 insgesamt acht Mal quantifiziert (s. Tabelle 12). Die erste Bestimmung erfolgte am zweiten Tag nach der Transplantation. Der GcfDNA-Anteil war zu diesem Zeitpunkt mit 87,65% erwartungsgemäß noch deutlich erhöht, was durch den Reperfusionsschaden im Rahmen der Operation zu erklären ist. An Tag 8 nach Transplantation war der Anteil der GcfDNA an der gesamten zellfreien DNA bereits auf 20,33% gesunken und sank auch in der Folge weiter bis auf 2% an Tag 32 (s. Abbildung 18). Bis Tag 36 stieg er dann jedoch wieder leicht auf 5,67%. In diesem Zeitraum lag für den Patienten eine schwach positive CMV-PCR vor.

Allerdings war bereits an Tag 22 eine positive PCR durchgeführt worden, als der GcfDNA-Anteil noch deutlich niedriger lag. Daher ist die Reaktivierung als Ursache für den Anstieg in diesem Fall eher unwahrscheinlich. Es kann sich hierbei alternativ auch um eine physiologische Schwankung handeln. Da die GcfDNA auch in der Folge und insbesondere vor der Diagnose der ITBL und Hilusstenose an Tag 89 weiter anstieg (15,63% an Tag 67 und 27,8% an Tag 85), besteht weiterhin die

Möglichkeit, dass die GcfDNA hier im Rahmen eines leberschädigenden Vorgangs bereits sehr früh anstieg, noch deutlich, bevor man eine entsprechende Tendenz an den etablierten Leberparametern ablesen konnte (s. Abbildung 19). In Tabelle 13 sind die Werte für GcfDNA-Anteil, γ -GT, GOT, GPT, Bilirubin und CRP für den entsprechenden Zeitraum abgebildet. Eine Tabelle aller ausgewerteten Laborparameter im gleichen Zeitraum findet sich im Anhang (s. Tabelle 21, Anhang 3). Neben der GcfDNA war lediglich die γ -GT ebenfalls bereits ab Tag 43 erhöht und stieg auch in der Folge kontinuierlich weiter. Die GOT fluktuierte in einem lediglich diskret erhöhten Rahmen. Die GPT war ab Tag 67 leicht erhöht. Einen deutlichen Anstieg von γ -GT, GOT und GPT konnte man von Tag 85 auf Tag 93 beobachten. Das Gesamt-Bilirubin war während des beschriebenen Zeitraums durchgehend im Normbereich, das CRP lag, abgesehen von einer einmaligen Erhöhung an Tag 36, ebenfalls im hochnormalen Bereich.

*Tabelle 13 - Ausschnitt ausgewählter Laborparameter von Patient 10
Tag 32-93 nach Transplantation*

	Tag 32	Tag 36	Tag 43	Tag 67	Tag 71	Tag 85	Tag 93
GcfDNA-Anteil [%]	2,00	5,67	-	15,63	-	27,80	-
γ -GT [U/l]	203	181	190	403	477	830	1387
GOT [U/l]	25	34	31	32	53	40	293
GPT [U/l]	29	25	35	61	103	169	581
Gesamt-Bilirubin [mg/dl]	0,65	0,67	0,52	0,41	0,34	0,47	0,92
Direktes Bilirubin [mg/dl]	-	-	-	-	-	-	-
CRP [mg/l]	4,20	29,00	4,10	3,90	3,50	2,30	2,80

Was in diesem Zeitraum zusammenfassend auffällt, ist ein Anstieg der GcfDNA ab Tag 36, während ein deutlicher Anstieg der γ -GT erst an Tag 67, ein deutlicher Anstieg der Transaminasen sogar erst an Tag 93 registriert wurde. Auch wenn die Ursache für den Anstieg aller Parameter hier nicht mit Sicherheit benannt werden kann, zeigt sich doch ein den gängigen Laborparametern zeitlich deutlich vorausgehender GcfDNA-Anstieg.

Die nächste GcfDNA-Quantifizierung erfolgte erst nach einem längeren Intervall an Tag 246, bis zu diesem Zeitpunkt war der Anteil zwar auf 9,57% gesunken, nichts destotrotz war dies verglichen mit dem Gesamtkollektiv immer noch ein recht hoher Wert für diesen Zeitraum. Der Durchschnittswert des Kollektivs lag 5-8 Monate nach Transplantation wie bereits erwähnt bei 1,35%. Der Grund für den bei Patient 10 weiterhin erhöhten Wert kann in den wiederholt stattgehabten fieberhaften

Cholangitiden und Drainagewechseln in den Wochen zuvor begründet liegen. Die Werte für γ -GT (609 U/l), GOT (45 U/l), GPT (80 U/l) und CRP (11 mg/l) waren an diesem Tag und im darum liegenden Zeitraum ebenfalls erhöht. Auch an Tag 317 war der GcfDNA-Anteil mit 5,53% im Vergleich zu den anderen Patienten des Kollektivs verhältnismäßig hoch. Auch hier war im Zeitraum von vier bis fünf Wochen vor der Bestimmung erneut eine fieberhafte Cholangitis aufgetreten und ein Drainagewechsel erfolgt. Ebenfalls waren an diesem Tag die Werte für γ -GT (550 U/l), GOT (43 U/l) und GPT (64 U/l) sowie CRP (25 mg/l) erhöht.

8.7.3 Beispiel 3: Patientin mit Re-Transplantation (Patientin 12)

8.7.3.1 Klinischer Verlauf und Verlauf der Laborparameter

Ursächlich für die Lebertransplantation bei Patientin 12 war eine komplikationsreiche adulte polyzystische Degeneration der Leber (APDL). Im Verlauf dieser Krankheit waren bereits multiple Segmentresektionen, Zystenentdachungen, Adhäsio lysen und eine ERCP durchgeführt worden. Weiterhin war es zu einer Gallenfistel, einer Peritonitis und zur Infektion einer Leberzyste gekommen. Zusätzlich lagen bei der Patientin unter anderem ein arterieller Hypertonus und ein Nikotinabusus mit 40 Pack Years vor, im EKG waren Zeichen eines abgelaufenen Infarkts erkennbar, dessen Zeitpunkt jedoch nicht bekannt war.

Zum Zeitpunkt der Lebertransplantation war die Patientin 58 Jahre alt, ihr labMeld-Score am Transplantationstag betrug 7, aufgrund ihrer Vorerkrankung war sie zu diesem Zeitpunkt jedoch bereits seit 14 Monaten mit einem ExceptionalMELD gelistet.

Intraoperativ kam es zu einer Zwerchfellverletzung, weswegen eine Thoraxsaugdrainage angelegt wurde. Abgesehen hiervon verlief die Operation komplikationslos, auch der unmittelbar postoperative Zeitraum gestaltete sich klinisch ohne Auffälligkeiten. Am Tag der Transplantation zeigten sich im Labor nur moderat erhöhte Werte für γ -GT und CRP und Normwerte für Transaminasen sowie Bilirubin (s. Tabelle 14). Am Folgetag zeigten die Werte dieser Parameter einen deutlichen Anstieg. Am zweiten postoperativen Tag fiel im Vergleich zum Vortag ein massiver Transaminasenanstieg auf, in der Sonographie ließ sich die Leberarterie intrahepatisch nicht darstellen. In der daraufhin durchgeführten CT wurde eine langstreckige Thrombose der Arteria hepatica communis festgestellt, in deren Folge es zum Transplantatversagen kam. Die Patientin wurde daher umgehend mit High-

Urgency-Status zur Re-Transplantation gelistet. Im Labor der Patientin zeigten sich an diesem Tag weiterhin Peaks für γ -GT und GLDH (6743,6 U/l), die CK war mit 1018 U/l ebenfalls deutlich erhöht, ebenso das CRP, welches auch in den folgenden Tagen weiter anstieg. Das Gesamt-Bilirubin war an Tag 2 noch normwertig, stieg jedoch in den folgenden Tagen ebenfalls an (s. Tabelle 14). Direktes Bilirubin war nur an Tag 3 nach der Transplantation abgenommen worden und zu diesem Zeitpunkt diskret erhöht. Der Hb-Wert war vom Vortag auf Tag 2 um über 2 Punkte gefallen (13,3 g/dl auf 11,1 g/dl). PCT lag am ersten postoperativen Tag bei 7,4 ng/ml, sank im Verlauf auf bis zu 2,1 ng/ml, um dann unmittelbar vor der Re-Transplantation wieder bis auf 4,8 ng/ml anzusteigen. Diese teils massiv erhöhten Werte waren einerseits noch auf die vorangegangene Transplantation zurückzuführen, andererseits bereits durch die Thrombose der Arteria hepatica bedingt.

Tabelle 14 - Patientin 12: Labor und GcfDNA der ersten postoperativen Tage (Tx1)

	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 6	Tag 8 (LTx2)
GcfDNA-Anteil [%]	-	-	-	36,40	-	-	-
γ -GT [U/l]	92	198	273	238	246	285	171
GOT [U/l]	34	983	7896	2464	1190	3171	1345
GPT [U/l]	20	311	1983	1162	844	1865	1215
Gesamt-Bilirubin [mg/dl]	0,56	1,55	0,97	0,92	1,30	3,75	4,29
Direktes Bilirubin [mg/dl]	-	-	-	0,82	-	-	3,66
CRP [mg/l]	13	22	71	85	125	141	69

In den auf die erste Transplantation folgenden Tagen zeigte sich zusätzlich eine zunehmende respiratorische Insuffizienz und Vigilanzminderung, sodass sechs Tage nach der Operation eine endotracheale Intubation und invasive Beatmung notwendig wurde.

Acht Tage nach der ersten Transplantation und sechs Tage nach der Diagnose der Thrombose der Arteria hepatica stand erneut ein geeignetes Spenderorgan für die Patientin zur Verfügung. Die Re-Transplantation konnte komplikationslos durchgeführt werden, es zeigte sich während der Operation jedoch der Befund einer ausgeprägten Pankreatitis mit Pankreasnekrosen. Am Tag der Re-Transplantation zeigten sich erwartungsgemäß weiterhin deutlich erhöhte Werte der γ -GT und GLDH (839,6 U/l) sowie der GOT und GPT und des CRP (s. Tabelle 15). Gesamt-Bilirubin lag zu diesem Zeitpunkt bei 4,29 mg/dl, direktes Bilirubin war ebenfalls deutlich

erhöht. Auch die Thrombozyten zeigten erniedrigte Werte (64/nl), der Quick-Wert betrug 69%, INR 1,3, die D-Dimere lagen bei 22,02 mg/l FEU.

Tabelle 15 - Patientin 12: Labor und GcfDNA der ersten postoperativen Tage (Tx2)

	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 6	Tag 8
GcfDNA-Anteil [%]	-	-	-	24,91	-	-	8,70 (Tag 7)
γ-GT [U/l]	171	205	309	412	423	366	158
GOT [U/l]	1345	2970	977	283	111	49	27
GPT [U/l]	1215	2291	1628	1031	646	265	84
Gesamt-Bilirubin [mg/dl]	4,29	3,74	2,94	2,71	3,32	4,38	7,38
Direktes Bilirubin [mg/dl]	3,66	-	-	2,58	-	-	-
CRP [mg/l]	69	109	150	120	145	164	215

Im unmittelbaren Zeitraum nach der Operation trat zunächst ein postoperatives Delir auf, welches sich im Verlauf besserte. Weiterhin kam es zu einer Pankreasleakage über die einliegenden Drainagen. Bei steigenden Infektionsmarkern wurde in der durchgeführten CT ein ausgeprägter peripankreatischer Verhalt diagnostiziert und mittels CT-gesteuert eingebrachter Drainagen abgeleitet (Tag 20). Bei zusätzlicher respiratorischer Verschlechterung wurde die Patientin am gleichen Tag erneut für circa 24 Stunden intubiert. Weiterhin zeigten sich in der CT rechtsseitige Lebernekrosen, welche allerdings keine akute therapeutische Konsequenz nach sich zogen. Die γ-GT lag an Tag 20 bei 352 U/l, Gesamt-Bilirubin bei 6,17 mg/dl, GLDH bei 16,5 U/l, GOT bei 45 U/l, GPT bei 47 U/l, CRP bei 190 mg/l und PCT bei 0,7 ng/ml.

45 Tage nach der ersten beziehungsweise 37 Tage nach der zweiten Transplantation konnte die Patientin in die ambulante Weiterbehandlung entlassen werden. Gesamtes und direktes Bilirubin waren zu diesem Zeitpunkt noch deutlich erhöht (4,76 mg/dl bzw. 3,57 mg/dl), Gesamt-Bilirubin zeigte außerdem eine steigende Tendenz. Die γ-GT lag bei 411 U/l, und die GOT bei 62 U/l. GPT lag im Normbereich (30 U/l). In den folgenden Tagen zeigte sich auch bei der γ-GT, GOT und GPT ein Anstieg. Das CRP lag am Entlassungstag mit 142 mg/l ebenfalls noch deutlich oberhalb des Referenzbereichs.

An Tag 87 erfolgte die stationäre Wiederaufnahme bei unklarer Transaminasen- und Cholestaseparameter-Erhöhung. Klinisch und anamnestisch bestanden zu diesem Zeitpunkt Leistungsminderung und Abgeschlagenheit, Belastungsdyspnoe, Ikterus, abdominelle Schmerzen, Diarrhöe, Übelkeit und Appetitminderung. Die γ-GT lag am

Aufnahmetag bei 496 U/l, GOT bei 177 U/l und GPT bei 111 U/l. Gesamt-Bilirubin war mit 5,25 mg/dl deutlich erhöht, ebenso CRP (87 mg/l). Direktes Bilirubin war im unmittelbar umliegenden Zeitraum nicht bestimmt worden. Quick und INR bewegten sich im Bereich von 49% bzw. 1,6 (Tag 93) bis 63% bzw. 1,3 (Tag 87). Der pathologische Befund der durchgeführten Leberblindpunktion erbrachte eine ascendierende Cholangitis als wahrscheinlichste Ursache für die auffälligen Laborparameter. Therapeutisch erfolgte die zweimalige Durchführung einer ERCP 90 beziehungsweise 102 Tage nach der Re-Transplantation und eine Stent-Einlage am zweiten Termin. An Tag 103 wurde die Patienten erneut in ihr häusliches Umfeld entlassen, die Werte für γ -GT, GOT und GPT waren infolge der Therapiemaßnahmen wieder leicht gesunken.

Sechs Wochen (Tag 146) später erfolgte die erneute stationäre Aufnahme bei Pruritus, krampfartigen, postprandialen abdominalen Schmerzen sowie häufigen Diarrhöen und Nachtschweiß. Die zwischenzeitlich leicht abgesunkenen, jedoch weiterhin erhöhten Leberparameter waren in den Tagen zuvor wieder deutlich angestiegen: γ -GT bei 646 U/l, GLDH 10,6 U/l, GOT 212 U/l, GPT 176 U/l. Gesamt-Bilirubin lag bei 7,15 mg/dl, direktes Bilirubin bei 5,44 mg/dl. CRP betrug 26 mg/l, Ferritin 1887 ng/ml. Es wurde der Verdacht auf ein funktionelles Abflusshindernis bei Kinking des DHC gestellt. An Tag 160 nach Re-Transplantation erfolgte deshalb erneut eine ERCP, dieses Mal mit Einlage eines Metall-Stents, um den Abfluss zu gewährleisten. Zusätzlich wurde eine arterioportale Fistel im rechten Leberlappen festgestellt, diese wurde therapeutisch embolisiert. Die Laborparameter bewegten sich zwar weiterhin im erhöhten Bereich, zeigten jedoch, abgesehen von Gesamt-Bilirubin und γ -GT, eine sinkende Tendenz. Die Entlassung aus dem stationären Aufenthalt erfolgte an Tag 174.

An Tag 188 wurde die Patientin mit gleichem Beschwerdebild erneut stationär aufgenommen. Laborchemisch wurden erneut erhöhte Cholestase-Parameter festgestellt (γ -GT 544 U/l, Gesamt-Bilirubin 11,48 mg/dl, direktes Bilirubin nicht bestimmt) sowie eine GOT von 96 U/l, eine GPT von 50 U/l und CRP von 23 mg/l. Bei Verdacht auf Stent-Dysfunktion erfolgte noch am Aufnahmetag in der ERCP der Austausch des einliegenden Metall-Stents gegen die Einlage von zwei Plastik-Stents. Drei Tage darauf konnte die Patientin entlassen werden. Infolge des Stent-Wechsels sanken die erhöhten Parameter ab, mit Ausnahme des Gesamt-Bilirubins, welches

weiter anstieg, bis es an Tag 206 einen Peak von 14,05 mg/dl bei einem direkten Bilirubin von 10,59 mg/dl erreichte.

Ab Tag 212 befand sich die Patientin aufgrund des Verdachts auf chronisch humorale Abstoßung bei Nachweis donorspezifischer Antikörper in stationärer Behandlung. Therapeutisch erfolgten wiederholte Immunadsorptionen, zum Transplantatversagen kam es nicht. Die bei Aufnahme erhöhten Lebermarker (γ -GT 317 U/l, GOT 111 U/l, GPT 53 U/l, Gesamt-Bilirubin 10,95 mg/dl) sanken infolge der Therapie, abgesehen vom weiterhin undulierenden Bilirubin.

Nach zwei zwischenzeitlichen elektiven Stent-Wechseln erfolgte an Tag 338 im stationären Setting die Anlage einer PTCD und eine Woche später der Wechsel auf eine alternative Drainage. Zusätzlich erfolgte die Stent-Entfernung aus dem DHC. Die zum Aufnahmezeitpunkt noch erhöhten Cholestaseparameter und Transaminasen (γ -GT 331 U/l, Gesamt-Bilirubin 5,55 mg/dl, direktes Bilirubin nicht bestimmt, GOT 63 U/l, GPT 26 U/l, CRP 19 mg/l) sanken in der Folge bis Tag 345, dann zeigte sich wieder eine steigende Tendenz. Lediglich das CRP zeigte insgesamt einen durchweg ansteigenden Verlauf.

Die letzte stationäre Aufnahme des Beobachtungszeitraums fand 438 Tage nach Re-Transplantation zum Zwecke eines PTCD-Wechsels bei Drainagendysfunktion und steigenden Cholestaseparametern statt. Die γ -GT lag zu diesem Zeitpunkt bei 492 U/l, Gesamt-Bilirubin bei 8,47 mg/dl, direktes Bilirubin war nicht bestimmt worden. GOT und GPT waren mit 86 U/l sowie 67 U/l leicht erhöht, CRP betrug 30 mg/l. Zwei Tage später zeigte sich bei allen genannten Parametern bereits eine fallende Tendenz (γ -GT 403 U/l, Gesamt-Bilirubin 6,42 mg/dl, GOT 84 U/l, GPT 56 U/l, CRP 18 mg/l).

Zur Durchführung der 1-Jahres-Check-Up-Untersuchung lagen in den Akten der Patientin keine Dokumente vor.

8.7.3.2 Verlauf GcfDNA

Patient 12

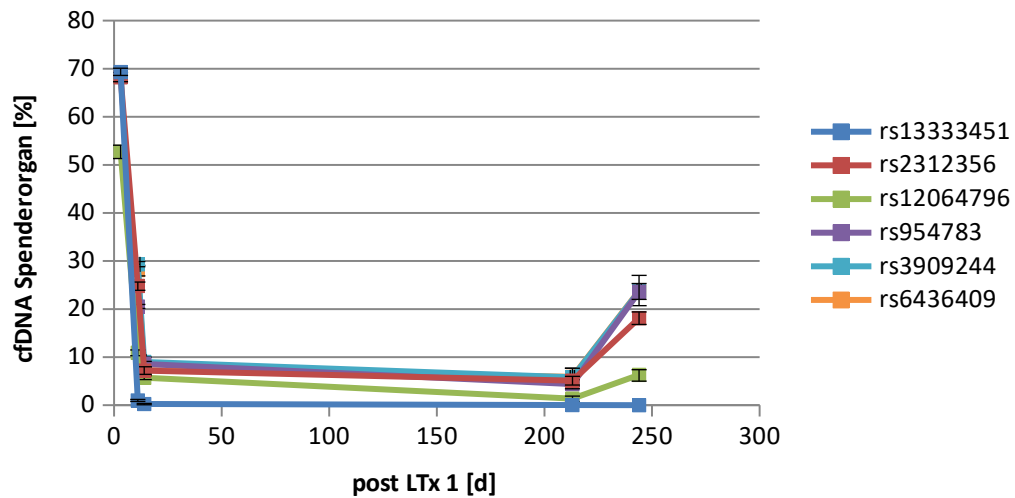


Abbildung 20 - GcfDNA-Verlauf von Patientin 12

Abnahmen an Tag 3 nach LTx1 und Tag 4, 7, 207, 238 nach LTx2. Es lassen sich deutlich die verschieden hohen Anteile der einzelnen SNPs erkennen, abhängig von deren Ausprägung (s. Kapitel 8.3.3). Weiterhin lässt sich ein rascher Abfall der initial deutlich erhöhten Werte sowie ein Anstieg der Werte in der letzten Abnahme erkennen.

Tabelle 16 - Patientin 12: GcfDNA-Anteile der einzelnen SNPs an den Quantifizierungstagen

Auch hier sind die unterschiedlich hohen GcfDNA-Anteile der einzelnen SNPs, je nach deren Ausprägung, erkennbar.

	Tag 3 (LTx1)	Tag 4 (LTx2)	Tag 7 (LTx2)	Tag 207 (LTx2)	Tag 238 (LTx2)
rs13333451 (SNP 10) [%]	69,30	0,98	0,24	0,04	0,00
rs2312356 (SNP 2) [%]	68,20	24,80	7,20	5,10	18,10
rs12064796 (SNP19) [%]	52,70	10,90	5,72	1,37	6,30
rs954783 (SNP 17) [%]	-	20,53	8,60	4,40	23,60
rs3909244 (SNP 1) [%]	-	29,30	9,00	5,80	23,70
rs6436409 (SNP 7) [%]	-	28,10	7,30	5,90	23,80
GcfDNA [%]	63,40	24,91	8,70	4,79	20,63

Patientin 12 - Verlauf GcfDNA, GPT, Bilirubin

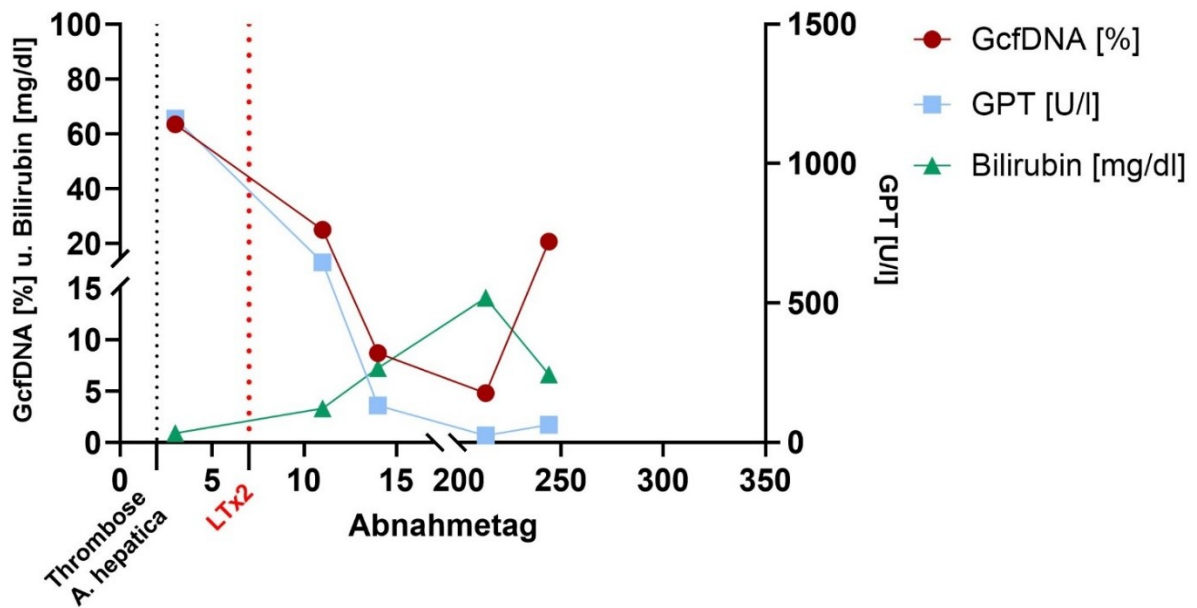


Abbildung 21 - Verlauf von GcfDNA, GPT und Gesamt-Bilirubin für Patientin 12
 Entsprechend dem Verlauf der GcfDNA fällt auch die GPT nach initial hohen Werten ab und zeigt in der letzten Abnahme einen erneuten Anstieg. Bilirubin hingegen zeigt einen kontinuierlichen Anstieg, gefolgt von einem Abfall an Tag 238

Die erste und einzige GcfDNA-Quantifizierung nach der ersten Transplantation erfolgte am dritten Tag nach der Operation. Der Anteil der GcfDNA an der gesamten zellfreien DNA betrug 63,4% (s. Abbildung 20, Abbildung 21). Der hohe Anteil war zu diesem Zeitpunkt einerseits noch durch den Reperfusionsschaden im Rahmen der Transplantation zu erklären. Andererseits bestand jedoch spätestens seit Tag 2 nach Transplantation die Thrombose der Arteria hepatica communis. Es ist also davon auszugehen, dass der hohe GcfDNA-Anteil auch bereits durch den Ischämieschaden am Transplantat und dadurch freigesetzte DNA aus abgestorbenen Leberzellen zu erklären ist. Da die Laborparameter, insbesondere die Marker für Leberzellschaden und Cholestase, im Rahmen der vorangegangenen Transplantation ebenfalls deutlich erhöht waren, und für den Zeitraum des Transplantationstags und der ersten drei postoperativen Tage nur eine GcfDNA-Quantifizierung vorliegt, lässt sich hier keine Aussage zu einem Vorangehen eines GcfDNA-Anstieges vor einem Ansteigen der Transaminasen machen.

Die nächste Abnahme und Quantifizierung der GcfDNA erfolgte vier Tage nach der Re-Transplantation. Hier ergab sich ein Wert von 24,91% (s. Tabelle 16). Es zeigt sich, dass zu diesem Zeitpunkt, obwohl nur einen Tag später abgenommen als die Quantifizierung nach LTx 1, bereits ein deutlich niedrigerer Anteil der GcfDNA an der

gesamten zellfreien DNA besteht als im Falle der ersten Transplantation. Dies unterstreicht die Annahme, dass der hohe GcfDNA-Anteil nach Transplantation 1 nicht allein durch den Reperfusionsschaden, sondern zumindest teilweise bereits durch die Thrombose der Arteria hepatica zustande kam.

Drei Tage später (Tag 7 nach Re-Transplantation) war der GcfDNA-Anteil bereits auf 8,7% abgesunken. Die nächste Quantifizierung erfolgte nach einem längeren Zeitintervall, 207 Tage nach der Re-Transplantation und ergab einen GcfDNA-Anteil von 4,79%. Verglichen hiermit lag im Gesamt-Kollektiv im Zeitraum von 5-8 Monaten nach der Transplantation ein medianer GcfDNA-Anteil von 1,35% vor. Auch bei Betrachtung einzelner Patienten fällt auf, dass in Abwesenheit von Komplikationen meist niedrigere Werte vorherrschen (vgl. Pat. 20: 0,71% an Tag 248; Pat. 23: 0,09% an Tag 191). Aufgrund der großen Lücke zur vorangegangenen Quantifizierung ist es in diesem Fall nicht möglich festzustellen, ob das Absinken nach der vorangegangenen Quantifizierung mit langsamerer Geschwindigkeit fortschritt oder ob der GcfDNA-Spiegel bereits niedrigere Werte erreicht hatte und an Tag 207 bereits wieder angestiegen war, bspw. im Rahmen der folgenden chronisch-humoralen Abstoßungsreaktion. Denkbar wäre auch, dass sich der GcfDNA-Anteil auf einem etwas erhöhten Plateau eingependelt hatte. Gegebenenfalls hätte man hier auch ein Beispiel für einen Anstieg der GcfDNA gesehen, der dem Transaminasen-Anstieg an Tag 213 und 215 zeitlich vorausging. Auch dies kann jedoch aufgrund der großen zeitlichen Intervalle der GcfDNA-Abnahmen und laborchemischen Kontrollen nicht mit Sicherheit festgestellt werden.

*Tabelle 17 - Ausschnitt Patientin 12 190-215 Tage nach Tx
Vorliegende Werte für γ -GT, GOT, GPT, gesamtes und direktes Bilirubin, CRP*

	Tag 190	Tag 191	Tag 206	Tag 207	Tag 213	Tag 215
GcfDNA-Anteil [%]	-	-	-	4,79	-	-
γ -GT [U/l]	462	-	319	-	317	269
GOT [U/l]	100	100	76	-	111	121
GPT [U/l]	54	49	25	-	53	
Gesamt-Bilirubin [mg/dl]	10,40	11,20	14,05	-	10,95	15,23
Direktes Bilirubin [mg/dl]	-	-	10,59	-	-	-
CRP [mg/l]	45	42	15	-	12	18

Mit Blick auf die Laborparameter der Patientin, die um Tag 207 herum bestimmt worden waren, zeigten sich deutlich erhöhte Werte für gesamtes und direktes

Bilirubin sowie moderate γ -GT-, GOT- und CRP-Erhöhungen. Im unmittelbaren zeitlichen Umfeld wurden nur an Tag 206 weitere Laborwerte bestimmt. 2 Wochen zuvor (Tag 190/191) waren sowohl γ -GT als auch Transaminasen und CRP noch deutlich stärker erhöht als zum Zeitpunkt der GcfDNA-Quantifizierung (s. Tabelle 17). Auch in den Tagen danach stiegen diese Werte wieder an. Ein Grund für die deutlich niedrigeren Werte an Tag 206 wurde aus den Akten nicht ersichtlich.

Bei der nächsten Quantifizierung an Tag 238 wird deutlich, dass ein Wieder-Anstieg der GcfDNA stattgefunden hatte, denn es ergab sich hier ein GcfDNA-Anteil von 20,63%. Als wahrscheinlichste Ursache hierfür kommt der erwähnte Verdacht auf eine chronisch-humorale Abstoßungsreaktion infrage.

9 Diskussion

In dieser Arbeit sollte einerseits das Verhalten der GcfDNA nach Lebertransplantation untersucht und ihre Eignung für das Monitoring der Organintegrität beurteilt werden. Unter diesem Aspekt stellte sich auch die Frage, ob es möglich ist, bei beeinträchtigter Leberfunktion anhand der GcfDNA zwischen Infektionen und anderen Ursachen zu differenzieren. Andererseits sollte die grundsätzliche Eignung der ddPCR-Assays zur GcfDNA-Quantifizierung untersucht werden.

9.1 SNPs und GcfDNA-Quantifizierungen

Initial erfolgte ein Screening von 30 SNPs mit hoher MAF bezüglich ihrer hetero- bzw. homologen Ausprägung. Schütz et al. screenen in ihrer Studie 40 SNPs, Beck et al. untersuchten 41 SNPs (32, 41). Bei jedem Patienten unseres Kollektivs wurde die GcfDNA anhand von zwei bis sechs heterolog homozygot bzw. heterozygot vorliegenden SNPs quantifiziert. In der Literatur wird von vier bis fünf verwendeten SNP-Assays berichtet (32, 58). Die Anzahl der in unserer Untersuchung verwendeten Assays stimmte daher in etwa mit der in der Literatur beschriebenen Anzahl überein und erbrachte valide Ergebnisse. Für Patienten, für die kein biologisches Material des Spenders vorlag, erfolgte die Genotypisierung durch die im Material-und-Methode- und Ergebnisteil beschriebene Methode der Rückrechnung. Da bei der Mehrzahl der Patienten Spendermaterial vorlag, wurde zu Evaluierungszwecken die Rückrechnung aus den Ergebnissen der Plasmauntersuchung zunächst für diese Patienten durchgeführt und das Ergebnis im Anschluss mit dem Ergebnis der direkten Genotypisierung des Spendermaterials verglichen. Der direkte Vergleich beider Genotypisierungsstrategien innerhalb eines Patienten erlaubte die Übertragung und Anwendung bei den Patienten, für die kein Spendergewebe vorlag.

Die Vorteile dieser von uns und weiteren Autoren ähnlich verwendeten Vorgehensweise liegen in der Möglichkeit, informative SNPs aus nur einer Probe zu gewinnen und der Tatsache, dass dieses Verfahren nicht auf eine Gewebe- oder Blutprobe des Spenders zur Genotypisierung seiner DNA angewiesen ist. Weiterhin kann die Methode auf beliebige Empfänger-Spender-Kombinationen angewandt werden (26, 29, 81).

Aus den Ergebnissen der GcfDNA-Quantifizierungen wurde deutlich, dass die Untersuchung eines einzelnen SNPs pro Patient für eine verlässliche Quantifizierung ausreichend gewesen wäre (68). Dies zeigte sich in den nur gering voneinander abweichenden prozentualen Anteilen der einzelnen SNPs pro Quantifizierung. Deren mediane Abweichung betrug 1,75%. Die maximale Abweichung der prozentualen SNP-Anteile in einer einzelnen Quantifizierung betrug 16,6% (Patientin 12, Quantifizierung an Tag 1). Der Vergleich der Quantifizierungs-Ergebnisse der SNPs bestätigt das jeweilige Ergebnis. Zusätzlich wurde durch die Verwendung mehrerer SNPs pro Patient einer potenziellen Verzerrung des Ergebnisses vorgebeugt, falls ein einzelner SNP einen deutlich vom tatsächlichen GcfDNA-Anteil abweichenden Wert erbracht hätte. Durch die Untersuchung von zwei oder mehr SNPs pro Patient konnten also die Ergebnisse der einzelnen Quantifizierungen verifiziert und gleichzeitig die Aussagekraft der Untersuchungsergebnisse gesteigert werden. Auch bei niedrigen GcfDNA-Anteilen konnten mithilfe der verwendeten Methode und dem entwickelten Assay valide Messungen durchgeführt und exakte Ergebnisse bestimmt werden. Deutlich wird dies beispielsweise in der ersten GcfDNA-Quantifizierung von Patient 13: diese erfolgte noch vor der aktuellen Transplantation und ergab einen GcfDNA-Anteil von 2,5%. Hierbei handelte es sich um GcfDNA, die aus der ersten Spenderleber, welche der Patient bereits 1998 erhalten hatte, freigesetzt wurde. Diese Messung war selbstverständlich für die eigentliche Untersuchung nicht verwertbar und floss dementsprechend nicht in die Berechnung des GcfDNA-Durchschnitts des Gesamtkollektivs ein. In mehreren Quantifizierungen unkomplizierter Patienten ergaben sich GcfDNA-Anteile von unter 1%. Auch diese wurden zuverlässig quantifiziert. An diesen Beispielen wird die Sensitivität und Eignung des für die Untersuchung entwickelten Assays sowie der Nachweismethode mittels ddPCR, insbesondere im Bereich niedriger GcfDNA-Mengen, noch einmal deutlich. Auch der Variationskoeffizient stützt diese Beobachtung. Er lag in der Untersuchung insgesamt bei 2,46%. Insbesondere im Bereich niedriger GcfDNA-Anteile (<0,1%) ist er mit 0,01-0,02% noch einmal deutlich niedriger (68). Die Nachweisgrenze des GcfDNA-Anteils lag in unserer Untersuchung bei 0,02%, entsprechend 0,08 Kopien/ μ l, mit einer Standardabweichung von 0,16 Kopien/ μ l (68). Die Bestimmungsgrenze belief sich auf 0,13 % GcfDNA-Anteil oder 0,54-2,3 Kopien/ μ l bei einer Standardabweichung von 0,61 Kopien/ μ l (68). Ähnliche Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden auch von Beck und Oellerich et al. beschrieben (42, 63).

9.1.1 Dynamik der GcfDNA

Wie bereits im Ergebnisteil beschrieben, konnte festgestellt werden, dass GcfDNA sowie gesamte zellfreie DNA in allen Fällen des Kollektivs unmittelbar postoperativ deutlich erhöht waren. Diese Beobachtung ist auf den während und nach der Transplantation auftretenden Reperfusionsschaden des Transplantats sowie auf im Rahmen der Operation aus den mechanisch zerstörten Zellen von Transplantat und Empfänger freigesetzte zellfreie DNA zurückzuführen und deckt sich mit den Beobachtungen anderer Autoren (28, 32, 41). In der ersten Quantifizierung nach der Transplantation (Tag 1-5) ergab sich für das von uns erfasste Kollektiv ein medianer GcfDNA-Anteil von 54,65%, der niedrigste gemessene Wert lag dabei bei 5,57% und der höchste bei 88,84%. Die in unserem Kollektiv erfassten Werte lagen damit kurz nach der Operation erwartungsgemäß deutlich über den 10%, die in der Literatur als physiologisch für die stabile Phase nach Transplantation in Abwesenheit von Komplikationen beschrieben sind (26, 32). Entsprechend beobachteten beispielsweise auch Beck et al. und Schütz et al. in ihren Untersuchungen am Transplantations-Tag bzw. ersten postoperativen Tag GcfDNA-Anteile von circa 90% bzw. 50% (32, 41). Die variable Höhe des GcfDNA-Anteils sowie der Gesamtmenge an cfDNA (max. 18,54 ng/µl, min. 0,17 ng/µl) unserer Patienten unmittelbar nach Transplantation kann einerseits durch die zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführte erste Quantifizierung erklärt werden, andererseits durch die individuell unterschiedliche Zeitspanne zwischen Explantation aus dem Spender und Transplantation in den Empfänger. Weitere mögliche Gründe sind die hohe Heterogenität des Kollektivs in Bezug auf beispielsweise das Alter, Geschlecht, die Transplantationsursachen und Vorerkrankungen der Patienten.

Tabelle 18 - Verlauf des medianen GcfDNA-Anteils des Kollektivs

	Tag 1-5	Tag 6-10	Tag 11-30	2-4 Monate (Tag 60-120)	5-8 Monate (Tag 150-240)	9-12 Monate (Tag 270-360)	>12 Monate (>360 Tage)
GcfDNA-Anteil	54,65%	15,26%	3,57%	1,22%	1,35%	2,07%	3,33%
Entwicklung zum vorangegangenen Zeitraum		-72,08%	-76,61%	-65,83%	+10,65%	+53,33%	+60,87%
Entwicklung zum ersten Zeitraum		-72,08%	-93,47%	-97,77%	-97,53%	-96,21%	-93,91%

Im Anschluss an die initial erhöhten Werte ließ sich im Kollektiv ein rascher Abfall der GcfDNA beobachten (s. Tabelle 18). In den Bestimmungen im Zeitraum von sechs bis zehn Tagen nach Transplantation hatte sich der mediane GcfDNA-Anteil des Kollektivs im Vergleich zur ersten Bestimmung nach Transplantation mit 15,26% bereits um 72,08% verringert. In der Literatur werden für den Zeitraum von 7-10 Tagen nach Tx für unkomplizierte Patienten GcfDNA-Anteile von unter 10-15% beschrieben (32). Die leichte Abweichung unserer Beobachtung von diesen Werten ist am ehesten auf das in anderen Untersuchungen größere Kollektiv sowie die in engeren Intervallen durchgeführten Quantifizierungen zurückzuführen (32, 41). 11-30 Tage nach Tx betrug der GcfDNA-Anteil 3,57% und sank bis 2-4 Monate nach Tx bis auf 1,22%. Somit lag der nach ca. 4 Monaten 97,77% niedriger als in der ersten Quantifizierung. Ca. 5-8 Monate nach Transplantation betrug der Anteil 1,35%. Übereinstimmend berichten Beck et al. von GcfDNA-Anteilen unterhalb von 6,8% in ihrem Kollektiv für den Zeitraum von circa 6 Monaten nach Transplantation (41). Schütz et al. gaben einen medianen GcfDNA-Anteil von 3,3% für die Gruppe der stabilen Patienten an, wobei HCV-positive Patienten oder solche mit Cholangitis oder Cholestase etwas höhere, jedoch trotzdem unter 10% liegende GcfDNA-Anteile aufwiesen (32). In den folgenden Zeiträumen zeigte sich weiterhin ein diskreter Anstieg bis auf 3,33% für den Zeitraum von über 12 Monaten nach Transplantation. Damit stieg der GcfDNA-Anteil, verglichen mit dem Zeitraum von 9-12 Monaten (2,07%) nach Tx zwar wieder 60,87% an, lag jedoch weiterhin 93,91% niedriger als in der ersten Abnahme.

Betrachtet man (entsprechend den in der Literatur beschriebenen Werten) 10% als oberen Grenzwert des GcfDNA-Referenzbereichs, ergibt sich in Bezug auf das beobachtete Kollektiv Folgendes: Innerhalb der ersten zehn Tage nach der Transplantation wurde bereits bei acht Patienten (Pat. 6, 12/2, 14, 15, 16, 19, 21, 25), entsprechend 32% des Kollektivs, ein GcfDNA-Anteil im Referenzbereich nachgewiesen. Ab dem Zeitraum von Tag 11-30 bis zum Ende des Beobachtungszeitraums lag der Median des GcfDNA-Anteils im Kollektiv in allen Zeiträumen mit maximal 3,33% allzeit unter 10%.

In der Beurteilung des GcfDNA-Verlaufs unseres Kollektivs sollten die teils langen Quantifizierungsintervalle berücksichtigt werden. Über den Verlauf der GcfDNA zwischen den Quantifizierungen kann keine Aussage gemacht werden, daher ist es möglich, dass ein auf den ersten Blick sinkender GcfDNA-Anteil zwischen zwei

Abnahmen einen nicht erfassten Wiederanstieg aufwies. Ebenso kann es sein, dass ein zwischen den Abnahmen in den Referenzbereich abgesunkener und anschließend wieder gestiegener GcfDNA-Anteil nicht erfasst wurde und in der Auswertung der Daten eher als verzögerter Abfall imponiert. Ursachen für ein alternativ tatsächlich verlangsamtes Absinken der GcfDNA können beispielsweise Komplikationen im Sinne von Infektionen (schwach positive EBV-PCR bei Patient 4, schwach positive HSV-PCR bei Patient 9), gastrointestinalen Komplikationen (Dünndarmperforation mit Peritonitis bei Patient 8) sowie der bisher ungeklärte Einfluss von Blutprodukten auf die Höhe der GcfDNA (u.a. FFP-Gabe bei Patient 2 und 3, FFP- und EK-Gabe bei Pat. 7) sein (26).

Zusammengefasst ließ sich beobachten, dass der GcfDNA-Spiegel der einzelnen Patienten nach dem unmittelbar postoperativen Anstieg in der Regel rasch abfiel, in 84% der Fälle (21 Patienten) langfristig auf unter 10%, und sich in unkomplizierten Fällen dauerhaft unter diesem Niveau bewegte. Auch der Median des Gesamtkollektivs spiegelte den raschen Abfall des GcfDNA-Anteils nach Transplantation wider. In der letzten Quantifizierung lag er, obwohl im Vergleich zu den vorangegangenen Bestimmungen wieder leicht angestiegen, weiterhin unter 10%. Um einen Referenzwert für unkomplizierte Verläufe außerhalb der unmittelbar postoperativen Phase in unserem Kollektiv zu berechnen, definierten wir diese Phase als die ersten 30 Tage nach Transplantation. Als Kriterium komplizierter Verläufe legten wir das Vorliegen einer histologisch bestätigten Abstoßungsreaktion fest. Als Referenzwert im Sinne des 95. Perzentils aller in die Berechnung eingeflossenen Werte ergab sich für unser Kollektiv ein GcfDNA-Anteil von $\leq 14,77\%$. In der Literatur wird von mehreren Autoren ein GcfDNA-Anteil von 10% für die stabile Phase nach Transplantation als Grenzwert für einen unkomplizierten Verlauf gewertet (29, 32, 41). Nach Auswertung der eigenen Daten kann gefolgert werden, dass der Referenzwert unseres Kollektivs etwas höher liegt als die beschriebenen Werte. Dies kann einerseits durch unterschiedliche Definitionen unkomplizierter Verläufe bedingt sein. Andererseits traten im erfassten Kollektiv bei mehreren Patienten GcfDNA-Anstiege auf $>10\%$ im Rahmen von Komplikationen auf (z.B. Patient 10 mit wiederholter ITBL), wodurch sich das 95. Perzentil erhöhte.

Bei einigen Patienten fiel auf, dass die gesamte zellfreie DNA trotz steigender GcfDNA im selben Zeitraum sank. Eine solche Situation lag beispielsweise bei Patient 10 vor, bei dem der GcfDNA-Anteil zwischen Tag 67 und 85 von 15,63% auf

27,8% anstieg. Im selben Zeitraum fiel die gesamte cfDNA von 0,18 ng/µl auf 0,11 ng/µl. Trotz steigender Transaminassen und γ-GT-Werte gestaltete sich der klinische Verlauf zu diesem Zeitpunkt unauffällig. An Tag 94 erfolgte die stationäre Aufnahme des Patienten bei Ischemic Type Biliary Lesions (ITBL), welche die wahrscheinlichste Erklärung für den zuvor registrierten GcfDNA-Anstieg sind. Der Grund für die gegensätzlichen Verläufe von GcfDNA und cfDNA liegt vermutlich in Ungenauigkeiten der cfDNA-Quantifizierungen aufgrund der sehr geringen Gesamtmenge begründet. Bei Patient 15 zeigten sich über einen langstreckigen Zeitraum ähnliche Verläufe: die GcfDNA stieg von Tag 10 bis 82 von 4,3% auf 8,37% und weiter bis 12,90% an Tag 230. Währenddessen sank die cfDNA von 0,57 ng/µl auf zunächst 0,21 ng/µl und schließlich auf 0,09 ng/µl. Im Zeitraum von Tag 10-82 nach Transplantation lag bei dem Patienten eine Infektion mit bzw. Reaktivierung von sowohl CMV als auch EBV vor. Im folgenden Zeitraum bis Tag 230 trat an Tag 118 die bereits erwähnte akute Abstoßungsreaktion auf, zusätzlich eine erneute CMV-Reaktivierung, welche mit Valganciclovir therapiert wurde und eine chronische Gastritis und Pankreatitis. Während sich der GcfDNA-Anstieg durch diese Ereignisse erklären lässt, kann nicht mit Sicherheit abgeleitet werden, warum es nicht zu einem entsprechenden cfDNA-Anstieg kam.

9.1.2 Auffälligkeiten im Verlauf der GcfDNA

Bei manchen Patienten war der GcfDNA-Anteil in der zweiten Messung im Vergleich zur ersten Quantifizierung weiter angestiegen. Dem können unterschiedliche Ursachen zugrunde liegen. Grundsätzlich ist zu beachten, dass aufgrund der Intervalle von mehreren Tagen zwischen den einzelnen Quantifizierungen nicht sicher festgestellt werden konnte, ob sich der GcfDNA-Anteil zum ersten Quantifizierungszeitpunkt auf seinem Höhepunkt befand, oder ob er sich noch im Anstieg oder bereits im Abfall befand. Eine mögliche Ursache des anhaltend steigenden Anteils besteht darin, dass in der ersten Abnahme der transplantationsbedingte Peak von cfDNA und GcfDNA noch nicht erreicht war. Da die Quantifizierungen frühestens am ersten postoperativen Tag erfolgten, erscheint dies jedoch eher unwahrscheinlich. Alternativ kommt ein im quantifizierungsfreien Intervall nicht erfasster Abfall, gefolgt von einem erneuten Anstieg, beispielsweise aufgrund von Komplikationen nach der Operation, infrage.

Als Ursache für eine entsprechende Beobachtung bei Patientin 8 (14,77% an Tag 2, 36,8% an Tag 8) kommen eine aufgrund von Kreislaufinstabilität und Hb-Abfall

durchgeführte Re-Laparotomie mit Hämatom-Ausräumung an Tag 2, sowie Tachyarrhythmien, steigende Infekt-Werte und eine akute Niereninsuffizienz, welche ab Tag 9 vorübergehend mit kontinuierlicher Nierenersatztherapie behandelt wurde, in Betracht. Ob es sich hierbei um einen kontinuierlich anhaltenden oder aber nach zwischenzeitlich gesunkenen Werten neu aufgetretenen Anstieg handelt, geht aus den vorliegenden Daten nicht hervor. In der an Tag 194 folgenden Quantifizierung war die GcfDNA auf 0,29% gesunken.

In der ersten Quantifizierung von Patient 23 an Tag 5 wurde mit 5,57% ein verglichen mit dem Kollektiv überdurchschnittlich niedriger erster Wert quantifiziert. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die verhältnismäßig späte erste Bestimmung an Tag 5, die die Möglichkeit birgt, dass sich die GcfDNA bereits wieder im Abfall befand und der initiale Peak nach der Transplantation nicht abgebildet wurde. Alternativ, wenn auch unwahrscheinlicher, ist es möglich, dass die GcfDNA nach der Transplantation nur verzögert anstieg und ihren Peak noch nicht erreicht hatte. Hierfür könnte auch der an Tag 8 weiter angestiegene Wert hinweisend sein. Dieser könnte jedoch auch im Rahmen einer neu aufgetretenen Transplantatschädigung zustande gekommen sein. Im Zeitraum der beiden Quantifizierungen lässt sich ein deutlicher CRP-Anstieg von 14 mg/l auf 58 mg/l beobachten, die Transaminasen sowie die γ -GT sinken jedoch, während das Gesamt-Bilirubin stagniert. Klinische Auffälligkeiten wurden für den betreffenden Zeitraum nicht beschrieben. An Tag 46 ergab sich der Befund einer schwach positiven PCR auf Cytomegalie-Virus, die Transaminasen waren zu diesem Zeitpunkt normwertig, γ -GT mit 157 U/l und CRP mit 88 mg/l erhöht. Ob ein Zusammenhang zwischen dem GcfDNA-Anstieg an Tag 8 und dem CMV-Nachweis an Tag 46 besteht, lässt sich aufgrund des großen zeitlichen Abstands zwischen den Bestimmungen der GcfDNA und der CMV-PCR nicht feststellen.

Bei einigen Patienten bewegte sich der prozentuale GcfDNA-Anteil auch nach länger zurückliegender Transplantation weiterhin auf einem Niveau oberhalb von 10%, wofür verschiedene Ursachen infrage kommen.

Patient 7

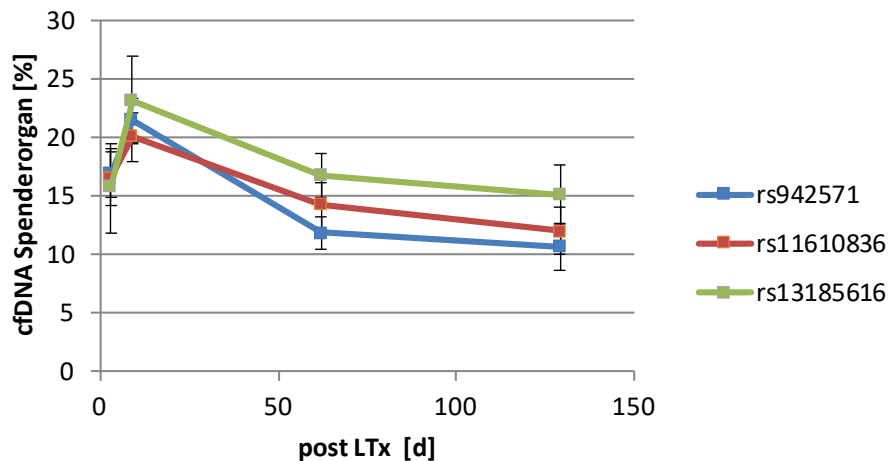


Abbildung 22 - GcfDNA-Verlauf von Patientin 7
 Abgebildet sind die untersuchten SNPs „rs942571“ (SNP 4), rs13185616 (SNP 24) und „rs11610836“ (SNP29) aus deren Mittelwert sich der GcfDNA-Anteil ergibt. Es zeigt sich ein initial ansteigender GcfDNA-Anteil, welcher sich nach einem Peak und anschließendem Abfall auf einem Niveau oberhalb 10% einpendelt

Bei Patientin 7 (s. Abbildung 22) kam es in den ersten sieben Tagen nach der Transplantation zu mehreren Ereignissen, die als Ursache für den zunächst anhaltenden Anstieg der GcfDNA infrage kommen (21,6% an Tag 9 gegenüber 16,47% an Tag 3). Es traten generalisierte Krampfanfälle auf sowie der Verdacht auf eine Anastomosen-Blutung bei Hb-relevanter oberer GI-Blutung ohne Quelle in der Gastroskopie. Anschließend gestaltete sich der weitere klinische Verlauf unkompliziert. In der nächsten GcfDNA-Quantifizierung an Tag 62 ergab sich, bei unauffälliger Klinik, ein mit 14,3% erhöhter Anteil. Am gleichen Tag lagen Normwerte für gesamtes Bilirubin, γ -GT, GPT sowie CRP und eine nur diskrete GOT-Erhöhung (40 U/l) vor. Klinische Auffälligkeiten im Sinne von Fieber unklarer Genese traten erst an Tag 85 auf, in der Diagnostik fand sich eine positive Cytomegalie-PCR mit geringer Viruslast, eine antivirale Therapie wurde nicht durchgeführt. Eine GcfDNA-Quantifizierung fand zu diesem Zeitpunkt nicht statt. Bilirubin und die Transaminasen lagen an diesem und den folgenden Tagen im Normbereich, die γ -GT war leicht erhöht (max. 77 U/l), ebenso das CRP (23 mg/l), welches zunächst weiter anstieg (74 mg/l an Tag 87), um dann rasch in den Normbereich zu sinken. Wenngleich die Leberparameter in dieser Episode normwertig oder nur dezent erhöht waren, könnte es sich um eine Situation handeln, in der die GcfDNA sehr früh, nämlich bereits an Tag 62, einen Transplantatschaden im Rahmen eines leberpathologischen Ereignisses, in diesem Fall einer CMV-Infektion bzw. -reaktivierung, anzeigt. Der weitere Verlauf der Patientin gestaltete sich komplikationslos, an Tag 129 lag der

GcfDNA-Anteil jedoch weiterhin bei 12,6%, ohne dass sich eine Ursache aus den Daten ableiten ließ.

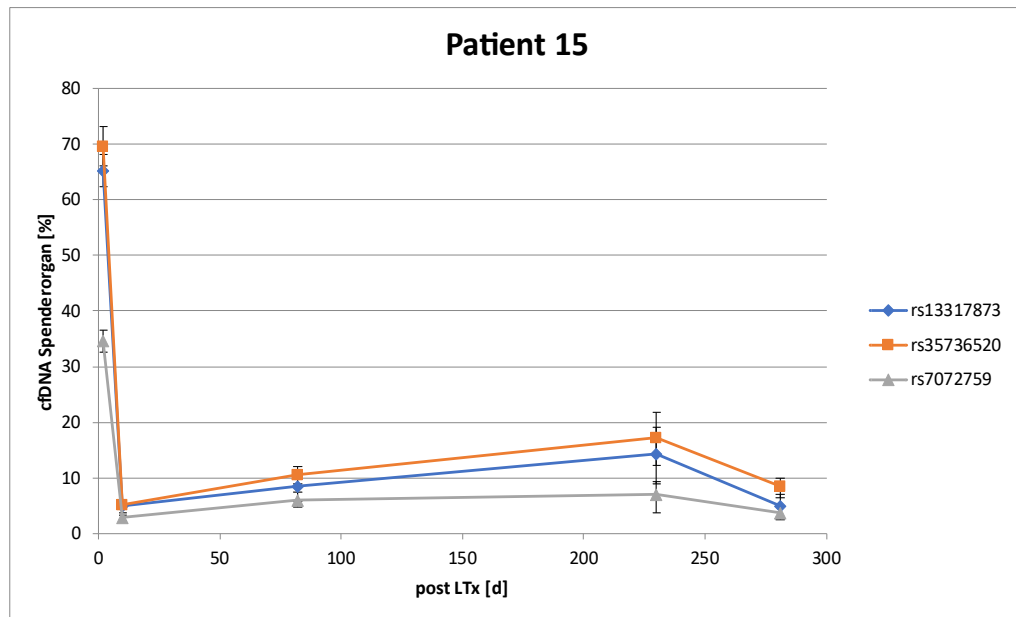


Abbildung 23 - GcfDNA-Verlauf von Patient 15
 Abgebildet sind die untersuchten SNPs „rs13317873“ (SNP 8), rs35736520 (SNP 21) und „rs7072759“ (SNP22) aus deren Mittelwert sich der GcfDNA-Anteil ergibt. Es zeigt sich ein initial fallender GcfDNA-Anteil, welcher in den folgenden Abnahmen erneut auf über 10% ansteigt, um anschließend wieder zu sinken.

Bei Patient 15 (s. Abbildung 23) zeigte sich postoperativ bis Tag 10 ein rascher Abfall des GcfDNA-Anteils auf 4,3%. Bei klinisch unauffälligem Verlauf war die GcfDNA in der folgenden Abnahme (Tag 82) zwar wieder leicht angestiegen, mit 8,73% jedoch weiterhin unter der Marke von 10%. Die Werte für γ -GT, GOT, GPT und CRP zeigten sich im Vergleich zu den normwertigen Ergebnissen von Tag 33 an Tag 82 ebenfalls wieder etwas gestiegen und insgesamt leicht erhöht. Im Zeitraum von Tag 118-145 kam es zu einer Phase mit Vigilanzminderung und dem Verdacht auf eine akute Abstoßungsreaktion, welcher sich nach der durchgeführten Leberpunktion bestätigte, sowie einer CMV-Reaktivierung. Nach Umstellung der Immunsuppression von Ciclosporin auf Tacrolimus und antiviraler Therapie mit Valganciclovir besserten sich der Zustand des Patienten sowie die Symptomatik, sodass es nicht zum Transplantatversagen kam. Der GcfDNA-Anteil wurde in diesem Zeitraum nicht quantifiziert, γ -GT, GOT und GPT waren ansteigend und erreichten um Tag 122 ihren Peak, anschließend zeigte sich eine fallende Tendenz. Der weitere Verlauf bis zur nächsten Quantifizierung gestaltete sich komplikationslos. Allerdings zeigte sich auch in der Abnahme an Tag 230 (12,9%) weiterhin ein erhöhter Wert bei ebenfalls leicht erhöhten Lebermarkern (γ -GT 110 U/l, GOT 46 U/l, GPT 57 U/l). An Tag 281 lag der GcfDNA-Anteil mit 5,73% wieder unterhalb der als Grenzwert geltenden 10%,

während die Lebermarker auf leicht erhöhtem Niveau stagnierten. Da zum Zeitpunkt der vermuteten Abstoßungsreaktion selbst keine GcfDNA-Quantifizierung stattfand, und aufgrund des langen Intervalls zwischen der zweiten und dritten Quantifizierungen, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen, ob der leicht gestiegene GcfDNA-Anteil in der zweiten Bestimmung bereits früher Ausdruck eines GcfDNA-Anstiegs im Rahmen der Abstoßungsreaktion war und ob im Zeitraum bis zu dritten Quantifizierung ein nicht erfasster Peak vorlag, welcher an Tag 230 bereits wieder abgefallen war.

9.2 Verhalten der GcfDNA bei Komplikationen, Vergleich mit GPT und Bilirubin

Ein Fokus dieser Untersuchung lag auf der potenziellen Eignung der GcfDNA als Monitoringparameter der Organintegrität. Zu diesem Zweck untersuchten wir einerseits das Verhalten der GcfDNA bei Vorliegen von Komplikationen sowie in Abwesenheit leberschädigender Ereignisse, andererseits setzten wir diese in Bezug zum Verhalten der Referenzparameter GPT und Bilirubin.

In mehreren Fällen konnte nachgewiesen werden, dass während des Auftretens von Komplikationen ein relevanter GcfDNA-Anstieg vorlag. Als Beispiel kann hier neben Patient 10 (s.u. und Patientenbeispiel im Ergebnisteil) auch Patientin 8 aufgeführt werden, bei der es am zweiten und neunten postoperativen Tag zu einer Anastomoseninsuffizienz und am sechsten postoperativen Tag zu Fieber kam. Parallel lässt sich bei ihr ein Anstieg des GcfDNA-Anteils von 14,77% an Tag 2 auf 36,8% an Tag 8 beobachten.

Uns interessierte jedoch auch, ob es Situationen gab, in denen eine der ausgewerteten Komplikationen auftrat, ein deutlicher GcfDNA-Anstieg jedoch ausblieb. Bei Patientin 7 kam es an Tag 85 zu Fieber und einem CMV-Nachweis, zuvor war die GcfDNA an Tag 62 mit 14,3% quantifiziert worden, in der Folge erst wieder an Tag 129 mit 12,6%. Wenn auch aus den 14 Tagen nach der Komplikation kein GcfDNA-Wert vorliegt und verglichen mit Tag 129 kein Anstieg der GcfDNA nachweisbar ist, so fällt doch auf, dass die GcfDNA bei dieser Patientin dauerhaft erhöht scheint. Die Erhöhung an Tag 62 könnte dabei möglicherweise bereits durch das später nachgewiesene Cytomegalie-Virus bedingt sein, bezüglich des Werts an Tag 129 waren in der Akte der Patientin keine klinischen Auffälligkeiten im zeitlichen Umfeld vermerkt. Bei Patientin 24 erfolgte an Tag 169 ebenfalls der Nachweis von

CMV, die GcfDNA war an diesem Tag verglichen mit dem Vorwert an Tag 7 deutlich gesunken bis auf 1,53%. In der folgenden Quantifizierung an Tag 180 ließ sich ein diskreter Anstieg auf 2,27% erkennen, sodass es denkbar ist, dass der GcfDNA-Anteil nach Tag 169 noch anstieg und bis Tag 180 gegebenenfalls bereits wieder gefallen war. Allerdings wurde das Virus bei dieser Patientin auch in den Tagen 238-285 mehrmals nachgewiesen, der GcfDNA-Anteil war in den Quantifizierungen an Tag 238 und 259 jedoch mit 0,55% bzw. 0,28% nur sehr gering und zeigte keine steigende Tendenz. Abgesehen von diesen beiden Patientinnen fanden sich im erfassten Kollektiv keine weiteren Fälle, in denen eine Komplikation nicht von einem GcfDNA-Anstieg begleitet worden wäre. Hierbei gilt es jedoch zu beachten, dass insbesondere (Re)-Infektionen mit Viren wie bspw. CMV oder EBV in mehreren Fällen in den ersten Tagen nach der Transplantation nachgewiesen wurden. In diesem Zeitraum befand sich der GcfDNA-Anteil meist im Abfall von den unmittelbar postoperativ deutlich erhöhten Werten und lag weiterhin über 10%, wodurch eine Beurteilung der tatsächlichen Auswirkung von Komplikationen auf die GcfDNA in diesem Zeitraum nicht möglich war. Auch lagen nicht in jedem Fall, in dem die betrachteten Komplikationen auftraten, GcfDNA-Werte aus den vorangegangenen bzw. folgenden 14 Tagen vor, sodass nicht immer eine entsprechende Beurteilung erfolgen konnte.

Weiterhin untersuchten wir, ob trotz Abwesenheit von Komplikationen relevante GcfDNA-Anstiege auftraten. Als relevant wurden dabei Anstiege auf über 10% GcfDNA-Anteil, entsprechend dem in der Literatur beschriebenen darunter liegenden Referenzbereich für unkomplizierte Verläufe, und gleichzeitig auf mindestens das Dreifache des Ausgangswertes erachtet. Ein solcher Anstieg trat im erfassten Kollektiv nicht auf. Der bei Patient 10 ab Tag 67 erkennbare GcfDNA-Anstieg ist, wie im Patientenbeispiel bereits ausführlich beschrieben, am ehesten als sehr früher Anstieg im Rahmen der ab Tag 89 diagnostizierten Komplikationen zu werten. Im unmittelbaren zeitlichen Umfeld des bei Patientin 12 aufgetretenen Anstiegs der GcfDNA an Tag 238 lag zwar keine der ausgewerteten Komplikationen vor, allerdings befand sich die Patientin bis kurz zuvor bei V.a. chronisch humorale Abstoßungsreaktion in stationärer Behandlung, sodass die erhöhte GcfDNA am ehesten hierdurch zu erklären ist.

Für ein zeitliches Vorausgehen des GcfDNA-Anstieges gegenüber einem GPT- oder Bilirubin-Anstieg im Falle leberpathologischer Ereignisse ergab sich in der

statistischen Auswertung der Daten kein statistisch signifikanter Hinweis. Es gab jedoch doch Situationen, in denen ein solches Vorausgehen zumindest vermutet werden kann: als Beispiel ist hier erneut die im Patientenbeispiel von Patient 10 geschilderte Situation zu nennen: 90 Tage nach der Transplantation wurde bei ihm eine ITBL diagnostiziert. Während die Transaminasen ab Tag 67 oder später eine steigende Tendenz zeigten, ließ sich in den Quantifizierungen der GcfDNA bereits an Tag 36 ein im Vergleich zur vorhergehenden Quantifizierung angestiegener, wenn auch weiterhin unter 10% liegender Wert beobachten. An Tag 67 lag dann ein deutlich erhöhter Wert vor, welcher bis Tag 85 weiter anstieg. Es liegt also nahe, dass unter höherfrequenten GcfDNA-Quantifizierungen durchaus ein signifikantes Vorausgehen eines GcfDNA-Anstiegs vor Elevation der anderen laborchemischen Parameter beobachtet worden wäre.

Während der Beobachtungszeit trat im Kollektiv nur eine histologisch bestätigte Abstoßung auf (Patient 15). Im näheren zeitlichen Umfeld der Abstoßung fand jedoch keine GcfDNA-Quantifizierung statt. Daher ist eine Aussage über die Eignung der GcfDNA als Früh-Marker für Abstoßungsreaktionen im Rahmen dieser Untersuchung nicht möglich. Schütz et al. berichten von 17 beobachteten Abstoßungsreaktionen mit einer medianen Erhöhung des GcfDNA-Anteils auf 29,6%. In vier Fällen zeigte sich ein Anstieg bereits 8-15 Tage vor dem Nachweis in der Biopsie (32).

9.3 GcfDNA als Monitoringparameter der Organintegrität

In Zusammenschau der Ergebnisse hat sich gezeigt, dass die GcfDNA im Monitoring der Organintegrität nach Lebertransplantation ein vielversprechender Marker ist. Ihre hohe Sensitivität sowie ihre rasche Dynamik qualifizieren sie für diverse Einsatzbereiche nach einer Transplantation, allen voran die frühe, sensitive Erfassung von Abstoßungsreaktionen und Komplikationen. In diesem Bereich bereits etablierte, sensitive Marker, wie beispielsweise die GPT, konnten als Referenzparameter zugrunde gelegt werden und so die Ergebnisse der GcfDNA-Quantifizierungen überprüft und verglichen werden. Es traten im Kollektiv bei mehreren Patienten Komplikationen auf, welche einen Organschaden zur Folge hatten. Aufgrund der höheren Korrelation zwischen GcfDNA und GPT gegenüber Bilirubin legten wir den Fokus bei der Erfassung der Komplikationen auf den Vergleich der GcfDNA mit der GPT. Es zeigte sich, dass die Komplikationen von der GcfDNA mindestens genauso zuverlässig erfasst wurden, wie von der GPT (68). Die beobachtete Kongruenz von GPT und GcfDNA während leberpathologischer

Ereignisse spricht dafür, dass die Anwendbarkeit der GcfDNA im Monitoring nach Transplantation auch auf andere Organe übertragbar ist, in deren postoperativen Prozedere es noch keine verlässlichen Marker der Organintegrität gibt. Zu nennen sind hier beispielsweise Nierentransplantationen, bei denen der Kreatinin-Wert zum Zweck des Monitorings nur sehr bedingt geeignet ist, da ein relevanter Anstieg des Wertes erst zu erwarten ist, wenn die Niere, bzw. das Nierentransplantat bereits mindestens 50% seiner Funktion eingebüßt hat (28, 29, 41). Die Kreatinin-Bestimmung birgt weiterhin den Nachteil, Organschaden nur indirekt über die GFR zu messen, messbare Anstiege zeigen sich hier erst nach 24-48 Stunden. Außerdem ist es wenig sensitiv und abhängig von weiteren Faktoren, wie beispielsweise der Muskelmasse des Patienten (63, 70). Goldstandard in der Diagnostik von Abstoßungsreaktionen ist nach Nierentransplantation weiterhin die Biopsie, hier könnte die GcfDNA in Zukunft jedoch die klinische Praxis verändern (63, 69, 70). Auch nach einer Lungentransplantation stellen bisher die transbronchiale Lungenbiopsie sowie die fieberoptische Bronchoskopie den Goldstandard in der Diagnostik von Abstoßungen dar. Diese sind jedoch teuer und invasiv (65). Auch hier könnte die GcfDNA das Monitoring erleichtern und optimieren. Im bisherigen Monitoring nach Herztransplantation finden beispielsweise Echokardiographien oder eine endomyokardiale Biopsie Anwendung. Nachteilig sind in diesem Fall mangelnde Spezifität und Sensitivität, sowie im Fall der Biopsie hohe Invasivität (28, 29, 38, 39, 41). Weiterhin kommt es bei bis zu 20% der Herztransplantierten zu Biopsie-negativen Abstoßungen (29). Die in der Literatur beschriebenen Beobachtungen von GcfDNA-Anstiegen, bevor die Abstoßungsreaktionen in der Biopsie erkenntlich wurden, unterstreichen den Vorteil der GcfDNA, durch ihre frühe Dynamik eine zeitnahe Diagnose und Therapieeinleitung zu ermöglichen (29, 38).

Da im Beobachtungszeitraum nur eine histologisch bestätigte Abstoßungsreaktion auftrat und in deren unmittelbaren zeitlichen Umfeld keine GcfDNA-Quantifizierung stattfand, kann im Rahmen der Untersuchung keine Aussage bezüglich des Verhaltens der GcfDNA während Abstoßungen getroffen werden. In verschiedenen Quellen der Literatur wird von deutlich und signifikant erhöhten GcfDNA-Anteilen bei Vorliegen einer akuten Abstoßungsreaktion berichtet, welche der Diagnose teils zeitlich vorausgehen und dadurch die frühe Diagnose und Therapie auch subklinischer Abstoßungen ermöglichen (29, 32, 41, 70). Im Hinblick auf die oft schwerwiegenden Nebenwirkungen der dauerhaften Immunsuppression, welche

einen der Gründe für das in den letzten Jahren nicht weiter gestiegene Langzeitüberleben der lebertransplantierten Patienten darstellt, kann man sich dieses Potenzial, auch laut weiteren Autoren, im Rahmen der Steuerung und Individualisierung der Immunsuppression zunutze machen (26, 41, 70). Bloom et al. schlussfolgern weiterhin, dass die GcfDNA die Möglichkeit bietet, die Organintegrität häufig, sicher, nichtinvasiv und quantitativ zu beurteilen (70).

Ein weiteres Einsatzgebiet des von uns im Labor etablierten ddPCR Assays existiert im Bereich der Chimerismusanalyse, beispielsweise nach Stammzelltransplantationen bei Patienten mit Leukämie (68). Hierbei lässt sich anhand des abweichenden Genotyps der transplantierten Stammzellen bzw. des transplantierten Knochenmarks der vom Spender stammende Anteil an der Hämatopoese monitoren (68). Ein Abfall des Donorchimerismus kann dabei einen frühen Hinweis auf einen Rückfall darstellen und eine frühzeitige Therapieanpassung ermöglichen (68). Hierzu gab es in unserer Arbeitsgruppe parallel zu der vorliegenden eine weitere Untersuchung, in der der Donorchimerismus bei Patienten nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation quantifiziert wurde, die verwendete Technik war dabei mit der hier verwendeten identisch, als Referenz-Methode wurde parallel eine autosomale STR-PCR durchgeführt. Die Ergebnisse waren auch in jener Untersuchung gut miteinander korrelierbar. Als zusätzlicher Vorteil erwies sich die deutlich höhere Sensitivität der ddPCR (0,2%) verglichen mit der STR-PCR (5%) (68).

In die Zukunft blickend könnte der verbreitete Einsatz der GcfDNA auch dabei helfen, Biopsien nach Organtransplantation zumindest in Teilen zu ersetzen (58). Neben der Risikominimierung und Aufwandsminderung ist hier nicht zuletzt der Vorteil der geringeren Belastung für die Patienten zu nennen. Zu diesem Schluss kamen auch weitere Autoren (39, 40).

9.4 Stärken der GcfDNA

Die GcfDNA weist als Parameter im Monitoring nach Lebertransplantation, wie bereits erwähnt, zahlreiche Stärken und Vorteile auf, von denen die wichtigsten hier noch einmal zusammenfassend erwähnt werden sollen.

Einer ihrer größten Vorzüge besteht darin, dass sie einen direkten Rückschluss auf die Organintegrität erlaubt, während die bisher etablierten Parameter nur indirekte Aussagen liefern (29, 32). Durch ihre kurze Halbwertszeit gibt sie außerdem

frühzeitig Auskunft über eventuell vorliegende Organschäden und erlaubt somit die rasche Therapieeinleitung bzw. -anpassung und die zeitnahe Beurteilung des Therapieerfolgs (58). Durch die genannten Eigenschaften bietet sie die Möglichkeit, vor allem auch in Kombination mit TDM, die Immunsuppression nach Organtransplantation zu individualisieren und besser zu steuern (26, 70).

Ein weiterer Vorteil liegt in der Organspezifität der GcfDNA. Aufgrund der verschiedenen Genome von Spender und Empfänger kann mit großer Sicherheit davon ausgegangen werden, dass der nachgewiesene GcfDNA-Anteil aus dem Transplantat stammt. Dies ist eine Eigenschaft, die viele der gängigen Organmarker nicht aufweisen. Zusätzlich sind diese meist von weiteren Einflüssen und Faktoren abhängig, die Höhe der GcfDNA wird jedoch rein durch die Anzahl zugrunde gehender Leberzellen bedingt (32).

Im Falle von vermuteten Abstoßungsreaktionen war bisher eine Leberpunktion die einzige Möglichkeit, die Diagnose definitiv zu bestätigen (32). Die GcfDNA birgt hier den großen Vorteil, dass sie deutlich nichtinvasiver, komplikationsärmer und mit erheblich weniger Belastung für die Patienten bestimmt werden kann (28, 32, 38).

9.5 Limitationen der GcfDNA

Neben den zahlreichen genannten Vorteilen der GcfDNA als Monitoringparameter gilt es jedoch selbstverständlich auch, die Limitationen bzw. Nachteile zu berücksichtigen. So kann der prozentuale GcfDNA-Anteil durch Änderungen der Menge der gesamten zellfreien DNA beeinflusst bzw. maskiert werden (29, 32, 63). Diese wird wiederum beispielsweise durch Leukozytose oder Leukopenie, den Body Mass Index des Patienten oder körperliche Anstrengung beeinflusst. Einen Lösungsansatz für dieses Problem bietet die Quantifizierung der absoluten GcfDNA-Menge mit der Angabe der Kopien-Zahl pro Milliliter (32, 63). Eine weitere Limitation der in der Untersuchung beschriebenen Methode ist, dass sie sowohl GcfDNA-Erhöhungen erfasst, die durch Abstoßungsreaktionen verursacht werden, als auch solche, die durch andere leberpathologische Ereignisse, wie Durchblutungsstörungen oder Virushepatitiden entstehen. Allein anhand der GcfDNA ist eine Differenzierung zwischen den Ereignissen nicht möglich. Die GcfDNA kann also nicht als alleiniger Diagnose-Parameter herangezogen werden, sondern ist am nützlichsten in Zusammenschau mit anderen klinischen, laborchemischen und bildgebenden Befunden, insbesondere auch dem therapeutischen Drug Monitoring

der Immunsuppressiva (29, 59). Weiterhin ist der Einfluss einer zu hoch dosierten Immunsuppression auf die Dynamik der GcfDNA noch ungeklärt (29). Eine weitere, recht spezielle Limitation, die nur Patienten betrifft, die mehrere Organe von demselben Spender erhalten haben, besteht darin, dass bei einem Anstieg der GcfDNA nicht differenziert werden kann, auf welches Organ der Anstieg zurückzuführen ist (29, 40).

Eine weitere Einschränkung stellt das bisherige Fehlen von allgemein etablierten Referenzwerten der GcfDNA nach Transplantation verschiedener Organe dar (60). Im erfassten Kollektiv lag der Referenzwert wie bereits beschrieben mit 14,77% etwas höher als die in der Literatur bisher beschriebenen Werte.

Auch die logistischen Voraussetzungen der Quantifizierung könnten gegebenenfalls dem verbreiteten Einsatz der GcfDNA im Wege stehen: die in dieser und weiteren Untersuchungen verwendete Methode ist auf das Vorhandensein eines Labors angewiesen, welches Geräte und Personal zur Durchführung der ddPCR vorhält (29, 32). Bedingt durch den sich an die Operation anschließenden intensivstationären Aufenthalt, wie auch im weiteren Verlauf im Falle von Komplikationen und Notfällen, kann eine GcfDNA-Quantifizierung jederzeit notwendig werden, sodass die Durchführung rund um die Uhr gewährleistet sein muss.

In den letzten Jahren wurden zunehmend Verfahrensweisen entwickelt, welche die Detektion und Quantifizierung der GcfDNA auch in Abwesenheit von Spendergewebe, zu niedrigeren Kosten und innerhalb eines Tages ermöglichen. Diese wurden sowohl in der vorliegenden Untersuchung angewandt als auch beispielsweise von Beck und Oellerich et al. sowie von Schütz et al. (26, 32, 41). Hierdurch konnte bereits mehreren der bis dato relevantesten Nachteilen der Verwendung der GcfDNA als Biomarker entgegengewirkt werden: der Notwendigkeit des Vorliegens von Spender-DNA zur Genotypisierung und den verhältnismäßig hohen Kosten und der Dauer des Quantifizierungs-Prozederes (26, 40, 41). Die Materialkosten einer einzelnen GcfDNA-Quantifizierung mit der von uns verwendeten Methode betragen ca. 25€. Beck et al. gaben für ihre ähnlich durchgeführten Quantifizierungen Kosten von ca. 94€ und eine Dauer von etwa 5-6 Stunden an (42). Im Gegensatz hierzu lässt sich die GPT jedoch weiterhin deutlich schneller und kosteneffektiver, außerdem aufwandsärmer, quantifizieren. Das Ergebnis einer GPT-Messung kann vollautomatisiert innerhalb von weniger als einer Stunde vorliegen bei

einer Hands-on-Time von unter 5 Minuten. Die Kosten für eine GPT-Messung betragen laut der Gebührenordnung für Ärzte (GOÄ) 2,68€. Die Kosten für die GcfDNA-Quantifizierung setzen sich nach der GOÄ hingegen aus 52,46€ für die DNA-Isolierung, 3x33,52€ für die PCR von 3 SNPs und 3x134,06€ für die Sequenzermittlung, also insgesamt 220,04€, restriktiv gerechnet, zusammen.

Im untersuchten Kollektiv wurden Transplantatschäden durch die GcfDNA ebenso zuverlässig erfasst wie durch die GPT. Allerdings ließ sich kein Vorteil der GcfDNA gegenüber der GPT nachweisen. In Anbetracht der unkomplizierteren, kostengünstigeren Bestimmung der GPT wird diese voraussichtlich auch in Zukunft im Monitoring nach Lebertransplantation nicht vollständig durch die GcfDNA ersetzt werden. Nichtsdestotrotz unterstreicht die Gleichwertigkeit beider Parameter die hohe Sensitivität sowie das Potenzial der GcfDNA. Im Gegensatz zur Lebertransplantation existieren wie bereits erwähnt, im Bereich anderer Organe keine vergleichbar sensitiven Parameter zum Monitoring der Organintegrität. Hier würde die GcfDNA einen großen Informationsgewinn und die Optimierung des Monitorings sowie die Einsparung von Biopsien ermöglichen.

9.6 Quantifizierung mittels ddPCR

Bei der Wahl der Quantifizierungsmethode entschieden wir uns in dieser Untersuchung für die ddPCR. Sie ist ebenso sensitiv wie die Methode der qPCR, in unserer Untersuchung lag die Nachweisgrenze bei 0,08 Kopien/ μ l, die Quantifizierungsgrenze im Durchschnitt bei 1,42 Kopien/ μ l. Gleichzeitig ist sie jedoch deutlich präziser als die qPCR und kostengünstiger als NGS.

In Übereinstimmung mit den zu diesem Thema veröffentlichten Erkenntnissen konnte in allen Fällen des Kollektivs die GcfDNA präzise und zuverlässig quantifiziert werden, insbesondere auch in Proben mit niedrigem GcfDNA-Anteil (68).

Für die GcfDNA-Quantifizierung nach Lebertransplantation, sowohl in der Anfangsphase mit noch hohen GcfDNA-Anteilen als auch im Verlauf mit Werten von teilweise deutlich unter 1%, erwies sich die ddPCR in der vorliegenden Untersuchung rückblickend als gut geeignet.

Auch Beck et al. kamen zu dem Ergebnis, dass die Sensitivität der ddPCR ausreicht, kritische Änderungen des GcfDNA-Anteils zu erfassen und dass sich die GcfDNA-Anteile ihrer Untersuchung oberhalb der Quantifizierungsgrenze befanden (41).

9.7 Stärken und Schwächen der Untersuchung

Positiv hervorzuheben ist, dass es sich in der vorliegenden Untersuchung um eine prospektive Beobachtung handelte. Einzig Patientin 1 wurde nachträglich in die Untersuchung aufgenommen, ab diesem Zeitpunkt (Tag 4 nach LTx) jedoch ebenfalls prospektiv beobachtet. Hierdurch konnte sichergestellt werden, dass von allen Patienten GcfDNA-Werte aus den ersten Tagen nach der Transplantation vorlagen, um deren unmittelbar postoperative Dynamik beurteilen zu können. Weiterhin konnte dadurch gewährleistet werden, dass auch im folgenden Beobachtungszeitraum ausreichend Daten für die wissenschaftliche und statistische Auswertung erhoben wurden.

Da ins Kollektiv ausschließlich an der Universitätsmedizin Mainz lebertransplantierte Patienten des genannten Zeitraums eingeschlossen wurden, resultierte hieraus ein verhältnismäßig kleines Patientenkollektiv von 25 Patienten. Das erfasste Kollektiv erwies sich bezüglich Geschlechts, Alter, Vorerkrankungen sowie Allgemeinzustand und weiteren Faktoren als sehr heterogen, entsprechend Gesamtheit der lebertransplantierten Patienten. Die Untersuchungsergebnisse zeigten, dass, ungeachtet der Heterogenität des Kollektivs, die GcfDNA leberpathologische Ereignisse mindestens genauso gut erfasste, wie die GPT und erbrachten somit bereits aufschlussreiche Informationen.

Bezüglich der verwendeten Quantifizierungsmethode ist als große Stärke zu werten, dass diese nicht auf das Vorliegen von Spender-DNA angewiesen ist. Außerdem kann sie, mit Ausnahme eineiiger Zwillinge, bei jeglicher Spender-Empfänger-Kombination angewendet werden und ist beispielsweise nicht auf eine bestimmte Geschlechterkombination angewiesen.

Der Beobachtungszeitraum der Untersuchung war auf 450 Tage beschränkt. Hieraus resultierte, dass in der Untersuchung nur eine histologisch bestätigte Abstoßungsreaktion erfasst wurde. Mit einem längeren Beobachtungszeitraum nach der Transplantation erhöht sich die Chance, Abstoßungsreaktionen oder Ereignisse, die eine Retransplantation zufolge haben, zu erfassen und die Dynamik der GcfDNA in diesem Zeitraum genauer zu untersuchen.

Eine weitere Limitation besteht in den bereits erwähnten, unregelmäßigen Quantifizierungsintervallen der GcfDNA. Hierdurch war eine genaue Betrachtung des GcfDNA-Verlaufs und insbesondere dessen Beurteilung während auftretender leberpathologischer Ereignisse nicht immer möglich. Auch war nicht immer ein direkter Vergleich mit den laborchemischen Parametern möglich. Diese wurden

deutlich häufiger und insgesamt regelmäßiger erfasst, jedoch nicht immer am Tag der GcfDNA-Quantifizierung selbst. Durch diese unterschiedlichen Quantifizierungsintervalle ergibt sich die Möglichkeit, dass ein zeitliches Vorausgehen eines GcfDNA-Anstiegs vor Anstieg der etablierten Lebermarker im Zweifelsfall nicht erfasst wurde. Weiterhin konnte nicht exakt festgestellt werden, wie hoch genau die GcfDNA nach der Operation stieg, wann sie ihren Höhepunkt erreichte und wie rasch der Abfall anschließend erfolgte. Hier besteht weiterer Forschungsbedarf mit höherfrequenten Quantifizierungen der GcfDNA und sichergestellter Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Parameter.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen anderer Autoren wurde in der vorliegenden Untersuchung die GcfDNA aus EDTA-Röhrchen bestimmt, es wurden keine speziellen DNA-Röhrchen zur Entnahme verwendet (32, 41). Allerdings erfolgten alle Blutentnahmen in den Räumlichkeiten der Universitätsmedizin Mainz und die Verarbeitung des Materials fand unmittelbar im Anschluss im hauseigenen Labor statt, sodass einer Verfälschung der Ergebnisse durch einsetzenden Zellzerfall in den Röhrchen zuvorgekommen wurde.

In die Zukunft blickend besteht zum Thema der GcfDNA und ihrer potenziellen Einsatzgebiete nach Organtransplantation weiterhin Forschungsbedarf. Es bedarf breit angelegter Studien mit größeren Kollektiven und längerer Nachbeobachtungszeit. Insbesondere weitere prospektiv designte Studien mit engmaschiger, paralleler Bestimmung der GcfDNA und laborchemischen Parameter sind notwendig.

9.8 Schlussfolgerung

Durch die Erfassung eines Kollektivs lebertransplantierte Patienten entschieden wir uns für ein Kollektiv, für welches bereits etablierte und gute Marker der Organintegrität existieren, in diesem Falle die Transaminasen, insbesondere die GPT. Diese Marker erlaubten es uns, unsere Ergebnisse der GcfDNA-Quantifizierungen zu überprüfen und zu vergleichen. Hierbei ergab sich eine statistisch signifikante Korrelation von GcfDNA und GPT. Die GcfDNA detektierte leberpathologische Ereignisse in unserer Untersuchung mindestens so gut, wie die GPT. Damit war die Anwendbarkeit der GcfDNA im Monitoring nach Transplantation nachgewiesen.

Ein zeitliches Vorausgehen der GcfDNA im Falle von Abstoßungen wurde in der Untersuchung nicht beobachtet. Gründe hierfür liegen in der kleinen Kollektivgröße, den unregelmäßigen GcfDNA-Abnahmen und der Tatsache, dass während des Beobachtungszeitraums nur eine histologisch bestätigte Abstoßung auftrat. Diverse Autoren, z.B. Knight et al. und Schütz et al. berichten während Abstoßungsreaktionen von einem zeitlichen Vorausgehen der GcfDNA vor einem Anstieg der Transaminasen und entsprechenden klinischen Symptomen (32, 59). Bezüglich der von uns ausgewerteten Komplikationen wurde zwar ebenfalls kein zeitliches Vorausgehen eines GcfDNA-Anstiegs beobachtet, es kann jedoch in einigen Situationen zumindest vermutet werden. Dass sich die GcfDNA in diesen Fällen als der GPT nicht überlegen erwies, spricht unter anderem auch für deren Eignung als Monitoringparameter und nicht zuletzt für die klinische Erfahrung und Kompetenz des behandelnden Teams.

Im Rahmen dieser Untersuchung ließ sich anhand der GcfDNA nicht zwischen Infektionen und anderen Komplikationen differenzieren, da sich der Verlauf der GcfDNA während einer Infektion nicht vom Verlauf während der anderen untersuchten Komplikationen unterschied.

Die Eignung der ddPCR zum Monitoring wird auch durch die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe aus der Untersuchung an Patienten nach hämatopoetischer Stammzell-Tx unterstrichen. Auch hier zeigte sich eine signifikante Korrelation von ddPCR quantifiziertem Donorchimerismus und dem Monitoring mittels autosomaler STR-PCR. Zusätzlich konnte ein gegebenenfalls fallender Donorchimerismus durch die höhere Sensitivität der ddPCR bereits früher erfasst werden als mittels STR-PCR. Weiterhin werden hierdurch Quantifizierungen und damit Monitoring im peripheren Blut statt nur im Knochenmark ermöglicht. Diese Ergebnisse waren so aussagekräftig, dass die Methode bereits Anwendung in der Routinediagnostik der Universitätsmedizin Mainz findet.

Die gute Korrelation von GcfDNA und GPT in der vorliegenden Untersuchung und die dadurch bewiesene Anwendbarkeit der GcfDNA im Monitoring erlaubt in Zukunft auch deren Anwendung nach Transplantation anderer Organe, für die keine geeigneten, etablierten Marker zur Verfügung stehen.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die GcfDNA einen hochspezifischen Marker der Organintegrität nach Transplantation darstellt. Besagte Organintegrität

kann mithilfe der GcfDNA direkt, nichtinvasiv und wiederholt beurteilt werden, was einen großen Fortschritt in diesem Bereich darstellt. Weiterhin kann sie zur Optimierung und Individualisierung der Immunsuppression eingesetzt werden. Nach einer Lebertransplantation kann sie, vor allem in Kombination mit bereits etablierten Parametern oder TDM, die Qualität des bisherigen Monitorings weiter verbessern. Vor allem stellt sie aber auch nach Transplantationen, für deren Organe bisher keine geeigneten Parameter vorliegen, eine vielversprechende Möglichkeit zur Überwachung der Organintegrität dar. Durch diese Eigenschaften hat die GcfDNA das Potenzial, das Überleben von Patienten und Transplantaten erheblich zu verbessern.

9.9 Ausblick

In die Zukunft blickend wird die GcfDNA die etablierten Methoden des Monitorings, insbesondere die Bestimmung der Transaminasen in absehbarer Zeit nicht vollständig ablösen, da diese im Vergleich zur GcfDNA kostengünstiger, schneller und ebenso nichtinvasiv bestimmbar sind. Zusätzlich existieren für die bisher verwendeten Parameter bereits Referenzbereiche, welche für die GcfDNA noch nicht allgemeingültig definiert sind. Ob die GcfDNA die Durchführungen von Leberpunktionen ersetzen wird, bleibt fraglich. Einerseits bietet sie den Vorteil, deutlich weniger invasiv zu sein und weder dem Stichprobenfehler noch einer subjektiven Beurteilung durch einen Auswerter zu unterliegen. Andererseits ist die in dieser Untersuchung verwendete Quantifizierung mittels ddPCR personal- und zeitintensiv.

Die GcfDNA stellt jedoch, vor allem in Kombination mit den bisherigen Routinen eine Bereicherung des Monitorings dar und ermöglicht die Gewinnung wertvoller, zusätzlicher Informationen.

10 Zusammenfassung

Es gibt eine Vielzahl von Krankheitsbildern, die ein Organ in seiner Funktion irreversibel einschränken und eine Organtransplantation nötig machen, um das Überleben des Patienten zu sichern. Nach erfolgreicher Transplantation ist die Überwachung der Organintegrität unverzichtbar. Als ein potenzieller Parameter der Organintegrität gilt die GcfDNA, also die aus zugrunde gehenden Zellen des Spenderorgans freigesetzte zellfreie DNA, welche im Blut der Organempfänger quantifiziert werden kann. Möglich ist diese Quantifizierung aufgrund der Unterschiede im Genom von Spender und Empfänger.

Ziel dieser Untersuchung war es, zu untersuchen, wie sich die Dynamik GcfDNA nach erfolgter Lebertransplantation gestaltet, insbesondere im Hinblick auf leberpathologische Ereignisse. Im Falle solcher Ereignisse bestand zusätzlich die Frage, ob ein Anstieg der GcfDNA einem Anstieg etablierter Marker wie der GPT oder des Bilirubins zeitlich vorausgeht. Weiterhin sollte untersucht werden, ob mithilfe der GcfDNA bei eingeschränkter Transplantatfunktion zwischen Infektionen und anderen Ursachen der Funktionseinschränkung unterschieden werden kann. Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wurde ein Patientenkollektiv von 25 zwischen April und Dezember 2017 lebertransplantierten Patienten erfasst und 450 Tage nach der Transplantation beobachtet. Es wurde ein ddPCR-Assay, basierend auf Single Nucleotid Polymorphismen mit hoher Minor Allel Frequenz, entwickelt. Heterolog homozygote SNPs wurden bevorzugt, lagen diese nicht in ausreichender Form vor, wurde auf solche zurückgegriffen, für die der Empfänger homozygot und der Spender heterozygot war. Für jeden Patienten des Kollektivs erfolgten mithilfe dieses Assays zwei bis acht GcfDNA-Quantifizierungen, zusätzlich wurden die routinemäßig bestimmten laborchemischen Parameter sowie die Patientenakten ausgewertet.

Nach Abschluss der Datenerfassung und -auswertung ergab sich bei allen Patienten unmittelbar nach der Transplantation ein deutlich erhöhter GcfDNA-Anteil, welcher im Verlauf in unkomplizierten Fällen rasch unter 10% sank, was in der Literatur wiederholt als Grenze zwischen normwertigen und erhöhten GcfDNA-Werten beschrieben wurde (26, 41). In einigen Fällen ergab sich in den ersten Bestimmungen ein wiederholt erhöhter GcfDNA-Anteil, welcher sowohl Ausdruck eines verzögerten Absinkens als auch eines Wiederaanstiegs der GcfDNA nach

einem nicht erfassten Absinken sein kann. Eine genaue Differenzierung war aufgrund der langen Intervalle zwischen den GcfDNA-Quantifizierungen nicht immer möglich. Im Rahmen von leberpathologischen Ereignissen ließ sich ein Anstieg der GcfDNA sowie der Referenzparameter, insbesondere der GPT und des Bilirubins beobachten. Dies deckt sich mit den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen. Es bestand eine statistisch signifikante Korrelation für GcfDNA und GPT, jedoch nicht für GcfDNA und Bilirubin. Ein signifikantes zeitliches Vorausgehen des GcfDNA-Anstiegs vor einem Ansteigen beider Referenzparameter konnte in dieser Untersuchung nur bei einzelnen Individuen, nicht aber im Gesamtkollektiv nachgewiesen werden. Auch eine Differenzierung zwischen Infektionen und anderen leberpathologischen Ereignissen war nicht ausschließlich mithilfe der GcfDNA möglich. Im beobachteten Kollektiv trat während des Beobachtungszeitraumes eine histologisch bestätigte Abstoßung auf, die Dynamik der GcfDNA konnte in diesem Zusammenhang mangels Quantifizierungszeitpunkten im zeitlichen Umfeld der Abstoßung jedoch nicht beurteilt werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass sich die GcfDNA in dieser Untersuchung als sensitiver, direkter Parameter der Organintegrität erwies, welcher in der Erfassung leberpathologische Ereignisse den gewählten Referenzparametern nicht nachstand. Diese Erkenntnis deckt sich mit den Beschreibungen in der zu diesem Thema bereits veröffentlichten Literatur. Limitierend bezüglich der Verwendung in diesem Rahmen wirkt sich unter anderem aus, dass bisher allein anhand der GcfDNA nicht zwischen Abstoßung und anderen transplantatschädigenden Ereignissen unterschieden werden kann.

Die GcfDNA hat daher mit Blick in die Zukunft das Potenzial, das Monitoring der Organintegrität nach Organtransplantationen voranzubringen und zu verbessern, insbesondere nach Transplantation von Organen, für welche keine entsprechend sensitiven Parameter existieren, wie es mit der GPT für Lebertransplantationen der Fall ist. Vor allem in Kombination mit bereits bestehenden klinischen Routinen und Methoden, beispielsweise TDM, kann die GcfDNA das bisherige Monitoring bereichern, bei der Vermeidung unerwünschter Ereignisse, sowohl im Hinblick auf direkte Komplikationen am Transplantat als auch bezüglich der Nebenwirkungen der jahrelangen Immunsuppression, eine wertvolle Hilfe darstellen und schlussendlich das Outcome nach Organtransplantation verbessern.

11 Literaturverzeichnis

1. Starzl TE, Marchioro TL, Vonkaulla KN, Hermann G, Brittain RS, Waddell WR. HOMOTRANSPLANTATION OF THE LIVER IN HUMANS. Surg Gynecol Obstet. 1963;117:659-76.
2. Meirelles Júnior RF, Salvalaggio P, Rezende MB, Evangelista AS, Guardia BD, Matielo CE, et al. Liver transplantation: history, outcomes and perspectives. Einstein (Sao Paulo). 2015;13(1):149-52.
3. Fox AN, Brown RS, Jr. Is the patient a candidate for liver transplantation? Clin Liver Dis. 2012;16(2):435-48.
4. Starzl TE. The Current Status of Liver Transplantation. Hosp Pract (Hosp Ed). 1971;6(3):47-60.
5. Jadowiec CC, Taner T. Liver transplantation: Current status and challenges. World J Gastroenterol. 2016;22(18):4438-45.
6. Schlitt HJ, Loss M, Scherer MN, Becker T, Jauch KW, Nashan B, et al. [Current developments in liver transplantation in Germany: MELD-based organ allocation and incentives for transplant centres]. Z Gastroenterol. 2011;49(1):30-8.
7. Starzl TE, Todo S, Tzakis AG, Gordon RD, Makowka L, Stieber A, et al. Liver transplantation: an unfinished product. Transplant Proc. 1989;21(1 Pt 2):2197-200.
8. Schöning W, Öllinger R, Schmelzle M, Pratschke J. [Frontiers in liver transplantation in indication and techniques]. Chirurg. 2019;90(2):102-9.
9. Wang W, Wang B, Liu C, Yan J, Xiong X, Wang X, et al. Serum proteomic predicts effectiveness and reveals potential biomarkers for complications in liver transplant patients. Aging (Albany N Y). 2020;12(12):12119-41.
10. Verstegen MMA, Spee B, van der Laan LJW. Bioengineering Liver Transplantation. Bioengineering (Basel). 2019;6(4).
11. Info O. Lebertransplantation - Zahlen und Fakten 2023 [cited 2023 12.09.]. 12:9 Uhr]. Available from: <https://www.organspende-info.de/organspende/transplantierbare-organe/lebertransplantation/>.
12. Organtransplantation DS. Jahresbericht Organspende und Transplantation in Deutschland 2021. Frankfurt/Main: Deutsche Stiftung Organtransplantation; 2022 April 2022.
13. Organtransplantation DS. Indikationen für eine Lebertransplantation 2022 [cited 2022 31.10.]. 10:09 Uhr]. Available from: https://www.dso.de/DSO-Infografiken/Indikationen_LeberTX.png.
14. Peng Y, Qi X, Guo X. Child-Pugh Versus MELD Score for the Assessment of Prognosis in Liver Cirrhosis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. Medicine (Baltimore). 2016;95(8):e2877.
15. Eurotransplant. Eurotransplant Deutschland [cited 2022 02.11.]. Available from: <https://www.eurotransplant.org/region/deutschland/>.
16. Jochmans I, van Rosmalen M, Pirenne J, Samuel U. Adult Liver Allocation in Eurotransplant. Transplantation. 2017;101(7):1542-50.
17. Moraes ACO, Oliveira PC, Fonseca-Neto O. THE IMPACT OF THE MELD SCORE ON LIVER TRANSPLANT ALLOCATION AND RESULTS: AN INTEGRATIVE REVIEW. Arq Bras Cir Dig. 2017;30(1):65-8.
18. Eurotransplant. Eurotransplant Manual - Chapter 5: ET Liver Allocation System (ELAS) 2022 [updated 10.03.2022; cited 2022 26.09.]. Version 6.2:[Available

from: <https://www.eurotransplant.org/wp-content/uploads/2022/03/H5-ELAS-MELD-March-2022.pdf>.

19. Manns MP. Liver cirrhosis, transplantation and organ shortage. *Dtsch Arztebl Int.* 2013;110(6):83-4.
20. Hess R. [Securing transplantation medicine. Duties of the German Foundation for Organ Transplantation (DSO)]. *Med Klin Intensivmed Notfmed.* 2014;109(6):403-7.
21. Organtransplantation DS. Deutsche Stiftung Organtransplantation - Gemeinnützige Stiftung, Koordinierungsstelle Organspende [cited 2022 02.11.]. Available from: <https://www.dso.de/dso/%C3%BCber-die-dso>.
22. Info O. Leberlebenspende [cited 2022 02.11.]. Available from: <https://www.organspende-info.de/lebendorganspende/leberlebenspende/>.
23. Settmacher U, Bauschke A, Malessa C, Scheuerlein H, Zanow J, Rauchfuß F. [Liver transplantation with living donor : current aspects, perspectives and significance in Germany]. *Chirurg.* 2013;84(5):398-408.
24. Hoppmann N, Massoud O. Medical care of liver transplant patients. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2020;14(10):901-18.
25. Russo FP, Bassanello M, Senzolo M, Cillo U, Burra P. Functional and morphological graft monitoring after liver transplantation. *Clin Chim Acta.* 2001;310(1):17-23.
26. Oellerich M, Schütz E, Kanzow P, Schmitz J, Beck J, Kollmar O, et al. Use of graft-derived cell-free DNA as an organ integrity biomarker to reexamine effective tacrolimus trough concentrations after liver transplantation. *Ther Drug Monit.* 2014;36(2):136-40.
27. Rodríguez-Perálvarez M, Germani G, Papastergiou V, Tsochatzis E, Thalassinou E, Luong TV, et al. Early tacrolimus exposure after liver transplantation: relationship with moderate/severe acute rejection and long-term outcome. *J Hepatol.* 2013;58(2):262-70.
28. Gielis EM, Ledeganck KJ, De Winter BY, Del Favero J, Bosmans JL, Claas FH, et al. Cell-Free DNA: An Upcoming Biomarker in Transplantation. *Am J Transplant.* 2015;15(10):2541-51.
29. Oellerich M, Walson PD, Beck J, Schmitz J, Kollmar O, Schütz E. Graft-Derived Cell-Free DNA as a Marker of Transplant Graft Injury. *Ther Drug Monit.* 2016;38 Suppl 1:S75-9.
30. Gordon PM, Khan A, Sajid U, Chang N, Suresh V, Dimnik L, et al. An Algorithm Measuring Donor Cell-Free DNA in Plasma of Cellular and Solid Organ Transplant Recipients That Does Not Require Donor or Recipient Genotyping. *Front Cardiovasc Med.* 2016;3:33.
31. Thomas L. Labor & Diagnose 2020: Thomas, L.; 2020 [updated 05/2022; cited 2022 27.09.]. Release 3:[Available from: <https://www.labor-und-diagnose-2020.de/>].
32. Schutz E, Fischer A, Beck J, Harden M, Koch M, Wuensch T, et al. Graft-derived cell-free DNA, a noninvasive early rejection and graft damage marker in liver transplantation: A prospective, observational, multicenter cohort study. *PLoS Med.* 2017;14(4):e1002286.
33. Amitrano L, Guardascione MA, Brancaccio V, Balzano A. Coagulation disorders in liver disease. *Semin Liver Dis.* 2002;22(1):83-96.
34. G. H. Innere Medizin. Herold G, editor 2016.
35. Bhat M, Al-Busafi S, Deschênes M, Ghali P. Care of the liver transplant patient. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2014;28(4):213-9.
36. Craig EV, Heller MT. Complications of liver transplant. *Abdom Radiol (NY).* 2021;46(1):43-67.

37. Angelico R, Sensi B, Manzia TM, Tisone G, Grassi G, Signorello A, et al. Chronic rejection after liver transplantation: Opening the Pandora's box. *World J Gastroenterol*. 2021;27(45):7771-83.
38. De Vlaminck I, Valantine HA, Snyder TM, Strehl C, Cohen G, Luikart H, et al. Circulating cell-free DNA enables noninvasive diagnosis of heart transplant rejection. *Sci Transl Med*. 2014;6(241):241ra77.
39. Snyder TM, Khush KK, Valantine HA, Quake SR. Universal noninvasive detection of solid organ transplant rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(15):6229-34.
40. Grskovic M, Hiller DJ, Eubank LA, Sninsky JJ, Christopherson C, Collins JP, et al. Validation of a Clinical-Grade Assay to Measure Donor-Derived Cell-Free DNA in Solid Organ Transplant Recipients. *J Mol Diagn*. 2016;18(6):890-902.
41. Beck J, Bierau S, Balzer S, Andag R, Kanzow P, Schmitz J, et al. Digital droplet PCR for rapid quantification of donor DNA in the circulation of transplant recipients as a potential universal biomarker of graft injury. *Clin Chem*. 2013;59(12):1732-41.
42. Beck J, Oellerich M, Schulz U, Schauerte V, Reinhard L, Fuchs U, et al. Donor-Derived Cell-Free DNA Is a Novel Universal Biomarker for Allograft Rejection in Solid Organ Transplantation. *Transplant Proc*. 2015;47(8):2400-3.
43. Levitsky J, Goldberg D, Smith AR, Mansfield SA, Gillespie BW, Merion RM, et al. Acute Rejection Increases Risk of Graft Failure and Death in Recent Liver Transplant Recipients. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2017;15(4):584-93.e2.
44. Charlton M, Levitsky J, Aqel B, O'Grady J, Hemibach J, Rinella M, et al. International Liver Transplantation Society Consensus Statement on Immunosuppression in Liver Transplant Recipients. *Transplantation*. 2018;102(5):727-43.
45. Schrem H, Barg-Hock H, Strassburg CP, Schwarz A, Klempnauer J. Aftercare for patients with transplanted organs. *Dtsch Arztebl Int*. 2009;106(9):148-56.
46. Londoño MC, Rimola A, O'Grady J, Sanchez-Fueyo A. Immunosuppression minimization vs. complete drug withdrawal in liver transplantation. *J Hepatol*. 2013;59(4):872-9.
47. Hann A, Osei-Bordom DC, Neil DAH, Ronca V, Warner S, Perera M. The Human Immune Response to Cadaveric and Living Donor Liver Allografts. *Front Immunol*. 2020;11:1227.
48. Londoño MC, Danger R, Giral M, Soullillou JP, Sánchez-Fueyo A, Brouard S. A need for biomarkers of operational tolerance in liver and kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2012;12(6):1370-7.
49. Benítez C, Londoño MC, Miquel R, Manzia TM, Abraldes JG, Lozano JJ, et al. Prospective multicenter clinical trial of immunosuppressive drug withdrawal in stable adult liver transplant recipients. *Hepatology*. 2013;58(5):1824-35.
50. Demetris AJ, Murase N, Delaney CP, Woan M, Fung JJ, Starzl TE. The liver allograft, chronic (ductopenic) rejection, and microchimerism: what can they teach us? *Transplant Proc*. 1995;27(1):67-70.
51. Thurairajah PH, Carbone M, Bridgestock H, Thomas P, Hebbar S, Gunson BK, et al. Late acute liver allograft rejection; a study of its natural history and graft survival in the current era. *Transplantation*. 2013;95(7):955-9.
52. Demetris AJ, Bellamy C, Hübscher SG, O'Leary J, Randhawa PS, Feng S, et al. 2016 Comprehensive Update of the Banff Working Group on Liver Allograft Pathology: Introduction of Antibody-Mediated Rejection. *Am J Transplant*. 2016;16(10):2816-35.
53. Gautam M, Cheruvattath R, Balan V. Recurrence of autoimmune liver disease after liver transplantation: a systematic review. *Liver Transpl*. 2006;12(12):1813-24.

54. Saberi B, Hamilton JP, Durand CM, Li Z, Philosophe B, Cameron AM, et al. Utilization of hepatitis C virus RNA-positive donor liver for transplant to hepatitis C virus RNA-negative recipient. *Liver Transpl.* 2018;24(1):140-3.
55. Shaffer AA, Thomas AG, Bowring MG, Van Pilsum Rasmussen SE, Cash A, Kucirka LM, et al. Changes in practice and perception of hepatitis C and liver transplantation: Results of a national survey. *Transpl Infect Dis.* 2018;20(6):e12982.
56. Shaked A, DesMarais MR, Kopetskie H, Feng S, Punch JD, Levitsky J, et al. Outcomes of immunosuppression minimization and withdrawal early after liver transplantation. *Am J Transplant.* 2019;19(5):1397-409.
57. Nicolas CT, Hickey RD, Chen HS, Mao SA, Lopera Higueta M, Wang Y, et al. Concise Review: Liver Regenerative Medicine: From Hepatocyte Transplantation to Bioartificial Livers and Bioengineered Grafts. *Stem Cells.* 2017;35(1):42-50.
58. Oellerich M, Christenson RH, Beck J, Schütz E, Sherwood K, Price CP, et al. Donor-Derived Cell-Free DNA Testing in Solid Organ Transplantation: A Value Proposition. *J Appl Lab Med.* 2020;5(5):993-1004.
59. Knight SR, Thorne A, Lo Faro ML. Donor-specific Cell-free DNA as a Biomarker in Solid Organ Transplantation. A Systematic Review. *Transplantation.* 2019;103(2):273-83.
60. de Miranda FS, Barauna VG, Dos Santos L, Costa G, Vassallo PF, Campos LCG. Properties and Application of Cell-Free DNA as a Clinical Biomarker. *Int J Mol Sci.* 2021;22(17).
61. Ranucci R. Cell-Free DNA: Applications in Different Diseases. *Methods Mol Biol.* 2019;1909:3-12.
62. Campos CDM, Jackson JM, Witek MA, Soper SA. Molecular Profiling of Liquid Biopsy Samples for Precision Medicine. *Cancer J.* 2018;24(2):93-103.
63. Oellerich M, Sherwood K, Keown P, Schütz E, Beck J, Stegbauer J, et al. Liquid biopsies: donor-derived cell-free DNA for the detection of kidney allograft injury. *Nat Rev Nephrol.* 2021;17(9):591-603.
64. Szilágyi M, Pös O, Márton É, Buglyó G, Soltész B, Keserű J, et al. Circulating Cell-Free Nucleic Acids: Main Characteristics and Clinical Application. *Int J Mol Sci.* 2020;21(18).
65. Zou J, Duffy B, Slade M, Young AL, Steward N, Hachem R, et al. Rapid detection of donor cell free DNA in lung transplant recipients with rejections using donor-recipient HLA mismatch. *Hum Immunol.* 2017;78(4):342-9.
66. Puliyananda DP, Swinford R, Pizzo H, Garrison J, De Golovine AM, Jordan SC. Donor-derived cell-free DNA (dd-cfDNA) for detection of allograft rejection in pediatric kidney transplants. *Pediatr Transplant.* 2021;25(2):e13850.
67. Devonshire AS, Whale AS, Gutteridge A, Jones G, Cowen S, Foy CA, et al. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. *Anal Bioanal Chem.* 2014;406(26):6499-512.
68. Häuser F, Mittler J, Hantal MS, Greulich L, Hermanns M, Shrestha A, et al. One fits all: a highly sensitive combined ddPCR/pyrosequencing system for the quantification of microchimerism after hematopoietic and solid organ transplantation. *Clin Chem Lab Med.* 2023.
69. García Moreira V, Prieto García B, Baltar Martín JM, Ortega Suárez F, Alvarez FV. Cell-free DNA as a noninvasive acute rejection marker in renal transplantation. *Clin Chem.* 2009;55(11):1958-66.
70. Bloom RD, Bromberg JS, Poggio ED, Bunnapradist S, Langone AJ, Sood P, et al. Cell-Free DNA and Active Rejection in Kidney Allografts. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(7):2221-32.

71. Lee H, Park YM, We YM, Han DJ, Seo JW, Moon H, et al. Evaluation of Digital PCR as a Technique for Monitoring Acute Rejection in Kidney Transplantation. *Genomics Inform.* 2017;15(1):2-10.
72. Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, Gallichotte EN, Ruf IK, Hindson BJ, et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat Methods.* 2013;10(10):1003-5.
73. BIO-RAD. Droplet Digital PCR Applications Guide.
74. Mayo O. A century of Hardy-Weinberg equilibrium. *Twin Res Hum Genet.* 2008;11(3):249-56.
75. Wiegand J, Berg T. The etiology, diagnosis and prevention of liver cirrhosis: part 1 of a series on liver cirrhosis. *Dtsch Arztebl Int.* 2013;110(6):85-91.
76. Hallbach J. *Klinische Chemie und Hämatologie - Biomedizinische Analytik für MTLA und Studium.* 4. Auflage ed: Thieme; 2019 02/2019. 528 p.
77. Chang JC. TTP-like syndrome: novel concept and molecular pathogenesis of endotheliopathy-associated vascular microthrombotic disease. *Thromb J.* 2018;16:20.
78. [Practice guideline autoimmune liver diseases - AWMF-Reg. No. 021-27]. *Z Gastroenterol.* 2017;55(11):1135-226.
79. Holstege A. [Elevated liver enzymes]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2016;141(22):1640-6.
80. KDIGO. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease 2012 [updated Januar 2013. Volume 3: [Available from: https://kdigo.org/wp-content/uploads/2017/02/KDIGO_2012_CKD_GL.pdf.
81. Beck J, Oellerich M, Schütz E. A Universal Droplet Digital PCR Approach for Monitoring of Graft Health After Transplantation Using a Preselected SNP Set. *Methods Mol Biol.* 2018;1768:335-48.

12 Anhang

Tabelle 19 - Anhang 1: Referenzbereiche der ausgewerteten Laborparameter

Parameter	Referenzbereich	Einheit
ADAMTS-13	<50	%
Albumin	35-50	g/l
Bilirubin (gesamt)	0,2-1,2	mg/dl
Bilirubin (direkt)	<0,5	mg/dl
Cholinesterase	4,4-10,9	kU/l
Creatin-Kinase	30-200	U/l
eGFR nach CKD-EPI	68-108	ml/min/1,73qm
Cholesterin (gesamt)	<200	mg/dl
Kreatinin	0,7-1,3	mg/dl
CRP	<5	mg/l
D-Dimer	<0,5	mg/l FEU
Gerinnungsfaktor V	60-140	%
Ferritin	20-275	ng/ml
γ-GT	12-64	U/l
GLDH	<7	U/l
GOT	5-35	U/l
GPT	<50	U/l
Hb	13,5-17,5	g/dl
IgG	5,4-18,2	g/l
IgM	0,2-2,4	g/l
INR	Indikations-abhängig	-
PCT	<0,5	ng/ml
Quick	70-130	%
sIL2R	1,9-13,1	ng/ml
Thrombozyten	150-360	/nl

Tabelle 20 - Anhang 2: rs-Identifizier der genotypisierten SNPs und Nummerierung in der Untersuchung

SNP-Nummer	rs-Identifizier des SNPs
1	rs3909244
2	rs2312356
3	rs2523860
4	rs942571
5	rs4632826
6	rs8092926
7	rs6436409
8	rs13317873
9	rs10734083
10	rs13333451
11	rs989309
12	rs741384
13	rs2766535
14	rs10164176
15	rs1522662
16	rs150079
17	rs954783
18	rs12550832
19	rs12064796
20	rs7171
21	rs35736520
22	rs7072759
23	rs1265094
24	rs13185616
25	rs2072042
26	rs10228737
27	rs251022
28	rs3822607
29	rs11610836
30	rs18883284

Tabelle 21 - Anhang 3: Laborwerte von Patient 10 32-93 Tage nach Tx
 In der Tabelle nicht aufgeführte Parameter wurden für den betreffenden Zeitraum nicht bestimmt

	Tag 32	Tag 36	Tag 43	Tag 67	Tag 71	Tag 85	Tag 93
GcfDNA-Anteil	2%	5,67%		15,63%		27,8%	
Gesamt-Bilirubin	0,65	0,67	0,52	0,41	0,34	0,47	0,92
CKD			50	62	68	63	54
Gesamt-Cholesterin	180	202	217	213		281	280
Kreatinin	1,16	1,24	1,51	1,26	1,17	1,24	1,41
CRP	4,2	29	4,1	3,9	3,5	2,3	2,8
γGT	203	181	190	403	477	830	1387
GOT	25	34	31	32	53	40	293
GPT	29	25	35	61	103	169	581
Hb	11	10,5	10,7	11,4	11,9	12,9	12,4
INR	1	1	1	1	1	0,9	1
Quick	96	95	105	104	108	112	108
Thrombozyten	544	462	554	433	472	412	378

13 Danksagung

14 Lebenslauf