

Aus dem Institut für Klinische Chemie  
(ehemaliger Direktor: Professor Dr. med. Dr. h.c. Michael Oellerich)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# **Zirkulierende zellfreie Transplantat- DNA zur Früherkennung einer Abstoßung in der Lebertransplantation**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Anna Fischer (geb. Blum)**

aus

Orenburg, Russland

Göttingen 2019

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referent/in	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Oellerich
Ko-Referent/in:	PD Dr. med. T. Lorf

Datum der mündlichen Prüfung: 18.02.2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Zirkulierende zellfreie Transplantat-DNA zur Früherkennung einer Abstoßung in der Lebertransplantation" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Anfänge und Entwicklung der Lebertransplantation .....	1
1.2 Derzeitige Situation des Organmangels.....	1
1.3 Mögliche Komplikationen nach Lebertransplantation.....	2
1.4 Immunsuppressive Therapie nach Lebertransplantation.....	3
1.5 Extra- und intrazelluläre Medikamentenspiegelmessungen.....	4
1.6 Konventionelle Leberfunktionstests .....	5
1.6.1 Laborchemische Parameter .....	5
1.7 Zellfreie Nukleinsäuren als Biomarker in der medizinischen Diagnostik.....	7
1.8 Notwendigkeit von neuen Biomarkern in der Therapie nach Lebertransplantation.....	7
1.9 Zellfreie Transplantat-DNA als potenzieller Biomarker für eine Organschädigung nach Lebertransplantation .....	9
<b>2 Fragestellung und Ziel.....</b>	<b>10</b>
<b>3 Patienten, Material und Methoden.....</b>	<b>11</b>
3.1 Patienten .....	11
3.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien .....	11
3.1.2 Ethikkommission.....	11
3.1.3 Studiendesign.....	11
3.1.4 Studienablauf .....	12
3.1.5 Kategorisierung der Blutproben für die Bestimmung der GcfDNA.....	13
3.2 Material .....	15
3.3 Methoden.....	16
3.3.1 Vorbereitung der Proben.....	17
3.3.2 Unselektierte Amplifikation der zellfreien DNA .....	18
3.3.3 Identifizierung homozygoter SNPs im Empfänger.....	18
3.3.4 Droplet digital PCR.....	18
3.3.5 Statistische Auswertung .....	20
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>21</b>
4.1 Demographische Daten .....	21
4.1.1 Art der Transplantation.....	22
4.1.2 Angaben zum Spenderorgan.....	22
4.1.3 Ischämiezeit des Spenderorgans .....	22

---

4.1.4	MELD-Score bei Transplantation.....	22
4.1.5	Indikationen zur Lebertransplantation .....	23
4.2	Immunsuppressive Therapie nach Lebertransplantation.....	25
4.3	GcfDNA in der frühen postoperativen Phase nach Lebertransplantation.....	26
4.4	GcfDNA im Langzeitverlauf bei Patienten nach Lebertransplantation.....	27
4.4.1	Stabile Transplantatfunktion .....	27
4.4.2	Patienten mit Hepatitis-C-Virusinfektion .....	27
4.4.3	Patienten mit einer biopsiesicheren zellulären Abstoßung .....	27
4.5	GcfDNA-Werte bei Patienten mit Komplikationen .....	30
4.5.1	Patient mit einem Wundabszess .....	30
4.5.2	Patienten mit Cholangitis.....	31
4.5.3	Patient mit einer Sepsis .....	32
4.5.4	Patient mit einer portalen hepatischen Entzündung.....	32
4.5.5	Patient mit einem hepatozellulären Karzinom.....	33
4.5.6	Patient mit Cholestase, Abstoßungsreaktion unter Steroiden und Transplantatversagen im Verlauf.....	34
4.6	Beurteilung der GcfDNA in der ROC-Analyse.....	35
4.7	Beurteilung der GcfDNA in einer multivariablen logistischen Regression.....	36
4.8	GcfDNA-Messungen und konventionelle Leberfunktionstests im Vergleich.....	37
4.8.1	Leberwerte im Langzeitverlauf nach einer Lebertransplantation.....	37
4.8.2	AUC-Berechnungen zwischen stabiler Transplantatfunktion und Messungen während einer akuten Abstoßung .....	40
4.8.3	AUC-Berechnungen zwischen Patienten mit einer akuten Abstoßung und HCV+- Patienten .....	41
4.8.4	Korrelationen zwischen der GcfDNA und den konventionellen Leberfunktionstests.....	42
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>43</b>
5.1	Nutzen von neuen Biomarkern in der Diagnostik nach Lebertransplantation.....	43
5.2	Zusammenfassung der Hauptergebnisse.....	44
5.3	Diskussion der Ergebnisse.....	44
5.4	Diskussion der Methode .....	45
5.5	Praktische Einschränkungen .....	46
5.6	Schlussfolgerung.....	47
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>49</b>
7.1	Informations- und Einwilligungsbogen für die durchgeführte Studie.....	49
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>55</b>

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Kategorisierung der Proben.....	13
Abbildung 2: Ablauf der Selektion der informativen Assays.....	17
Abbildung 3: Zeitlicher Verlauf der GcfDNA innerhalb des Beobachtungszeitraumes bei Patienten ohne Abstoßung, Infektionen oder Interventionen.....	26
Abbildung 4: GcfDNA-Werte im ersten Jahr nach LTx .....	29
Abbildung 5: ROC-Kurve bei GcfDNA-Messungen von Patienten mit stabiler Transplantatfunktion und Messungen von Patienten mit einer histologisch gesicherten Abstoßung.....	35
Abbildung 6: Plasma-AST-Messungen, die im ersten Jahr nach LTx erfolgten.....	37
Abbildung 7: Plasma-ALT-Messungen, die im ersten Jahr nach LTx erfolgten .....	38
Abbildung 8: $\gamma$ -GT-Messungen, die im ersten Jahr nach LTx erfolgten .....	38
Abbildung 9: Bilirubin-Messungen, die im ersten Jahr nach LTx erfolgten .....	39

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Referenzbereiche für chemische Laborparameter in der Leberdiagnostik .....	6
Tabelle 2: Zeiträume der BMBF-Visiten mit Blutentnahmen nach Lebertransplantation .....	12
Tabelle 3: Zentrifugationsschritte zur Isolierung der zellfreien DNA .....	18
Tabelle 4: Indikation zur Lebertransplantation .....	23
Tabelle 5: Zielspiegel von Tacrolimus bei komplikationslosem Verlauf .....	25
Tabelle 6: GcfDNA-Werte und laborchemische Leberparameter bei einem Patienten mit einem Wundabszess als Komplikation .....	30
Tabelle 7: GcfDNA-Werte und laborchemische Leberparameter bei einem Patienten mit Cholangitis als Komplikation .....	31
Tabelle 8: GcfDNA-Werte und laborchemische Leberparameter bei einem weiteren Patienten mit Cholangitis als Komplikation .....	31
Tabelle 9: GcfDNA-Werte und laborchemische Leberparameter bei einem Patienten mit einer Sepsis als Komplikation .....	32
Tabelle 10: GcfDNA-Werte und laborchemische Leberparameter bei einem Patienten mit einer portalen hepatischen Entzündung als Komplikation .....	32
Tabelle 11: GcfDNA-Werte und laborchemische Leberparameter bei einem Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom als Komplikation .....	33
Tabelle 12: GcfDNA-Werte und laborchemische Leberparameter bei einem Patienten mit Cholestase, Abstoßungsreaktion unter Steroiden und Transplantatversagen im Verlauf .....	34
Tabelle 13: Multivariable logistische Regression für GcfDNA-Messungen und konventionelle Leberfunktionstests .....	36
Tabelle 14: Diagnostische Genauigkeit der GcfDNA im Vergleich zu Leberenzymen und Bilirubin .....	40
Tabelle 15: Korrelationen zwischen der GcfDNA und den chemischen Leberwerten .....	42

**Abkürzungsverzeichnis**

ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
AUC	<i>area under the curve</i>
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BMI	Body Mass Index
CI	<i>confidence interval</i>
CsA	Cyclosporin A
ddPCR	<i>droplet digital polymerase chain reaction</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
ERCP	endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
GcfDNA	<i>graft-derived cell-free DNA</i>
GLDH	Glutamatdehydrogenase
HCC	<i>hepatocellular carcinoma</i>
HCV+	Hepatitis-C-Virusinfektion
IMPH	Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase
KIZ	kalte Ischämiezeit
LTx	Lebertransplantation
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
ROC	<i>receiver operating characteristic</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
TDM	<i>therapeutic drug monitoring</i>
TPG	Transplantationsgesetz
$\gamma$ GT	$\gamma$ -Glytamyl-Transferase

## **1 Einleitung**

### **1.1 Anfänge und Entwicklung der Lebertransplantation**

In Deutschland wird heute an etwa 50 Transplantationszentren Transplantationschirurgie betrieben. Die erste erfolgreiche Lebertransplantation am Menschen wurde von Starzl et al. im Jahre 1963 an einem drei Jahre alten Kind mit angeborener Gallengangsatresie durchgeführt (Starzl et al. 1963). Durch die klinische Anwendung des Immunsuppressivums Cyclosporin A (CsA), einem Calcineurin-Inhibitor (CNI), wurde bei den transplantierten Patienten die immunsuppressive Therapie verbessert und ein weiterer Schritt in der Transplantationsmedizin vollzogen (Calne et al. 1979). Im Jahre 1983 erging dann aus der „Consensus Development Conference“ die Aussage, dass die Lebertransplantation eine aussichtsreiche Alternative zur konventionellen Therapie schwerer Lebererkrankungen in der Endphase darstelle (The National Institutes of Health 1983). Weitere chirurgische Meilensteine folgten 1988 durch den Transplantationsmediziner Rudolf Pichlmayr an der Medizinischen Hochschule Hannover. Dabei wurde ein Spenderorgan in zwei Empfänger, einen Erwachsenen und ein Kind, verpflanzt (Pichlmayr et al. 1988). Kurze Zeit später erfolgte die Split-Lebertransplantation von einem Lebendspender (Raia et al. 1989). Durch die chirurgischen Entwicklungen und Erkenntnisse in der medikamentösen Behandlung der Transplantatabstoßung hat sich die Lebertransplantation als anerkanntes Verfahren bei vielen Erkrankungen der Leber etabliert. Im Jahr 2017 wurde laut dem Jahresbericht der Deutschen Stiftung für Organspende (DSO) bei 823 Patienten eine Lebertransplantation durchgeführt. Davon sind 61 Transplantationen von Lebendspendern sowie weitere zwei Transplantationen nach einer Dominospende durchgeführt worden. Im Verhältnis dazu sind in Deutschland im Jahr 2017 insgesamt 1.367 Anmeldungen für die aktive Warteliste erfolgt.

### **1.2 Derzeitige Situation des Organmangels**

Im Jahr 2017 ist die Anzahl der postmortalen Spenderorgane weiter auf 2594 gesunken und hat damit den niedrigsten Stand der Organspenden seit 20 Jahren erreicht (DSO-Jahresbericht 2017). Die Transplantation von postmortalen Organen setzt die Bereitschaft voraus, nach dem Tode Organe zu spenden. Die Lebendspende ist unter anderem nur dann möglich, wenn zu dem Zeitpunkt kein Organ eines postmortalen Spenders zur

Verfügung steht (§ 8 Transplantationsgesetz (TPG)). Um als postmortalen Spender in Frage zu kommen, setzt dies den persönlichen oder mutmaßlichen Willen voraus (§ 3,4 TPG). Darüber hinaus muss der endgültige Zustand und ein nicht behebbarer Ausfall der Gesamtfunktion des Großhirns, des Kleinhirns und des Hirnstamms eingetroffen sein (§ 16 TPG). Die Feststellung des irreversiblen Hirnfunktionsausfalls wird nach dem Stand der Erkenntnisse der Wissenschaft in Richtlinien festgelegt (Richtlinie für die Regeln zur Feststellung des Todes 2015).

In der Bundesrepublik Deutschland versterben etwa 25% der Patienten im ersten Jahr nach Lebertransplantation (LTx), wohingegen beispielsweise in den USA die Einjahresüberlebensrate mit ca. 90% wesentlich höher liegt. Unter diesen Gesichtspunkten ist die derzeitige Spendersituation und die Organallokation zu diskutieren (Seehofer et al. 2013).

### **1.3 Mögliche Komplikationen nach Lebertransplantation**

Neben der Herausforderung der derzeitigen Situation des Organmangels ist eine weitere wichtige Aufgabe, dass das transplantierte Organ seine Funktion lange erfüllt. Dabei spielt die immunsuppressive Therapie eine wesentliche Rolle. Es ist ein schmaler Grat zwischen der individuellen Dosis, die einerseits das Immunsystem des Empfängers hemmt und die Transplantatabstoßung umgeht, und auf der anderen Seite die Nebenwirkungen minimiert, welche beim Patienten zu vielfältigen Komplikationen führen können. Besonders im ersten Jahr nach einer Lebertransplantation stellen die Infektionen bei etwa 50% der Organempfänger die höchste Komplikationsrate dar. Damit gehören Infektionen zu den häufigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität (Blair und Kusne 2015). Eine weitere Komplikation stellt die Transplantatabstoßung durch das Immunsystem des Empfängers dar. Diese kann man vereinfacht in drei Gruppen unterteilen: Hyperakute Abstoßung, akute zelluläre Abstoßung und die chronische Transplantatabstoßung. Am häufigsten ist die akute zelluläre Abstoßung. Diese tritt häufig in den ersten Wochen nach einer Lebertransplantation auf (Wiesner et al. 1998). Histologisch zeigen sich die Merkmale einer portalen Entzündung, Endothelschädigung und Gallengangsveränderung. Die Einteilung erfolgt nach dem Banff-Schema (Banff schema for grading liver allograft rejection: An international consensus document 1997). Dieses Schema bewertet die Aktivität der Rejektion sowie deren Ausmaß auf das Lebergewebe. Die Therapie einer Abstoßungsreaktion besteht in der Optimierung oder Erhöhung der immunsuppressiven Therapie.

## 1.4 Immunsuppressive Therapie nach Lebertransplantation

Die Immunpharmakologie bietet mittlerweile viele Ansätze, um das Transplantat vor dem Immunsystem des Empfängers zu schützen. Besonders in der frühen postoperativen Phase kommen Antikörper wie z. B. Basiliximab zur Anwendung (Turner und Knechtle 2013). Auch Steroide haben in der Anfangsphase sowie bei der Behandlung akuter Abstoßungen einen hohen Stellenwert. Die Mycophenolsäure (MPA) wirkt unter anderem als Antimetabolit und inhibiert das Enzym Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPH). Da die IMPH von Typ II effektiver gehemmt wird als von Typ I und das Erstgenannte in aktivierten Lymphozyten exprimiert wird, erklärt sich die erhöhte Wirkung auf die Lymphozyten im Gegensatz zu anderen Zellen im Körper (Allison und Eugui 2000). Weitere Immunsuppressiva sind mTOR (engl. *mechanistic target of rapamycin*)-Inhibitoren wie Everolimus und Sirolimus. Diese stellen eine weitere, neuere Option in der Behandlung von lebertransplantierten Patienten dar (Ganschow et al. 2014). Einen besonderen Stellenwert in der Therapie nach Transplantationen haben Calcineurin-Inhibitoren wie Cyclosporin A (CsA) oder Tacrolimus (FK506). Diese hemmen die Calcineurinphosphatase, indem sie sich an die zytosolischen Rezeptoren der T-Helferzellen binden. Dabei bildet CsA einen Komplex mit Cyclophilin. Tacrolimus geht eine Interaktion mit *FK-binding protein* ein. Da Calcineurin ein wichtiges Zwischenglied ist und die Aktivierung von *Nuclear factor of activated T-cell* (N-FAT, ein Transkriptionsfaktor) bewirkt, der die Induktion von spezifischen Zytokinen zur Folge hat, ist es einer der möglichen Angriffspunkte der Immunsuppressiva. Dabei setzen die Zytokine wie Interleukin 2 (IL-2), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) die weitere Kaskade in Gang (Clipstone und Crabtree 1992; Halloran 1996). Einige der unerwünschten Arzneimittelnebenwirkungen sind Faktoren, die eine chronische Transplantatdysfunktion beeinflussen können oder das kardiovaskuläre Risiko erhöhen können (Vassalli et al. 1996; Krämer et al. 2003).

Der Einsatz dieser und anderer Immunsuppressiva hat in der Transplantationschirurgie das Ziel, das Immunsystem des Patienten so zu modulieren, dass das transplantierte Spenderorgan seine Funktion beibehält und nicht abgestoßen wird. Die Herausforderung besteht darin, jedem Patienten eine individuelle Therapie zukommen zu lassen, die ohne erhöhtes Risiko der Transplantatabstoßung sowie möglichst arm an Nebenwirkungen ist.

## 1.5 Extra- und intrazelluläre Medikamentenspiegelmessungen

Für die meisten immunsuppressiv wirkenden Medikamente haben sich Medikamentenspiegelbestimmungen (TDM, engl. *therapeutic drug monitoring*) im klinischen Gebrauch etabliert (Streit et al. 2002). Die Medikamentenspiegel, die im Vollblut bestimmt werden, können helfen, eine Überdosierung des Medikaments zu erkennen. Auch das reduzierte Auftreten akuter Abstoßungen wird mit dem TDM assoziiert (Kershner und Fitzsimmons 1996; Armstrong und Oellerich 2001). Da sich die Wirkung der Immunsuppressiva intrazellulär abspielt, stellt diese Methode nur teilweise eine Aussage über den Wirkungsumfang dar (Noceti et al. 2014; Lemaitre et al. 2015). In den Messungen der intrazellulären Medikamentenspiegel wird dieser Aspekt berücksichtigt und als vorteilhaft gegenüber Messmethoden im Vollblut beschrieben. Unter anderem weisen Patienten verschiedene Genotypen auf, die für die Expression und Aktivität des P-Glykoproteins 1 verantwortlich sind. Dieser Efflux-Transporter (MDR1, engl. *multidrug resistance protein 1*) bewirkt bei hoher Expression bzw. Aktivität niedrigere und bei niedrigerer Ausprägung erhöhte intrazelluläre Cyclosporin-A-Medikamentenspiegel (Crettol et al. 2008). Auch für die intrazelluläre Tacrolimuskonzentration spielen Polymorphismen in den Genen eine wichtige Rolle (Elens 2007; Dessilly 2014). Bei Everolimus sowie Sirolimus ist die biologische Information eines Individuums für die immunsuppressive Therapie von Bedeutung. Bei mTOR-Inhibitoren scheint der Phosphorylierungsstatus der Kinase p70S6 für die Wirkung der Medikamente eine Rolle zu spielen (Hartmann et al. 2005; Hoerning et al. 2015). Es spricht vieles dafür, dass die intrazellulären Bestimmungen der Immunsuppressivspiegel, die am Ort ihrer Wirkung gemessen werden, besser die individuellen Unterschiede des Patienten berücksichtigen als die Vollblutbestimmung.

## 1.6 Konventionelle Leberfunktionstests

### 1.6.1 Laborchemische Parameter

Bei der Diagnostik der Leberfunktion sowie auch nach Lebertransplantation sind wegen der Komplexität kombinierte laborchemische Untersuchungen unabdingbar. Zu den statistischen Leberfunktionstests gehören unter anderem die Transaminasen ALT (Alanin-Aminotransferase) und AST (Aspartat-Aminotransferase). Weitere Parameter sind GLDH (Glutamatdehydrogenase), Bilirubin, AP (alkalische Phosphatase) und  $\gamma$ -GT ( $\gamma$ -Glutamyltransferase). Als Syntheseparameter der Leber können auch Albumin, Gerinnungsfaktoren sowie die Cholinesterase ermittelt werden. Über die Transaminasen (ALT und AST), GLDH, Bilirubin und die  $\gamma$ -GT folgt ein kurzer Überblick. Die jeweiligen Referenzbereiche sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

#### 1.6.1.1 Die Transaminasen

Die Alanin-Aminotransferase (ALT), auch als Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) bezeichnet, ist eine Transaminase, die im Zytoplasma der Hepatozyten lokalisiert ist (Engelmann 2017). Diese katalysiert die Reaktion von L-Alanin + Alpha-Ketoglutarat zu Pyruvat + L-Glutamat (Bruhn und Koberstein 2011). Die Aspartat-Aminotransferase (AST), auch als Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) bezeichnet, kommt im Zytoplasma und in den Mitochondrien der Hepatozyten, aber auch in Herzmuskelzellen und Skelettmuskelzellen sowie in den Zellen der Niere, dem Gehirn, der Lunge, der Bauchspeicheldrüse, den Erythrozyten und Leukozyten vor (Pratt und Kaplan 2000). Diese katalysiert die Reaktion von Aspartat +  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Oxalacetat + Glutamat im Malat-Aspartat-Shuttle (Bruhn und Koberstein 2011).

#### 1.6.1.2 Die Glutamatdehydrogenase

Die Glutamatdehydrogenase (GLDH) katalysiert die Reaktion von 2-Ketoglutarat + NADH +  $\text{NH}_4^+$  zu L-Glutamat +  $\text{NAD}^+$  +  $\text{H}_2\text{O}$ . Die Glutamatdehydrogenase ist in den Mitochondrien der Hepatozyten lokalisiert (Bruhn und Koberstein 2011).

#### 1.6.1.3 Das Bilirubin

Das Bilirubin entsteht beim Abbau von Hämoglobin, das zu ca. 85% aus alten Erythrozyten freigesetzt wird (Derosa und Maffioli 2017). Dabei wird das Häm des Hämoglobins durch die Hämoxigenase in die Zwischenstufe Biliverdin umgewandelt. In einem weiteren Schritt wird das Biliverdin weiter durch die Biliverdinreduktase zu Bilirubin

abgebaut. Das Bilirubin wird im Blutplasma an Albumin gebunden und somit auch als primäres, unkonjugiertes sowie auch als indirektes Bilirubin bezeichnet. In den Hepatozyten wird das Bilirubin an die Glucuronsäure durch die UDP-Glucuronyltransferase gekoppelt und als sekundäres, konjugiertes sowie direktes Bilirubin bezeichnet (Méndez-Sánchez et al. 2017).

#### 1.6.1.4 Die $\gamma$ -Glytanyl-Transferase

Die  $\gamma$ -Glytanyl-Transferase ( $\gamma$ -GT) überträgt die  $\gamma$ -Glutamylgruppe auf das Glycylglycin. Bei der Reaktion entstehen aus  $\gamma$ -Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilid und Glycylglycin das  $\gamma$ -Glutamylglycylglycid und das 5-Amino-2-nitrobenzoat (Bruhn und Koberstein 2011). Die  $\gamma$ -Glytanyl-Transferase ist ein mikrosomales membranständiges Enzym, das in den Hepatozyten und in den Gallengangszellen der Leber lokalisiert ist. Zudem kommt die  $\gamma$ -Glytanyl-Transferase in den Zellen der Niere, des Pankreas und des Darmes vor (Derosa und Maffioli 2017).

Tabelle 1: Referenzbereiche für chemische Laborparameter in der Leberdiagnostik (Bruhn und Koberstein 2011)

Laborparameter	Referenzbereich im Serum/Plasma
ALT	Männer $\leq 50$ IU/l* Frauen $\leq 35$ IU/l*
AST	Männer $\leq 50$ IU/l* Frauen $\leq 35$ IU/l*
GLDH	Männer $\leq 7$ U/l Frauen $\leq 5$ U/l
Bilirubin (gesamt)	Erwachsene $< 1,1$ mg/dl
$\gamma$ -GT	Männer $\leq 60$ IU/l Frauen $\leq 40$ IU/l

\* Nach IFCC (engl. *International Federation of Clinical Chemistry*), mit Pyridoxalphosphat

## 1.7 Zellfreie Nukleinsäuren als Biomarker in der medizinischen Diagnostik

Die erste Beschreibung von freien Nukleinsäuren im Blutplasma erfolgte von Mandel und Métails im Jahre 1948 (Mandel und Métails 1948). Die weitere Entdeckung folgte bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses (Tan et al. 1966). Nach wenigen Jahren wurden zellfreie Nukleinsäuren auch bei gesunden Probanden im Blut nachgewiesen (Kamm und Smith 1972). Im Blut frei zirkulierende Desoxyribonukleinsäure (DNA) konnte auch bei onkologischen Patienten beobachtet werden. Dabei hatten Patienten mit einer malignen Tumorerkrankung höhere Konzentrationen im Blut als gesunde Studienteilnehmer (Leon et al. 1977). Durch die weitere technologische Entwicklung und zahlreiche folgende Studien werden die zellfreien Nukleinsäuren als mögliche Biomarker in vielen Bereichen der Medizin erforscht.

In der Transplantationsmedizin wurden 1998 zellfreie Nukleinsäuren nach Nieren- und Lebertransplantation beschrieben (Lo et al. 1998). Die Bestimmung der GcfDNA (engl. *graft-derived cell-free DNA*) bei Patienten nach Nierentransplantation wurde im Plasma sowie im Urin des Empfängers auf einen möglichen Nutzen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die GcfDNA ein sinnvoller Biomarker zur Beurteilung der Transplantatintegrität sein kann (Beck et al. 2015; Gielis et al. 2015; Bloom et al. 2017). Der etablierte Nierenfunktionstest Creatinin im Plasma hat den Nachteil, dass ein Verlust der Nierenfunktion von 50% möglich ist, bevor es zum Anstieg dieses Parameters kommt (American Society of Nephrology 2015). Bei Patienten nach Herztransplantation erwies sich die zellfreie DNA zur Diagnostik einer akuten Abstoßung ebenfalls als nützlich (Snyder et al. 2011; De Vlamincq et al. 2014; Grskovic et al. 2016). Auch bei Patienten nach Lungentransplantation werden zellfreie Nucleinsäuren beim Monitoring von Infektionen und akuten Abstoßungsreaktionen als eine neue diagnostische Option zu transbronchialen Biopsien beschrieben (De Vlamincq et al. 2015).

## 1.8 Notwendigkeit von neuen Biomarkern in der Therapie nach Lebertransplantation

Der Bedarf an neuen Biomarkern in der Transplantationsmedizin zeigt sich am besten darin, dass Patienten nach Transplantation eines Organs trotz der vorhandenen Biomarker und Medikamentenspiegelbestimmungen von Immunsuppressiva eine Organabstoßung erleiden können (Kim et al. 2016).

Die herkömmlichen nichtinvasiven Methoden zur Beurteilung der Transplantatintegrität sowie zur Erkennung von Abstoßungsreaktionen sind mit Ungenauigkeit und weiteren

Einschränkungen verbunden und somit in ihrer Aussagekraft limitiert (Burton und Rosen 2006). Patienten nach Lebertransplantation bedürfen einer regelmäßigen Überwachung, insbesondere auf Abstoßungsepisoden. Die routinemäßige Bestimmung der konventionellen Leberfunktionstests liefert keine Aussage über das Vorliegen einer akuten zellulären oder antikörpervermittelten Abstoßung (Rodríguez-Perálvarez 2012, 2013). Die Therapie der Abstoßungsreaktion, falls sie erkannt wird, bedarf einer Anpassung oder einer Erweiterung des Therapieregimes mit Immunsuppressiva. Ein klinischer Verdacht auf das Vorliegen einer akuten Abstoßungsreaktion kann derzeit mit einer invasiven Probebiopsie untermauert werden. Die Biopsie stellt aber für den Patienten eine große Belastung dar, zudem sind ihre Sensitivität und Spezifität begrenzt. Die Verwendung von seriellen Biopsien zur Beurteilung der Integrität des Transplantates und zur individualisierten Immunsuppressivatherapie ist im klinischen Setting nur schwer realisierbar. Auch anfallende Bearbeitungszeiten für die Durchführung und Auswertung begrenzen die Nützlichkeit für eine Hilfestellung in einer schnellen Dosisänderung im Rahmen einer individualisierten Immunsuppressivatherapie.

Die therapeutische Medikamentenspiegelbestimmung kann in der Therapie von Immunsuppressiva hilfreich sein, um die Toxizität zu vermindern, ihre Wirksamkeit für einen individuellen Transplantatempfänger kann damit aber noch nicht ausreichend beurteilt werden (Rianthavorn et al. 2004; Crettol et al. 2008; Falck et al. 2008).

Daher werden neue nichtinvasive Biomarker benötigt, die es erlauben, eine Transplantatintegrität zu überwachen, eine Abstoßungsreaktion frühzeitig und sicher zu detektieren und eine individualisierte Immunsuppressivatherapie zu steuern. Zudem sollten diese in der klinischen Routine praktikabel, kosteneffektiv und schnell verfügbar sein. Das eigentliche Ziel eines nützlichen Biomarkers ist die Verbesserung der Langzeitergebnisse von Patienten nach Transplantation durch Vermeidung von Abstoßungsreaktionen auf der einen und die Reduzierung der immunsuppressiven Therapie mit ihren Nebenwirkungen auf der anderen Seite.

## 1.9 Zellfreie Transplantat-DNA als potenzieller Biomarker für eine Organschädigung nach Lebertransplantation

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass der Nachweis von Spender-DNA im Plasma einen Zelltodmarker aus den apoptotischen oder nekrotischen Zellen des Transplantationsorgans darstellt und dadurch als Marker für die Abstoßung nützlich sein kann (Lo et al. 1998). Mittlerweile hat sich die GcfDNA als ein vielversprechender Biomarker zum Nachweis einer Transplantatschädigung erwiesen (Beck et al. 2013b; Gielis et al. 2015; Oellerich et al. 2016b; Schütz et al. 2017). Die GcfDNA-Bestimmung bietet die Möglichkeit einer wiederholten, nichtinvasiven Überwachung des Transplantates im Sinne einer „Flüssigbiopsie“ (Snyder et al. 2011; De Vlamincq et al. 2014; Beck et al. 2015). Die Bestimmung der zellfreien DNA kann durch eine Targeted oder Shotgun-Sequenzierung (Snyder et al. 2011; De Vlamincq 2014, 2015; Grskovic et al. 2016; Bloom et al. 2017) sowie durch die droplet digital Polymerase-Kettenreaktion (ddPCR, engl. *polymerase chain reaction*) erfolgen (Beck et al. 2013a, 2013b; Schütz et al. 2017).

Die Ergebnisse der GcfDNA-Fraktion können als Prozentsatz angegeben werden. Dieser beschreibt das Verhältnis der Transplantat-cfDNA zur Gesamt-cfDNA. Für eine stabile Transplantatfunktion wird für Lebertransplantierte ein GcfDNA-Wert von <10% beschrieben (Beck et al. 2013b; Schütz et al. 2017). Bei Patienten nach Herz oder Nierentransplantation werden niedrigere Werte angegeben (Beck et al. 2013b). Die Bestimmung durch die Shotgun-Sequenzierung hat den Nachteil, dass die Methode zeitaufwändig und zudem mit hohen Kosten verbunden ist. Die Quantifizierung der GcfDNA durch die droplet digital PCR-Methode hat den Vorteil, dass sie schneller und kosteneffektiver ist. Die Ergebnisse sind nach dem ersten Test am selben Tag möglich. Dies ist bei der Fragestellung und der anschließenden Therapie bei z. B. einer akuten Abstoßung von hoher Relevanz. Weitere Methoden, die ebenfalls auf der Verwendung von vorgewählten Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs, engl. *single nucleotide polymorphisms*) basieren und die Hochdurchsatz-Sequenzierung für die Quantifizierung nutzen, werden ebenfalls beschrieben (Hidestrand et al. 2014; Gordon et al. 2016; Grskovic et al. 2016).

## 2 Fragestellung und Ziel

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Messung von im Plasma zirkulierender DNA nach Lebertransplantation. In einer multizentrischen Studie an 115 Patienten und einem Beobachtungszeitraum bis zu einem Jahr nach Lebertransplantation sollte herausgefunden werden, wie die Messungen der zellfreien Nucleinsäuren zum Nutzen des Patienten beitragen können. Es sollte versucht werden, die Bedeutsamkeit der GcfDNA im klinischen Alltag als einen zusätzlichen Parameter bei der Diagnosestellung und Beurteilung einer möglichen Transplantatschädigung und der frühzeitigen Erkennung von Abstoßungsreaktionen einzuordnen und damit eine schnellere Intervention sowie eine adäquate individualisierte Therapie zu ermöglichen.

Es sollen untersucht werden:

- Die Aussagekraft bezüglich des diagnostischen Wertes in der Früherkennung und Differentialdiagnose einer Abstoßungsreaktion nach einer Lebertransplantation.
- Die Bedeutung der zellfreien Nucleinsäuren zur Einschätzung der Integrität des transplantierten Organs in der Verlaufskontrolle.
- Die Aussagekraft der GcfDNA gegenüber den etablierten laborchemischen Leberfunktionstests.

## **3 Patienten, Material und Methoden**

### **3.1 Patienten**

#### **3.1.1 Ein-und Ausschlusskriterien**

In die Studie wurden volljährige sowie einwilligungsfähige Patienten innerhalb der ersten neun Monate nach einer Lebertransplantation eingeschlossen. Voraussetzung dafür waren eine Aufklärung über Sinn und Zweck der Studie sowie das Einverständnis der Patienten in schriftlicher Form (Studienaufklärung und Einwilligungserklärung siehe Anhang). Die Beobachtungsdauer für die Patienten betrug maximal ein Jahr. Es bestand für die Teilnehmer jederzeit die Möglichkeit, die Studie abzubrechen.

#### **3.1.2 Ethikkommission**

Das Studienprotokoll stimmte mit den ethischen Grundsätzen der Deklaration von Helsinki 1975 überein. Die durchgeführte Studie wurde von den Ethikkommissionen an der Universitätsmedizin Göttingen (Antragsnummer: 17/7/12), der Ärztekammer Hamburg (Antragsnummer: PV4125) und der Charité in Berlin (Antragsnummer: EA1/299/12) genehmigt.

#### **3.1.3 Studiendesign**

Bei dieser Studie handelt es sich um eine prospektive, nicht-interventionelle, multizentrische Beobachtungsstudie. Die Studie wird durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF, Förderkennzeichen 01ES1102) unter dem Titel „Personalisierte Immunsuppression nach Organtransplantation: Eine Beobachtungsstudie zum Nutzen und zu therapeutischen Bereichen innovativer Biomarker“ gefördert. Ein Teilaspekt dieser Studie, sowie Inhalt dieser Dissertation, ist die Messung der im Plasma zirkulierenden DNA bei Patienten nach Lebertransplantation. Da es sich um eine multizentrische Studie handelt, wurden die pseudonymisierten Patientendaten aus den Studienorten der Universitätsmedizin Göttingen (Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie), dem Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf (Klinik und Poliklinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie) und der Charité in Berlin (Campus Virchow-Klinikum, Klinik für Allgemein-,Viszeral-und Transplantationschirurgie) ausgewertet.

### 3.1.4 Studienablauf

Die Blutentnahmen im Rahmen der BMBF-Studie erfolgten bei Kontrolluntersuchungen, die auch außerhalb der Studie an den Transplantationszentren stattfanden. Die Studienzeitpunkte mit den Blutentnahmen erfolgten zu vorgegebenen Visiten sowie zusätzlich bei Komplikationen wie z. B. einem Verdacht auf Abstoßung des Transplantates oder bei Infektionen. Zur Messung der GcfDNA wurden von den 115 lebertransplantierten Patienten im Durchschnitt 4,9 Visiten pro Patient durchgeführt. An der Universitätsmedizin Göttingen erfolgten im ersten Monat nach Lebertransplantation zusätzliche Visiten zur Betrachtung der frühen postoperativen Phase. Die initiale Blutentnahme zur Bestimmung der GcfDNA erfolgte 15 Minuten nach Reperfusion des transplantierten Organs. Die zweite Blutentnahme erfolgte nach sechs Stunden. Ab dem ersten postoperativen Tag erfolgte die Blutentnahme in den ersten zwei Wochen einmal täglich. Anschließend erfolgten für den Rest des ersten Monats nach Transplantation die Kontrollen alle drei Tage. Eine Übersicht über den zeitlichen Ablauf der Visiten ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 2: Zeiträume der BMBF-Visiten mit Blutentnahmen nach Lebertransplantation

Visite 1 0-10 Tage	Visite 2 11-30 Tage	Visite 3 1-2 Monate	Visite 4 2-4 Monate	Visite 5 4-8 Monate	Visite 6 8-10 Monate	Visite 7 10-14 Monate
+ weitere Eventabnahmen im Rahmen akuter Komplikationen						

### 3.1.5 Kategorisierung der Blutproben für die Bestimmung der GcfDNA

Es wurden Kriterien festgelegt, die eine Kategorisierung der Proben in drei verschiedene Untergruppen ermöglichen. Eine Kategorie stellen Proben während einer stabilen Periode dar, die eine stabile Transplantatfunktion repräsentieren. Eine weitere Kategorie stellen die Proben während einer histologisch gesicherten zellulären Abstoßung dar. Zusätzlich zu diesen Kategorien wurden die Proben von Patienten mit einer Hepatitis-C-Virus (HCV)-Infektion gesondert betrachtet. Dabei konnten Patienten während des Beobachtungszeitraumes stabile Perioden haben und auch in der Kategorie der „histologisch gesicherten zellulären Abstoßung“ sein (falls die Blutentnahme während einer Abstoßung erfolgte). Patienten mit einer HCV-Infektion (HCV+) blieben über den gesamten Beobachtungszeitraum in dieser Kategorie, vorausgesetzt sie hatten während der Probenentnahme keine histologisch gesicherte zelluläre Abstoßung (wenn bei diesen Patienten die Probenentnahme während einer Abstoßung stattfand, dann erfolgte die Zuordnung zur der Kategorie der histologisch gesicherten zellulären Abstoßung). Einen Überblick soll die nachfolgende Abbildung verdeutlichen.

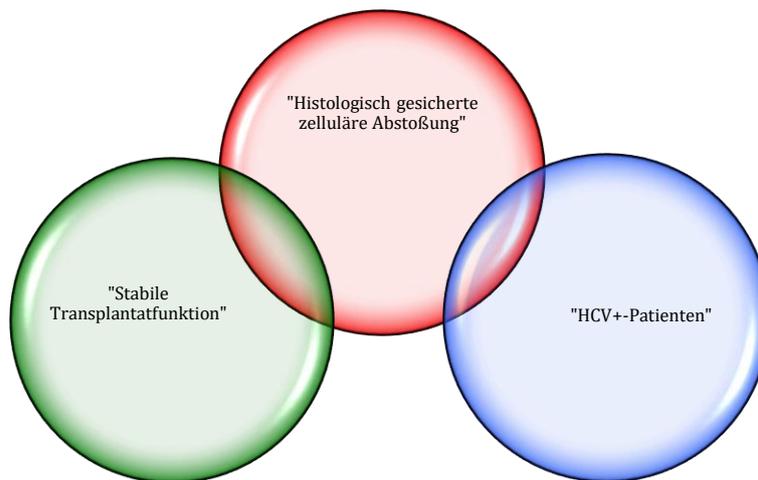


Abbildung 1: Kategorisierung der Proben

### 3.1.5.1 Kategorie „Stabile Transplantatfunktion“

Voraussetzung für die Zuordnung der Proben in diese Kategorie waren eine stabile Transplantatfunktion sowie die Abwesenheit von Komplikationen um den Zeitpunkt der Probenentnahme. Als Ausschlusskriterien wurden definiert:

- Eine dokumentierte Abstoßungsreaktion (im Zeitraum -15/+7 Tage)
- Virale oder bakterielle Infektionen des Spenderorgans (z. B. HCV)
- Invasive Eingriffe, die die Leber betreffen z. B. ERCP (endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie) im Zeitraum -7/+3 Tage
- Laparotomien (im Zeitraum von  $\pm 5$  Tagen)
- Gallenleckagen, Nekrosen, Ischämien sowie Cholestase (im Zeitraum  $\pm 5$  Tage)
- Hepatozelluläre Malignome
- Vakuum-Therapie im Transplantatgebiet
- Sepsis
- Dokumentierte Diagnosen von Hämatomen und Zysten in der Leber
- MARS (engl. *molecular adsorbent recirculating system*)-Verfahren
- Transplantatversagen
- Schwangerschaft
- Nierentransplantation

Der Zeitraum wurde ab dem 14. postoperativen Tag nach Lebertransplantation bis zum Abschluss des Beobachtungszeitraumes festgelegt.

### 3.1.5.2 Kategorie „Histologisch gesicherte zelluläre Abstoßung“

In den Transplantationskliniken erfolgten die Leberbiopsien in einem klinischen Setting. In den Transplantationszentren fand die Beurteilung und Diagnose der zellulären Abstoßung durch den jeweiligen Pathologen statt. Während der Studie waren keine Protokollbiopsien vorgesehen. Da die Leberbiopsien unabhängig von den Blutentnahmen durchgeführt wurden, ist das Zeitintervall für die Blutentnahmen mit GcfDNA-Bestimmung auf sechs Tage vor der positiven Leberbiopsie und einen Tag nach der Leberbiopsie festgelegt worden. Proben in diesem Zeitintervall wurden ausgewertet, wenn in diesem Zeitintervall keine hochdosierte Steroidstoßtherapie erfolgte.

### 3.1.5.3 Kategorie „HCV+ Patienten“

Da es sich bei der Hepatitis C um eine virale Infektion handelt und somit die Kriterien für die Kategorie der stabilen Transplantatfunktion nicht erfüllt sind, wurden die Patienten der Kategorie „HCV+ Patienten“ zugeordnet. Als HCV+ Patienten wurden Studienteilnehmer klassifiziert, wenn diese während des Beobachtungszeitraumes einen positiven Hepatitis-C-Viruslast-PCR Nachweis hatten.

## 3.2 Material

Zur Bestimmung der GcfDNA wurden die Blutentnahmen (ca. 10 ml) bei den Visiten und Events im Rahmen der BMBF-Abnahmen in speziellen Vacutainern® (Cell-Free DNA™ BCT, Streck) entnommen. In diesen Vacutainern® werden die Leukozyten bis zu sieben Tage bei einer Temperatur von 6 ° - 37 ° C stabilisiert (Wong et al. 2013). An der Universitätsmedizin Göttingen wurden alternativ die Blutproben (ca. 2 ml) in S-Monovetten® (Sarstedt) mit Kalium-Ethylendiaminotetraacetat (EDTA) für die Blutentnahmen verwendet. Die Separation des Plasmas erfolgte innerhalb von vier Stunden. Die Bestimmung der Immunsuppressivaspiegel, der Leberenzyme und des Blutbildes erfolgte in den jeweiligen Transplantationszentren unter den dort aktuellen Standards. Dies gilt auch für die Auswertungen der in den jeweiligen Zentren durchgeführten Leberbiopsien.

### 3.3 Methoden

Die Bestimmung der GcfDNA wurde bei Chronix Biomedical in Göttingen mit der dort entwickelten Verfahrensweise durchgeführt (Beck et al. 2013b).

Die Methode macht sich Unterschiede einzelner Basen (Single-Nucleotide-Polymorphisms (SNPs)) zwischen den Genomen des Empfängers und des Spenderorgans zu Nutze. Ein SNP, für den sich in den Genomen von Organ und Empfänger heterologe Allele finden, wird als informativer SNP bezeichnet. Der Empfänger muss dabei einen homozygoten Genotyp aufweisen, während das Organ das jeweils heterologe Allel im homozygoten oder heterozygoten Zustand tragen muss. Die Quantifizierung der organstämmigen zellfreien DNA im Plasma des Empfängers erfolgt durch die Messung der organspezifischen Allele für jeweils vier verschiedene SNPs. Für jede Empfänger-/Spender-Kombination müssen in einem ersten Schritt die informativen SNPs/Allele bestimmt werden, damit diese dann in einer hochsensitiven droplet digitalen PCR (ddPCR) zur Quantifizierung der organstämmigen zellfreien DNA genutzt werden können. Um die Festlegung der informativen SNPs für eine gegebene Empfänger-/Spender-Kombination schnell und effizient durchführen zu können, wurden von Beck et al. zunächst 40 bekannte SNPs aus bestehenden Datenbanken extrahiert sowie anschließend die entsprechenden ddPCR-Assays entwickelt und optimiert. Die 40 SNPs wurden dabei so ausgewählt, dass die beiden Allele in der Bevölkerung möglichst gleich verteilt auftreten, d. h. eine *population minor allele frequency* von ca. 0,5. Damit ergibt sich nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz die in Abbildung 2 dargestellte Verteilung der homozygoten und heterozygoten Genotypen in Spender und Empfänger und eine ausreichend hohe statistische Wahrscheinlichkeit, dass für jede gegebene Empfänger-/Spender-Kombination mindestens zwei informative SNP aus dem vordefinierten Set identifiziert werden können. Der in der nachfolgenden Abbildung dargestellte Ablauf erfolgt nur für die erste Probe eines Patienten. Dabei erfolgt der erste Screening-Schritt in einer Real-Time PCR unter Verwendung der genomischen DNA (gDNA) des Empfängers als Matrize. In diesem Schritt werden alle SNP-Assays ausgeschlossen, für die der Empfänger einen heterozygoten Genotyp besitzt. Im nächsten Assay-Auswahlschritt, bei dem die voramplifizierte zellfreie DNA als Matrize verwendet wird, wird das endgültige informative Assay-Set für den einzelnen Patienten definiert. Dieser Schritt erfolgt mittels ddPCR. Ein informativer Assay weist einen SNP nach, der homozygot im Empfänger und entweder heterozygot oder homozygot im Transplantat, aber heterolog zwischen Empfänger und Transplantat ist. Letztere sind die bevorzugten SNP-Assays für einen Patienten (von denen im Durchschnitt fünf gefunden werden sollten), da die relative Menge des informativen Allels im Vergleich zum heterozygoten

Organgenotyp doppelt so hoch ist. Die Prozentsätze und die Anzahl der Assays, die für jeden Selektionsschritt angegeben sind, ergeben sich aus dem Hardy-Weinberg-Gesetz, sind statistische Mittelwerte und können von Patient zu Patient variieren. Für alle weiteren Proben erfolgt die Bestimmung der einmalig festgelegten informativen Allele direkt in der preamplifizierten zellfreien DNA mittels ddPCR.

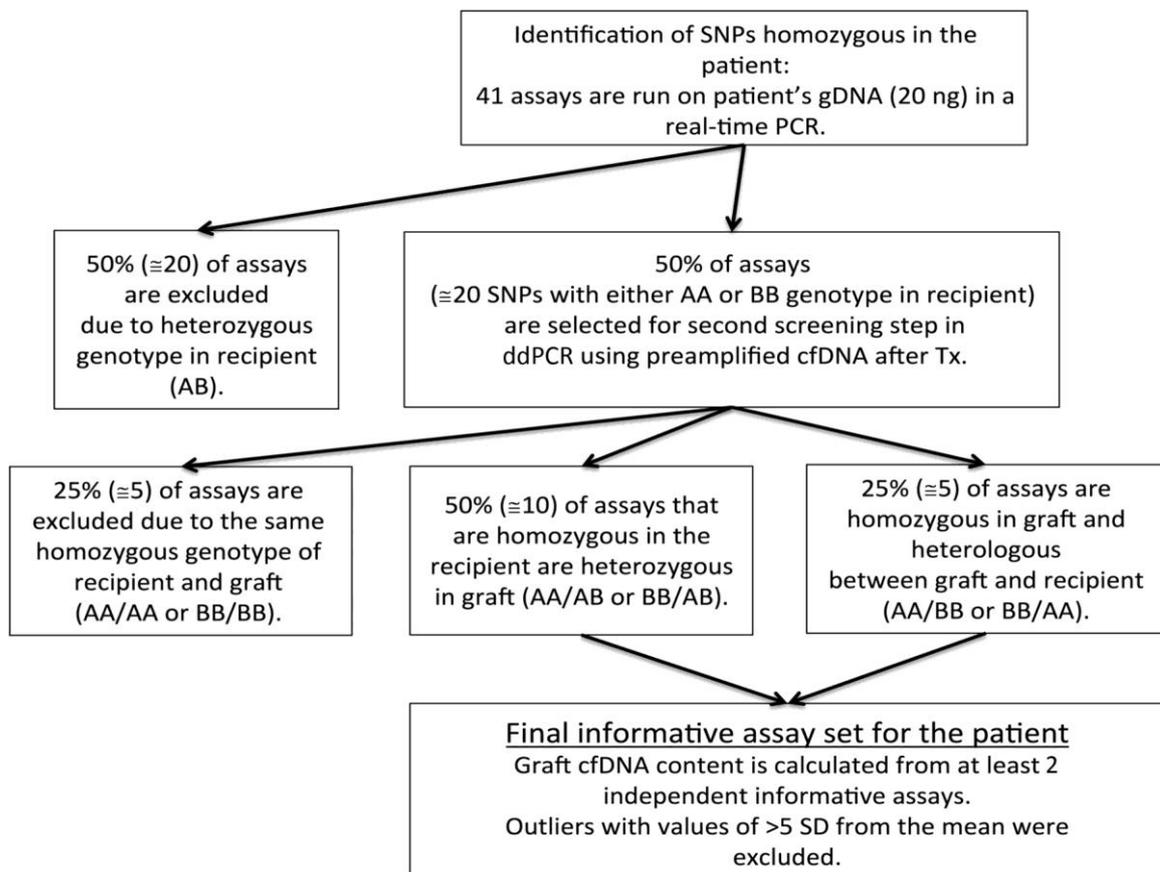


Abbildung 2: Ablauf der Selektion der informativen Assays (Abbildung nach Beck et al. 2013b. Abgedruckt mit Genehmigung der American Association for Clinical Chemistry)

### 3.3.1 Vorbereitung der Proben

Nach der Blutentnahme wurden die Blutproben zunächst zentrifugiert, um die Zellen vom Plasma zu trennen. Die Aufbewahrung bis zur Weiterverarbeitung des Plasmas und des Buffy-Coats erfolgte bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . In einem weiteren Schritt folgte eine zweite Zentrifugation des Plasmas, um evtl. verbliebenen Zelldebris abzutrennen (siehe Tabelle 3). Zur anschließenden Isolierung der cfDNA wurde High Pure Viral Nucleic Acid Extraktionskit (Roche Applied Science) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

Tabelle 3: Zentrifugationsschritte zur Isolierung der zellfreien DNA

Zentrifugationsschritt	Material	Zentrifugalkraft	Dauer	Temperatur
1.	Vacutainern®	1200 g	10 min	22 °C
	S-Monovetten®	2500 g	10 min	4 °C
2.	Vacutainern®	4000 g	20 min	4 °C
	S-Monovetten®			

### 3.3.2 Unselektierte Amplifikation der zellfreien DNA

Um eine ausreichende Menge an zellfreier DNA für die weiteren Schritte zu erhalten, erfolgte im nächsten Schritt eine unselektierte Präamplifikation unter Verwendung des NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit (New England Biolabs).

### 3.3.3 Identifizierung homozygoter SNPs im Empfänger

Die Bestimmung solcher homozygoten SNPs erfolgte mittels einer real-time PCR (LighCycler® 480 der Firma Roche Applied Sciences) an der genomischen DNA des Empfängers. Die dafür benötigte genomische DNA wird aus den Leukozyten extrahiert. Die Durchführung erfolgte mit 40 ausgewählten SNPs-Assays.

### 3.3.4 Droplet digital PCR

Droplet digital PCR (ddPCR) ist eine digitale PCR-Technologie, die die neuesten Entwicklungen in der Mikrofluidik und Tensidchemie nutzt, um die Eingangs-DNA in tausende von Tröpfchen mit ca. 1 Nanoliter Volumen zu emulgieren. Die PCR Reaktion findet dann in den Tröpfchen statt, i.d.R. werden hierbei fluoreszenzmarkierte Hydrolysesonden verwendet, die während der PCR ein allelspezifisches Fluoreszenzsignal freisetzen, welches nach 30-50 PCR-Zyklen in einem automatisierten Durchflusszytometer ausgelesen wird. Jedes Tröpfchen wird dabei anhand seiner Fluoreszenzintensität als positiv (mit Fragment des jeweiligen Allels) oder negativ (leer) gewertet. Die Anzahl der positiven und negativen Tröpfchen dient zur Berechnung der Konzentration des Allels in der Reaktion mit Hilfe der Poisson-Verteilung.

Damit basiert die Konzentrationsbestimmung mittels ddPCR nicht – wie in der herkömmlichen qPCR – auf dem Vergleich der Messwerte zu einer Standardkurve, sondern

auf dem direkten Auszählen der einzelnen Moleküle in der Reaktion, was mit einer erhöhten Präzision einhergeht (Hindson et al. 2011; Oxnard et al. 2014).

Die ddPCR erfolgte in einem QX200 System (Bio-Rad) unter Verwendung von 30-100 ng der preamplifizierten zellfreien DNA als Matrize. Für jeden SNP wurden die Allele des Empfängers und des Organs in zwei getrennten Fluoreszenzkanälen bestimmt. Als Messgröße wurde der prozentuale Anteil der organstämmigen zellfreien DNA an der gesamten zellfreien DNA ausgegeben. Die Auswertung der ddPCR erfolgte mit der QuantaSoft™ Software (Version 1.3.2.0, Bio-Rad Laboratories Inc.).

Die endgültige GcfDNA-Prozentangabe repräsentiert den Mittelwert aus mindestens zwei (vorzugsweise vier) ausgewerteten Assays. Dabei werden die Ergebnisse aus den Assays, in denen der Empfänger homozygot und im Spenderorgan heterozygot ist, verdoppelt.

### 3.3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte in enger Zusammenarbeit mit Herrn Markus Harden vom Institut für Medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen. Die statistischen Analysen wurden mit SAS Version 9.3 durchgeführt. Kontinuierliche Daten wurden als Median und einem 95%-Konfidenzintervall (CI) oder als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Kategoriale Merkmale wurden durch relative Häufigkeiten und Clopper-Pearson-Konfidenzintervalle beschrieben. Dargestellte Box-Plots repräsentieren den Median und die 5%, 25%, 75% und 95% Perzentile. Wenn mehrere Gruppen verglichen worden sind, wurden die p-Werte nach Bonferroni adjustiert. P-Werte unter  $<0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen. Die Spearman Korrelationskoeffizienten wurden zwischen der GcfDNA (%) und den traditionellen Leberfunktionstests (AST, ALT,  $\gamma$ -GT, Bilirubin, GLDH) und den Untergruppen (s. Abbildung 1) berechnet. Zur GLDH konnte nur eine Analyse mit Messungen aus der Klinik Hamburg-Eppendorf durchgeführt werden, sodass diese von der Gesamtanalyse ausgeschlossen wurde. ROC (Receiver Operator Characteristic) Analysen wurden bei der GcfDNA und den traditionellen Leberfunktionstests angewendet, um zu beurteilen, welcher Biomarker am effektivsten zwischen den Untergruppen diskriminiert. Um eine Vergleichbarkeit sicherzustellen, wurden nur Proben miteinander verglichen, die am gleichen Tag entnommen worden sind. Die Berechnung der Threshold-Werte erfolgte bei einer Spezifität von mindestens 95%.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Demographische Daten

Zwischen 2012 und 2015 wurden insgesamt 128 Patienten nach einer Lebertransplantation in die Studie eingeschlossen. Davon waren 50 Patienten aus der Charité in Berlin, 48 Patienten aus der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf und 30 Patienten aus der Universitätsklinik in Göttingen.

Von den 128 Studienteilnehmern konnten bei 13 Patienten die Daten bzw. die GcfDNA-Messungen nicht ausgewertet werden. Die Gründe dafür waren eine Unvollständigkeit der Patientendaten N=4, technisches Versagen N=2, eine Diskrepanz bei der Probenzuordnung N=3, Versterben der Patienten unmittelbar nach Transplantation N=2, das Fehlen eines Buffy Coat N=1 sowie eine Massentransfusion von Blutprodukten während der Transplantation N=1. Somit wurden bei 115 Studienteilnehmern die Patientendaten sowie die Messungen der zellfreien DNA ausgewertet.

Bei den 115 ausgewerteten Patientendaten waren 113 Patienten kaukasischer Herkunft, ein Patient afrikanischer und ein Patient orientalischer Herkunft. 70 Patienten waren männlich und 45 weiblich. Das Alter während der Lebertransplantation betrug im Durchschnitt  $52,4 \pm 13,7$  (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Bei den männlichen Teilnehmern war das Empfängeralter  $54,1 \pm 12,5$  und bei den weiblichen Teilnehmern  $49,8 \pm 15,1$ . Bei den ausgewerteten Patientenproben in Subgruppe „histologisch gesicherte Abstoßung“, lag das Patientenalter bei  $46,2 \pm 16,2$  Jahren. In der Subgruppe „stabile Transplantatfunktion“ bei  $51,3 \pm 14,5$  Jahren und in der Subgruppe der „HCV+“ bei  $58,6 \pm 6,3$  Jahren.

Insgesamt erfolgte von 107 Patienten die Kategorisierung der Proben in die jeweiligen Subgruppen. Dabei gingen von 88 Patienten Blutproben in die Subgruppe der „stabilen Transplantatfunktion“ ein. Bei 17 Patienten erfolgte die Zuordnung in die Subgruppe der „HCV+“. Für die Subgruppe „histologisch gesicherte Abstoßung“ erfüllten 17 Patienten die Kriterien. Bei insgesamt acht der 115 Patienten konnte keine Kategorisierung aufgrund von verschiedenen Komplikationen zum Visitenzeitpunkt in die jeweiligen drei Subgruppen erfolgen.

Drei Patienten wurden während der laufenden Studie retransplantiert. Zwei von ihnen mussten erneut re-re-transplantiert werden. Somit wurden bei den 115 Studienteilnehmern insgesamt 120 Spenderorgane transplantiert.

#### 4.1.1 Art der Transplantation

Bei 114 Patienten erfolgte die Lebertransplantation mit einem postmortalen Spenderorgan. Eine Split-Lebertransplantation erfolgte durch eine Lebendspende. Insgesamt wurde bei 109 Patienten die gesamte Spenderleber transplantiert. Bei fünf Studienteilnehmern erfolgte eine Split-Lebertransplantation.

#### 4.1.2 Angaben zum Spenderorgan

Im Durchschnitt betrug das Alter der Organspender  $53,4 \pm 16,8$  (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Bei den männlichen Organempfängern lag das Alter des Spenders bei  $57,7 \pm 15,5$  Jahre, bei den weiblichen Organempfängern waren die Organspender im Durchschnitt  $47,2 \pm 16,7$  Jahre alt. Bei den ausgewerteten Patientenproben in der Subgruppe „histologisch gesicherte Abstoßung“ lag das Spenderalter bei  $45,9 \pm 13,5$  Jahren. In der Subgruppe „stabile Transplantatfunktion“ bei  $54,0 \pm 16,6$  Jahren und in der Subgruppe der „HCV+“ bei  $53,3 \pm 17,8$  Jahren. Das jüngste Spenderalter lag bei 13 Jahren, das älteste Spenderalter bei 85 Jahren.

#### 4.1.3 Ischämiezeit des Spenderorgans

Die kalte Ischämiezeit (KIZ) der 120 transplantierten Spenderorgane lag bei  $10,0 \pm 2,5$  Stunden (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Bei den männlichen Patienten betrug die KIZ  $10,4 \pm 2,6$ , bei den weiblichen Patienten  $9,5 \pm 2,1$  Stunden. In den ausgewerteten Patientenproben der Subgruppe „histologisch gesicherte Abstoßung“ lag die KIZ bei  $10,9 \pm 2,5$  Stunden. In der Subgruppe „stabile Transplantatfunktion“ lag die KIZ bei  $9,8 \pm 2,3$  Stunden und in der Subgruppe der „HCV+“ bei  $10,3 \pm 1,6$  Stunden.

#### 4.1.4 MELD-Score bei Transplantation

Der MELD(engl. *Model for End-stage Liver Disease*)-Score lag bei allen in der Studie durchgeführten Lebertransplantationen bei  $20,0 \pm 10,4$  (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) und zwar bei den männlichen Transplantatempfängern bei  $18,4 \pm 9,7$  und bei den weiblichen Transplantatempfängern bei  $22,3 \pm 11,0$ . In den ausgewerteten Patientenproben der Subgruppe „histologisch gesicherte Abstoßung“, zeigten sich Werte bei  $19,4 \pm 9,7$ , in der Subgruppe „stabile Transplantatfunktion“ bei  $20,1 \pm 10,3$  und in der Subgruppe der „HCV+“ bei  $18,6 \pm 11,7$ .

#### 4.1.5 Indikationen zur Lebertransplantation

Von den 115 ausgewerteten Patienten wurden 96 de novo-lebertransplantiert. Die Hauptgründe für eine Lebertransplantation sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt. Die häufigste Indikation für eine Lebertransplantation machte dabei, wie auch im europäischen Lebertransplantationsregister (engl. *European Liver Transplant Registry*) dokumentiert, die Leberzirrhose aus. Weitere 19 Patienten wurden schon in der Vergangenheit de novo-transplantiert. Bei ihnen bestand die Indikation zur Retransplantation.

Tabelle 4: Indikation zur Lebertransplantation

Indikation zur Lebertransplantation	N		N*
	N	N*	
Leberzirrhose	31	4	30,4%
Leberzirrhose mit Hepatozellulärem Karzinom	25	1	22,6%
Primär sklerosierende Cholangitis	16	2	15,7%
Autoimmunhepatitis	4	0	3,5%
Akutes Leberversagen	5	0	4,3%
Hepatozelluläres Karzinom	3	0	2,6%
Zystenleber	3	0	2,6%
Sekundär sklerosierende Cholangitis	3	2	4,3%
Akutes Transplantatversagen	0	3	2,6%
Hämochromatose	2	0	1,7%
Chronische Transplantatabstoßung	0	2	1,7%
Chronisches Transplantatversagen	0	3	2,6%
Leberzysten	1	0	0,9%
Malignes epitheloides Hämangioendotheliom	1	0	0,9%
Iatrogene Lebernekrose	1	0	0,9%
Autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung	1	0	0,9%
Leberadenom	1	0	0,9%
Lebergangnekrose	0	1	0,9%
Ischämisches Transplantatversagen	0	1	0,9%

\*Re-LTx

---

Während des Beobachtungszeitraumes verstarben neun Patienten. Die Hauptgründe für das Versterben waren bei drei Patienten eine Sepsis sowie jeweils ein Herzversagen, ein akutes Nierenversagen, eine reaktive HCV-Infektion, ein hepatozelluläres Karzinom und eine systemische Infektion. Bei einem Patienten war die Todesursache unbekannt.

## 4.2 Immunsuppressive Therapie nach Lebertransplantation

Die Immunsuppression nach LTx erfolgte nach dem jeweiligen etablierten Standard-Schema der Transplantationszentren. An der Universitätsmedizin Göttingen und in der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf erfolgte eine Induktionstherapie mit Basiliximab (Simulect®) intraoperativ sowie am 4. postoperativen Tag. An der Charité Berlin wurde bei gewissen Konstellationen die Gabe von Thymoglobulin präoperativ sowie am 2. postoperativen Tag verabreicht. Alternativ bei Kontraindikationen konnte auf Basiliximab ausgewichen werden. Es erfolgte auch intraoperativ die intravenöse Gabe von Methylprednisolon, welches dann an der Universitätsmedizin Göttingen innerhalb von 13 Tagen, in der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf möglichst bis zu drei Monaten und an der Charité Berlin bis zum 56. postoperativen Tag abgesetzt worden ist. Als Calcineurininhibitor kam in allen Transplantationszentren Tacrolimus (Modigraf®, Prograf®, Advagraf®) zum Einsatz. Die Dosierung orientierte sich unter anderem an den Talspiegeln, die in den jeweiligen Zentren unabhängig von der Studie bestimmt worden sind. In den ersten Wochen wurden höhere Zielspiegel angestrebt, die im Verlauf reduziert wurden (siehe Tabelle 5). Auch der Calcineurininhibitor Cyclosporin und der mTOR-Inhibitor Everolimus kamen für die immunsuppressive Therapie zum Einsatz. Als zusätzliche Therapiemöglichkeit wurden Patienten auch mit Mycophenolat-Mofetil (MMF®, Cellcept®) oder Azathioprin behandelt.

Tabelle 5: Zielspiegel von Tacrolimus bei komplikationslosem Verlauf

Transplantationszentrum	Zeitraum nach LTx	Zielspiegel*
Universitätsmedizin Göttingen	< 6 Wochen	8-12 ng/ml
	6-12 Wochen	4-8 ng/ml
Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf	Genereller Zielbereich	3-8 ng/ml
Charité Berlin	1. Monat	6-10 ng/ml
	2. Monat	5-8 ng/ml

\* Talspiegel im EDTA-Blut

### 4.3 GcfDNA in der frühen postoperativen Phase nach Lebertransplantation

Den höchsten Wert erreicht die GcfDNA am ersten Tag nach Lebertransplantation, höchstwahrscheinlich durch einen ischämischen Reperfusionsschaden (siehe Abbildung 3). In den ersten 7-10 Tagen sinkt der Median auf ein Basisniveau von unter 10% bei Patienten ohne Zeichen eines Transplantatschadens. Als oberster Grenzwert von 10% wurde dieser bereits in der Literatur bei Patienten (n=10) nach Lebertransplantation mit einer stabilen Transplantatfunktion beschrieben (Beck et al. 2013b).

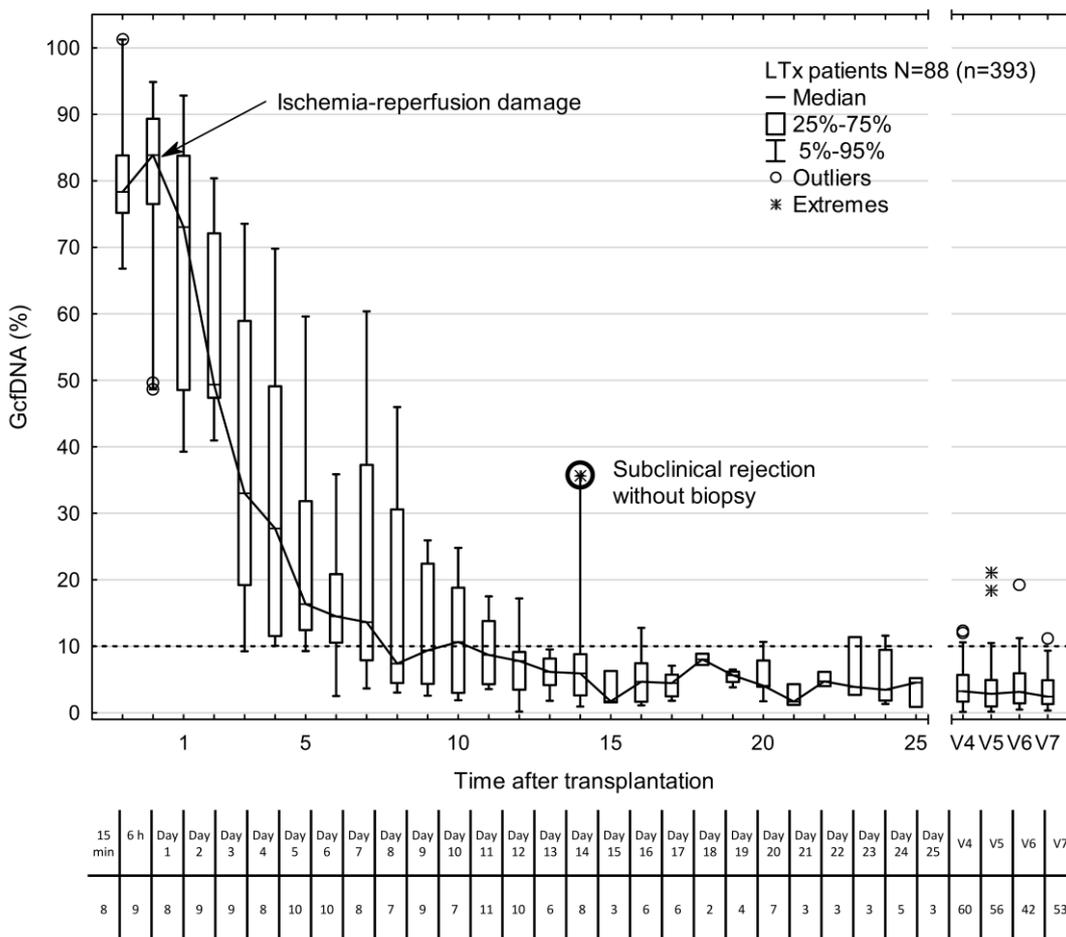


Abbildung 3: Zeitlicher Verlauf der GcfDNA innerhalb des Beobachtungszeitraumes bei Patienten ohne Abstoßung, Infektionen oder Interventionen (Schütz et al. 2017)

## 4.4 GcfDNA im Langzeitverlauf bei Patienten nach Lebertransplantation

### 4.4.1 Stabile Transplantatfunktion

Während des Beobachtungszeitraumes bis zu einem Jahr nach Lebertransplantation zeigten die GcfDNA-Messungen bei Patienten ohne Komplikationen Werte unter 10%. Der Median lag bei 3,3% (95% CI 2,9%-3,7%). Bei vier Patienten in dieser Kategorie wurden erhöhte GcfDNA-Werte sowie erhöhte Leberwerte analysiert. Bei drei dieser Patienten konnten in den Auswertungen der für diese Studie zur Verfügung stehenden Daten keine dokumentierten Komplikationen referenziert werden. Bei dem zweiten Patienten zeigten sich eine GcfDNA von 37,5% (siehe Ausreißer in der Abbildung 3) sowie additiv hohe Leberwerte am 14. postoperativen Tag nach LTx. Bei ihm bestand der klinische Verdacht auf eine Abstoßungsreaktion aufgrund subtherapeutischer Tacrolimusspiegel im Plasma bereits eine Woche zuvor. Nach Dosisanpassung der Immunsuppressiva und sinkenden Leberwerten wurde von einer Leberbiopsie abgesehen. Bei der nächsten GcfDNA-Abnahme, am 35. postoperativen Tag, lag der GcfDNA-Wert bei 5,6%.

### 4.4.2 Patienten mit Hepatitis-C-Virusinfektion

Bei der Beobachtung von 17 Patienten mit einer Hepatitis-C-Virusinfektion und insgesamt 68 GcfDNA-Messungen wurden höhere GcfDNA-Werte sowie stärkere Schwankungen als bei Patienten mit einer stabilen Transplantatfunktion beobachtet (siehe Abbildung 4). Der Median in diesem Patientenkollektiv lag bei 5,9% (95% CI 4,4%-10,3%).

### 4.4.3 Patienten mit einer biopsiegesicherten zellulären Abstoßung

Insgesamt hatten 43 Studienteilnehmer während des Beobachtungszeitraumes eine bioptisch gesicherte zelluläre Abstoßung. Von diesen 43 Studienteilnehmern wurde bei 20 Patienten entweder keine Blutentnahme durchgeführt oder diese Abnahmen lagen außerhalb des definierten Zeitfensters. Bei drei Patienten wurden die Proben während der Abstoßung nicht berücksichtigt, da diese eine hochdosierte Steroidstoßtherapie während der Probenentnahme erhielten. Bei weiteren drei Patienten wurde die zelluläre Abstoßungsepisode in der ersten postoperativen Woche diagnostiziert. Bei diesen Patienten zeigten sich GcfDNA-Werte von 86,1 % am 3. postoperativen Tag, 82,1% am 6. postoperativen Tag sowie 28,4% am 11. postoperativen Tag. Im Vergleich dazu zeigten sich in der frühen postoperativen Phase bei Patienten ohne Abstoßungen sowie komplikationslosen Verläufen deutlich niedrigere Werte. In diesem Patientenkollektiv lag der Median für die GcfDNA-Werte am 3. postoperativen Tag bei 33%, am 6.

postoperativen Tag bei 14,5% und am 11. postoperativen Tag bei 8,7%. Die erhobenen GcfDNA-Messungen während der Abstoßung in dieser frühen postoperativen Phase wurden von den weiteren Analysen exkludiert.

Insgesamt erfüllten 17 Patienten mit 31 GcfDNA-Messungen die Kriterien für die Subgruppe „histologisch gesicherte akute Abstoßung“ und wurden den anderen Subgruppen gegenübergestellt. In diesen Messungen, die während des Zeitraumes der akuten zellulären Abstoßung entnommen wurden, zeigten sich erhöhte GcfDNA-Werte im Vergleich zu den anderen Subgruppen (siehe nachfolgende Abbildung 4). Der Median lag hier bei 29,6% (95% CI 23,6%-41,0%).

Bei zwei Patienten zeigte sich keine Erhöhung der GcfDNA über 10%. Bei einem dieser Patienten erfolgte die Probenentnahme für die GcfDNA-Messung am gleichen Tag wie die Leberbiopsie. Die GcfDNA hatte einen Wert von 5,3%. In der durchgeführten Leberbiopsie zeigte sich eine zelluläre Abstoßung 1. Grades. Bei diesem Patienten erfolgte eine Woche zuvor eine Leberbiopsie. In dieser wurde eine zelluläre Abstoßung 2. Grades beschrieben. Diese wurde initial mit einer Steroidstoßtherapie und einem *anti-thymocyte globulin* (ATG) therapiert. Bei dem zweiten Patienten könnte die erhöhte Leukozytenzahl auf eine in den für die Auswertung zur Verfügung stehenden Daten nicht dokumentierte Steroidgabe als Erklärung für den niedrigen GcfDNA-Wert in Frage kommen.

Zusätzlich zu den histologisch gesicherten akuten Abstoßungen, bei denen Proben in einem Zeitintervall von sechs Tagen vor und einen Tag nach einer für eine akute Abstoßung positiven Biopsie erhoben wurden, konnte bereits 8-15 Tage vor der positiven Biopsie bei insgesamt fünf Patienten mit insgesamt sechs GcfDNA-Messungen eine Erhöhung der GcfDNA beobachtet werden. Der Median lag hier bei 34,3%.

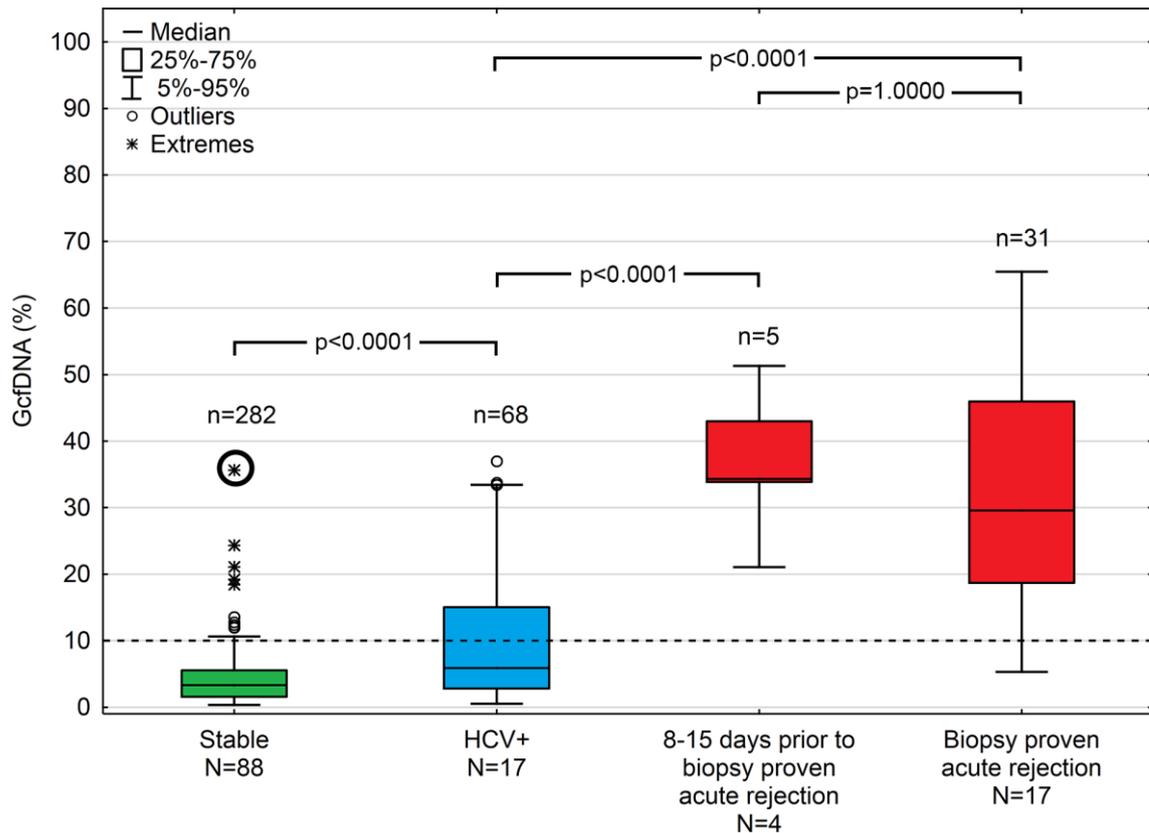


Abbildung 4: GcfDNA-Werte im ersten Jahr nach LTx. Dargestellt sind 282 GcfDNA-Messungen von 88 Patienten mit einer stabilen Transplantatfunktion, 68 GcfDNA-Messungen von 17 HCV+ Patienten und 31 GcfDNA-Messungen von 17 Patienten mit einer histologisch gesicherten Abstoßung. Zusätzlich sind sechs GcfDNA-Messungen von fünf Patienten, die in einem Zeitraum von 8-15 Tagen vor einer histologisch gesicherten Abstoßung abgenommen wurden, dargestellt (Schütz et al. 2017)

#### 4.5 GcfDNA-Werte bei Patienten mit Komplikationen

Bei acht Patienten konnten keine der durchgeführten GcfDNA-Messungen in die jeweiligen Subgruppen eingeordnet werden, da diese Messungen die Kriterien für die Kategorisierung in die jeweiligen drei Subgruppen zu keinem Visitenzeitpunkt erfüllten. Des Weiteren wurden diese Patientendaten von allen weiteren statistischen Analysen exkludiert. Es folgt eine kurze Patientenvorstellung mit den dazugehörigen erhobenen GcfDNA-Werten sowie den chemischen Leberparametern.

##### 4.5.1 Patient mit einem Wundabszess

Bei diesem Patienten bestand die Indikation zur LTx aufgrund einer Leberzirrhose. Es erfolgte eine Vollorgantransplantation mit einem Größenmismatch, sodass initial nur ein temporärer Verschluss mit anschließender Revision möglich war, der sekundäre Verschluss erfolgte in einem zweiten Schritt. Der weitere postoperative Verlauf gestaltete sich kompliziert. Der Patient entwickelte einen Wundabszess, dieser wurde mit Spülungen und antibiotischer Therapie behandelt. Additiv erlitt der Patient ein akutes Nierenversagen und wurde dialysiert. Die initiale immunsuppressive Therapie erfolgte mit Tacrolimus und Everolimus, diese wurde im weiteren Verlauf von Everolimus auf MMF umgestellt.

Bei diesem Patienten erfolgten insgesamt zwei Visiten mit GcfDNA-Messungen. Nach der zweiten Visite hatte der Patient die Studie auf eigenen Wunsch abgebrochen. Die erste Visitenabnahme fand am 15. postoperativen Tag nach LTx statt. Die zweite Visitenabnahme folgte am 43. postoperativen Tag. Aufgrund der oben genannten Komplikationen zum Visitenzeitpunkt konnte keine der Proben in die drei definierten Subgruppen erfolgen.

Tabelle 6: GcfDNA-Werte und laborchemische Leberparameter bei einem Patienten mit einem Wundabszess als Komplikation

Parameter	Tag 15	Tag 43
GcfDNA (%)	38,3	4,8
AST (U/l)	109	23
ALT (U/l)	63	6
GGT (U/l)	1620	137

#### 4.5.2 Patienten mit Cholangitis

Bei dem ersten Patienten erfolgte die Indikation zur LTx aufgrund einer bestehenden polyzystischen Leber- und Nierendegeneration. In der zweiten postoperativen Woche erfolgte eine Histologie der Leber bei Verdacht auf eine akute Abstoßungsreaktion. In der histologischen Untersuchung bestätigte sich der Verdacht einer zellulären Abstoßung ersten Grades. Es erfolgte eine Steroidstoßtherapie über drei Tage. Additiv kam zum zweiten Visitenzeitpunkt die antibiotische Therapie einer Cholangitis zur Anwendung. Zudem zeigte sich eine Flussbehinderung in der Arteria hepatica. Es erfolgte die Versorgung der Stenose mittels Stenteinlage.

Tabelle 7: GcfDNA-Werte und laborchemische Leberparameter bei einem Patienten mit Cholangitis als Komplikation

Parameter	Tag 2	Tag 15
GcfDNA (%)	82,8	10,4
AST (U/l)	1648	38
ALT (U/l)	1430	96
GGT (U/l)	197	766

Bei dem zweiten Patienten erfolgte die Indikation zur LTx aufgrund eines akuten Leberversagens. Am 5. postoperativen Tag erfolgte eine Laparotomie bei einer Pankreatitis mit Nachweis von *Candida kefyr* im Pankreasgewebe. Diese wurde mit Caspofungin therapiert. Zudem erfolgte der Nachweis von *Enterococcus faecium* in den Gallenwegen. Es folgte eine antibiotische Therapie der bestehenden Cholangitis. Der Patient verstarb aufgrund der persistierenden Infektsituation am 57. postoperativen Tag.

Tabelle 8: GcfDNA-Werte und laborchemische Leberparameter bei einem weiteren Patienten mit Cholangitis als Komplikation

Parameter	Tag 2	Tag 16	Tag 43
GcfDNA (%)	88,1	7,9	2,6
AST (U/l)	4531	65	56
ALT (U/l)	2748	55	20
GGT (U/l)	66	207	472

### 4.5.3 Patient mit einer Sepsis

Bei diesem Patienten erfolgte die Lebertransplantation bei bestehender primär sklerosierender Cholangitis. Um den zweiten Visitenzeitpunkt wurde eine Biopsie der Leber durchgeführt. Diese zeigte eine zelluläre Abstoßung mit einer nachfolgenden Remission ohne Änderung der immunsuppressiven Therapie. Additiv entwickelte er eine schwere Pankreatitis mit rezidivierenden Infektionen. Am 49. postoperativen Tag verstarb der Patient aufgrund einer Sepsis mit Streptokokken.

Tabelle 9: GcfDNA-Werte und laborchemische Leberparameter bei einem Patienten mit einer Sepsis als Komplikation

Parameter	Tag 1	Tag 22
GcfDNA (%)	79	5,6
AST (U/l)	1376	52
ALT (U/l)	941	50
GGT (U/l)	281	1226

### 4.5.4 Patient mit einer portalen hepatischen Entzündung

Die Indikation zur LTx erfolgte aufgrund einer sekundär sklerosierenden Cholangitis mit Leberzirrhose. Bei dem Patienten wurde nur eine Visitenabnahme in der zweiten postoperativen Woche wahrgenommen und eine histologische Untersuchung der Transplantatleber durchgeführt. Diese zeigte eine diskontinuierliche portale Entzündung mit eosinophilen Granulozyten ohne bestehende Cholangitis. Die Kriterien für eine Rejektion wurden nicht erfüllt.

Tabelle 10: GcfDNA-Werte und laborchemische Leberparameter bei einem Patienten mit einer portalen hepatischen Entzündung als Komplikation

Parameter	Tag 9
GcfDNA (%)	22,7
AST (U/l)	-
ALT (U/l)	34
GGT (U/l)	399

#### 4.5.5 Patient mit einem hepatozellulären Karzinom

Die Indikation zur LTx erfolgte aufgrund einer Leberzirrhose bei Hepatitis B und einem hepatozellulären Karzinom (HCC, engl. *hepatocellular carcinoma*). Der initiale postoperative Verlauf gestaltete sich komplikationslos. Im Verlauf kam es zum positiven PCR-Nachweis der bestehenden Hepatitis B. Diese wurde mit der Erweiterung der antiviralen Medikamente therapiert. In der bildgebenden Diagnostik zeigten sich kleinherdige Infiltrationen der Transplantatleber. Zudem zeigten sich eine paraaortale Lymphadenopathie und kleine pulmonale Filiae. Bei einem weiteren Rezidiv des HCC mit diffusem Befall wurde auf ein palliatives Konzept umgestellt, am 205. postoperativen Tag verstarb der Patient.

Tabelle 11: GcfDNA-Werte und laborchemische Leberparameter bei einem Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom als Komplikation

Parameter	Tag 6	Tag 20	Tag 48	Tag 169	Tag 181
GcfDNA (%)	30,6	16,9	7,5	13,9	32,6
AST (U/l)	66	20	20	77	162
ALT (U/l)	333	34	24	49	87
GGT (U/l)	398	80	33	268	766

#### 4.5.6 Patient mit Cholestase, Abstoßungsreaktion unter Steroiden und Transplantatversagen im Verlauf

Die Indikation zur LTx erfolgte aufgrund einer Leberzirrhose mit einem HCC. Am 5. postoperativen Tag bestand bei dem Patienten der klinische Verdacht einer akuten Abstoßungsreaktion. Diese wurde mit einem Steroidbolus über drei Tage erfolgreich therapiert. Eine histologische Untersuchung der Leber erfolgte nicht. Bei liegender Gallengangsdrainage erfolgte ein Abklemmversuch. Im Verlauf kam es zur Erhöhung der Leberwerte, sowie der Durchführung einer ERCP mit Stenteinlage. In dem Zeitraum der dritten Visitenabnahme erfolgte eine weitere ERCP mit Dilatation bei einem bestehenden Gallengangsstentverschluss. Im weiteren postoperativen Verlauf entwickelte der Patient eine Zirrhose des Transplantates mit Dekompensation. Zum letzten Visitenzeitpunkt erfolgte dann die Evaluierung zur erneuten Lebertransplantation.

Tabelle 12: GcfDNA-Werte und laborchemische Leberparameter bei einem Patienten mit Cholestase, Abstoßungsreaktion unter Steroiden und Transplantatversagen im Verlauf

Parameter	Tag 9	Tag 24	Tag 59	Tag 221
GcfDNA (%)	11,5	14,4	7,7	33,9
AST (U/l)	29	18	37	107
ALT (U/l)	146	28	39	88
GGT (U/l)	1239	668	551	164

#### 4.6 Beurteilung der GcfDNA in der ROC-Analyse

Bei der Analyse mit der ROC-Kurve (ROC, engl. *receiver operating characteristic curve*) mit insgesamt 313 GcfDNA-Messungen, die von Patienten mit einer stabilen Transplantatfunktion (282 Messungen) sowie von Patienten mit einer histologisch gesicherten Abstoßung (31 Messungen) erhoben wurden (siehe Abbildung 5), zeigte sich bei einem Cut-off-Wert von 10% eine diagnostische Sensitivität von 90,3% (95% CI 74,2%-98,0%) und eine Spezifität von 92,9% (95% CI 89,3%- 95,6%). Die AUC (engl. *area under the curve*), welche die diagnostische Genauigkeit reflektiert, betrug 96,5% (95% CI 92,7%-100%).

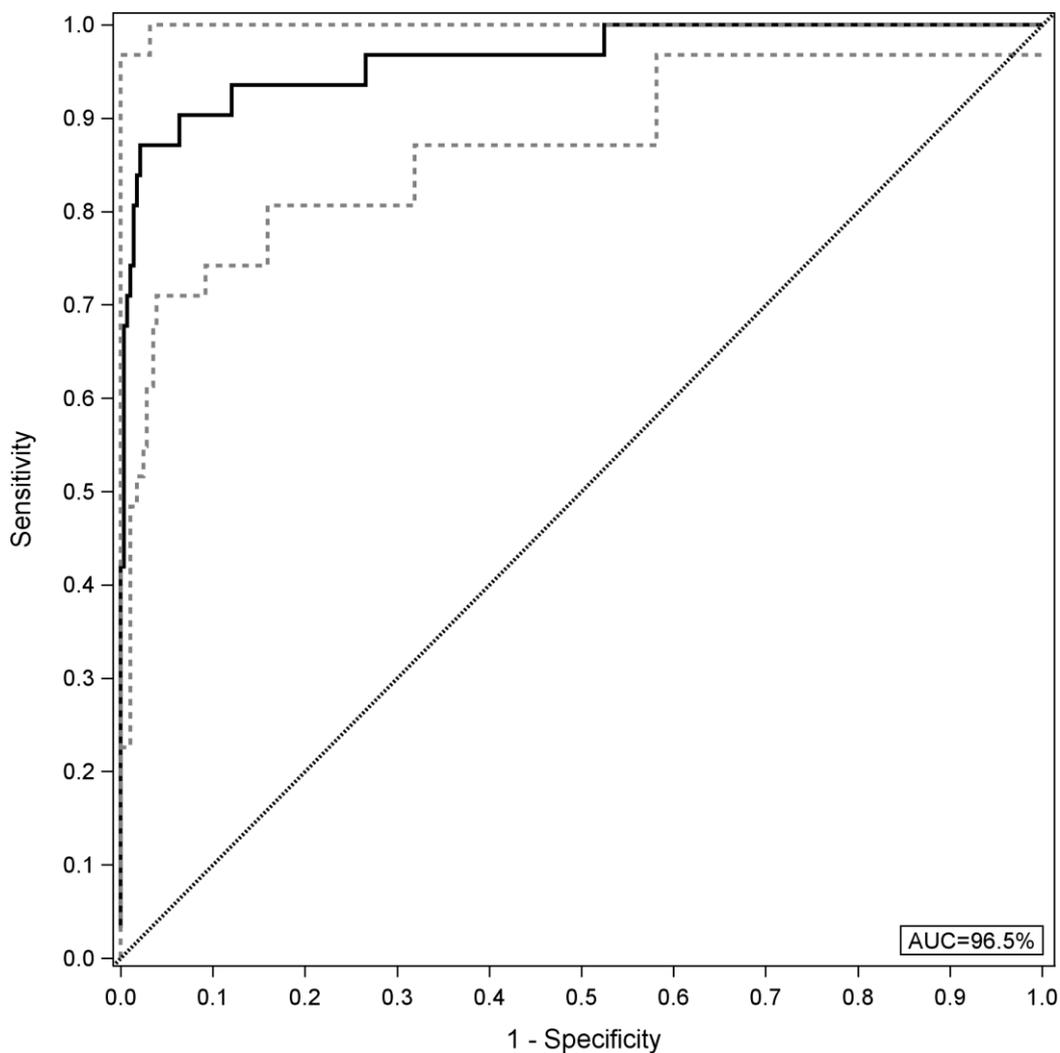


Abbildung 5: ROC-Kurve bei GcfDNA-Messungen von Patienten mit stabiler Transplantatfunktion und Messungen von Patienten mit einer histologisch gesicherten Abstoßung. Die gestrichelten Linien repräsentieren den oberen und unteren Grenzwert des 95% CI (Schütz et al. 2017)

#### 4.7 Beurteilung der GcfDNA in einer multivariablen logistischen Regression

Um beurteilen zu können, ob die GcfDNA eine Differenzierung zwischen Messungen mit stabiler Transplantatfunktion und Messungen während einer akuten Abstoßungsreaktion ermöglicht, wurde eine multivariable logistische Regression für konventionelle Lebertests mit und unter dem Ausschluss der GcfDNA berechnet (siehe Tabelle 13). Dabei zeigte die GcfDNA einen unabhängigen Effekt von den konventionellen Lebertests.

Tabelle 13: Multivariable logistische Regression für GcfDNA-Messungen und konventionelle Leberfunktionstests (modifiziert nach Schütz et al. 2017)

Parameter	Freiheitsgrade	Schätzung	Standardfehler	Teststatistik	p- Wert
Intercept*	1	-6.6435	1.0510	39.9597	<0.0001
GcfDNA (%)	1	0.1800	0.0515	12.2256	0.0005
AST	1	0.0559	0.0266	4.4182	0.0356
ALT	1	-0.0073	0.0142	0.2664	0.6057
$\gamma$ -GT	1	0.00145	0.0011	1.8124	0.1782
Bilirubin	1	-0.4537	0.4134	1.2044	0.2724

\*Konstanter Term in der linearen Regressionsanalyse

## 4.8 GcfDNA-Messungen und konventionelle Leberfunktionstests im Vergleich

### 4.8.1 Leberwerte im Langzeitverlauf nach einer Lebertransplantation

Im Vergleich zu den herkömmlichen chemischen Leberwerten (AST, ALT, Bilirubin sowie der  $\gamma$ -GT) diskriminiert die GcfDNA-Bestimmung besser zwischen den jeweiligen Subgruppen (stabile Transplantatfunktion, histologisch gesicherte Abstoßung, HCV+). Bei den Leberwerten zeigen sich zwischen den Subgruppen größere Überlappungen als bei den GcfDNA-Messungen (siehe nachfolgende Abbildung 6-9). Es sind nur Proben in die folgenden Auswertungen eingegangen, die am gleichen Tag wie für die Messungen der GcfDNA abgenommen wurden.

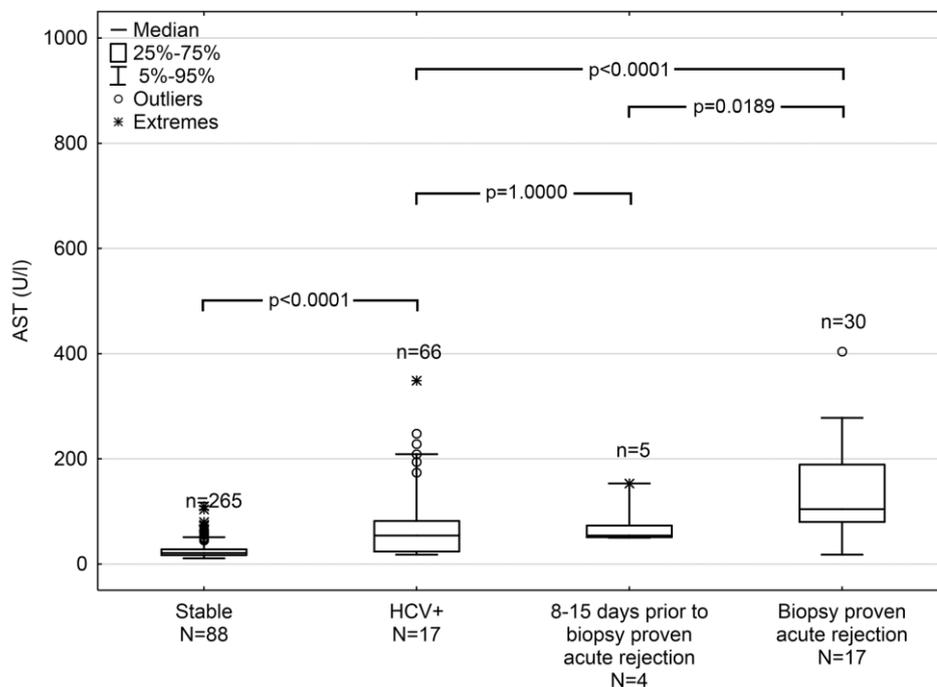


Abbildung 6: Plasma-AST-Messungen, die im ersten Jahr nach LTx erfolgten. Dabei repräsentieren die Box-Plots die jeweiligen Subgruppen (stabile Transplantatfunktion, HCV+, histologisch gesicherte Abstoßung (Schütz et al. 2017))

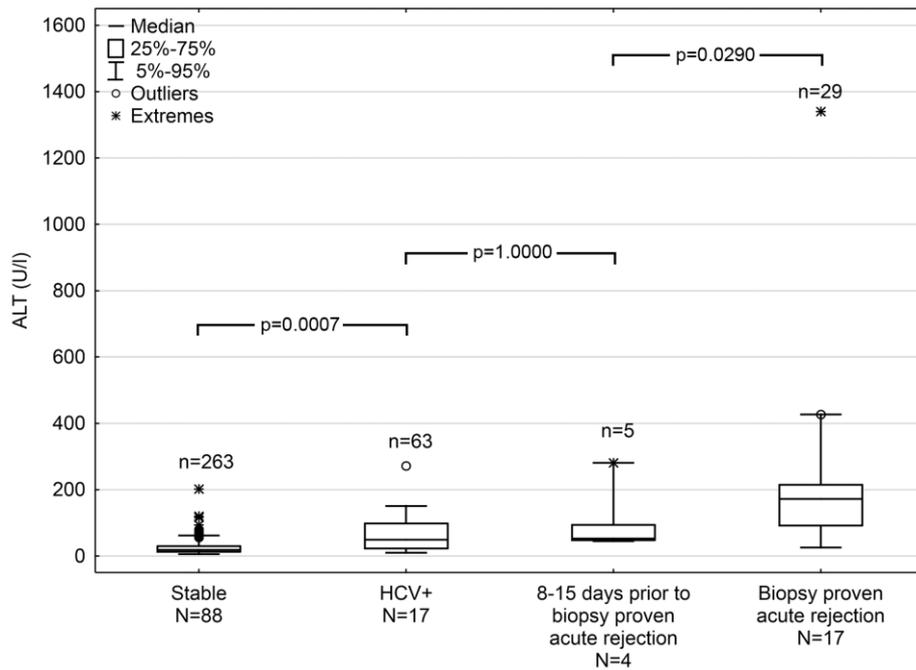


Abbildung 7: Plasma-ALT-Messungen, die im ersten Jahr nach LTx erfolgten. Dabei repräsentieren die Box-Plots die jeweiligen Subgruppen (stabile Transplantatfunktion, HCV+, histologisch gesicherte Abstoßung (Schütz et al. 2017))

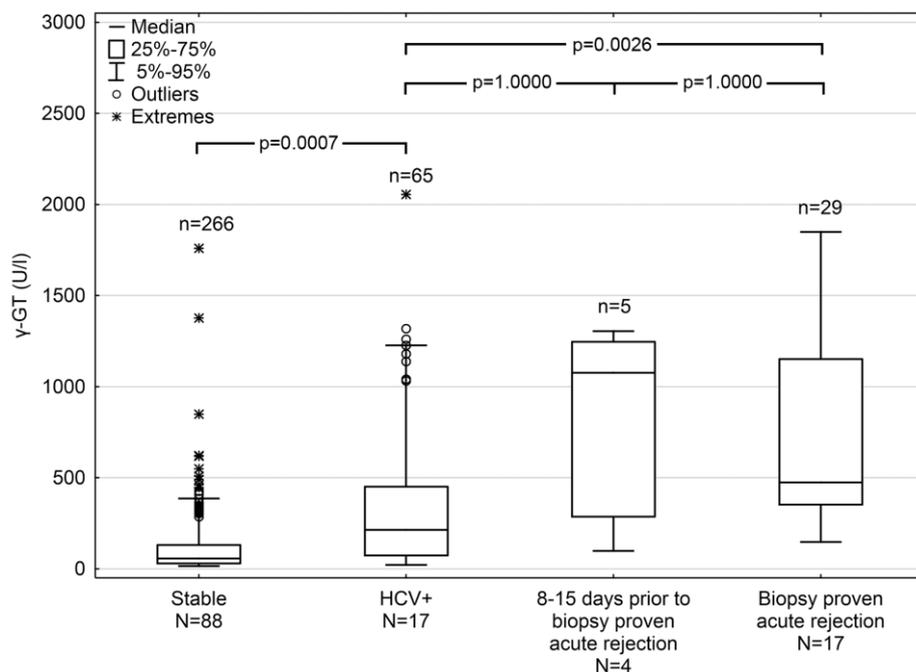


Abbildung 8:  $\gamma$ -GT-Messungen, die im ersten Jahr nach LTx erfolgten. Dabei repräsentieren die Box-Plots die jeweiligen Subgruppen (stabile Transplantatfunktion, HCV+, histologisch gesicherte Abstoßung (Schütz et al. 2017))

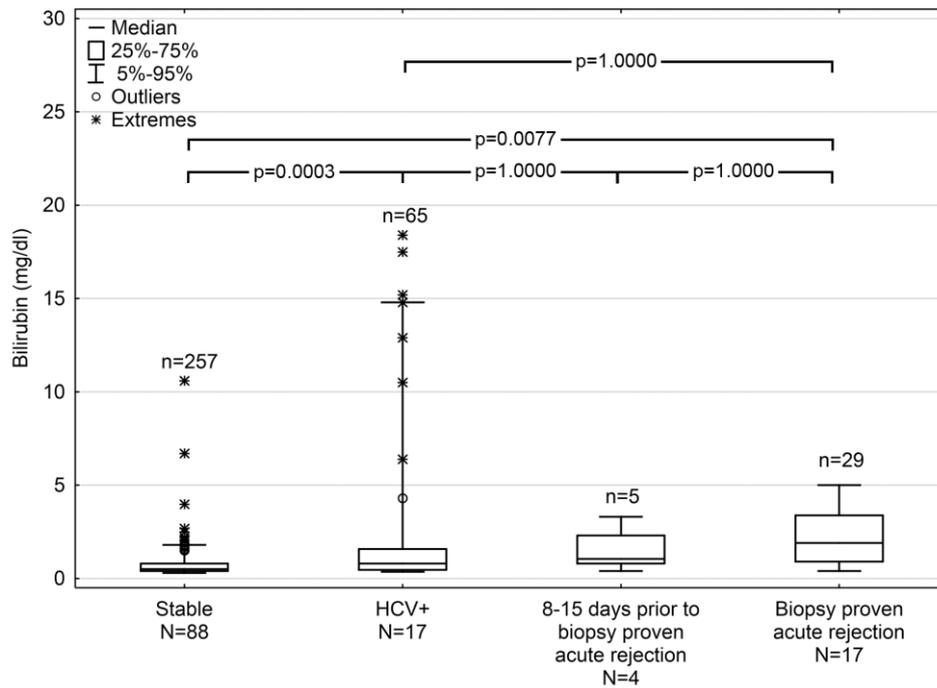


Abbildung 9: Bilirubin-Messungen, die im ersten Jahr nach LTx erfolgten. Dabei repräsentieren die Box-Plots die jeweiligen Subgruppen (stabile Transplantatfunktion, HCV+, histologisch gesicherte Abstoßung (Schütz et al. 2017))

#### 4.8.2 AUC-Berechnungen zwischen stabiler Transplantatfunktion und Messungen während einer akuten Abstoßung

Für die Berechnungen zwischen den Subgruppen der stabilen Transplantatfunktion und der histologisch gesicherten Abstoßung sind von 80 Patienten 232 Proben bei stabiler Transplantatfunktion sowie von 16 Patienten mit 28 Proben während einer histologisch gesicherten Abstoßung eingegangen (siehe Tabelle 14). Dabei zeigte sich für die GcfDNA die beste AUC, gefolgt von der Transaminase AST.

Tabelle 14: Diagnostische Genauigkeit der GcfDNA im Vergleich zu Leberenzymen und Bilirubin (modifiziert nach Schütz et al. 2017)

Parameter	Threshold*	Sensitivität	Spezifität	AUC
GcfDNA	11,2%	89,3% (95% CI 63,1%-93,9%)	95,7% (95% CI 92,2%-97,9%)	97,1% (95% CI 93,4%-100%)
AST	56 U/l	82,1% (95% CI 63,1%-93,9%)	95,7% (95% CI 92,2%-97,9%)	95,7% (95% CI 90,7%-100%)
ALT	66 U/l	85,7% (95% CI 67,3%-95,7%)	95,7% (95% CI 92,2%-97,9%)	95,2% (95% CI 90,1%-100%)
$\gamma$ -GT	387 U/l	71,4% (95% CI 51,3%-86,8%)	95,7% (95% CI 92,2%-97,9%)	94,5% (95% CI 91,4%-97,7%)
Bilirubin	30,8 $\mu$ mol/l	50,0% (95% CI 30,6%-69,4%)	95,7% (95% CI 92,2%-97,9%)	82,6% (95% CI 73,6%-91,6%)

\*Bei einer Spezifität von 95%

### 4.8.3 AUC-Berechnungen zwischen Patienten mit einer akuten Abstoßung und HCV+-Patienten

Für die ROC-Analyse zwischen den Subgruppen Patienten mit einer histologisch gesicherten Abstoßung und Patienten mit einer Hepatitis-C-Infektion sind 57 Messungen von 16 HCV+ Patienten sowie 28 Messungen von 16 Patienten mit einer akuten Abstoßung eingegangen. In diesem Vergleich schnitt die GcfDNA wiederholt am besten ab. Der Threshold (Schwellenwert), basierend auf dem Youden-Index, lag wie zu erwarten höher als bei den Vergleichen zwischen den Subgruppen mit stabiler Transplantatfunktion, mit Hepatitis C sowie mit einer akuten Abstoßung.

Für die GcfDNA zeigte sich eine AUC von 88,2% (95% CI 80,6%-95,9%) mit einer Sensitivität von 75,0% (95% CI 55,1%-89,3%) und einer Spezifität von 84,2% (95% CI 72,1%-92,5%) mit einem Threshold bei 23,6%.

Für die AST zeigte sich eine AUC von 76,3% (95% CI 65,4%- 87,2%) mit einer Sensitivität von 71,4% (95% CI 51,3%-86,8%) und einer Spezifität von 75,4% (95% CI 62,2%-85,9%) mit einem Threshold bei 82 U/l.

Für die ALT zeigte sich eine AUC von 83% (95% CI 72,8%-93,2%) mit einer Sensitivität von 64,3% (95% CI 44,1%-81,4%) und einer Spezifität von 89,5% (95% CI 78,5%-96,0%) mit einem Threshold bei 132 U/l.

Für die  $\gamma$ -GT zeigte sich eine AUC von 75,3% (95% CI 65,1%-85,5%) mit einer Sensitivität von 67,9% (95% CI 47,6%-84,1%) und einer Spezifität von 71,9% (95% CI 58,5%-83,0%) mit einem Threshold bei 430 U/l.

Für das Bilirubin zeigte sich die schlechteste AUC von 64,3% (95% CI 55,6%- 80,6%) mit einer Sensitivität von 64,3% (95% CI 44,1%-81,4%) und einer Spezifität von 73,7% (95% CI 60,3%-84,5%) mit einem Threshold bei 22,2  $\mu$ mol/l.

#### 4.8.4 Korrelationen zwischen der GcfDNA und den konventionellen Leberfunktionstests

Der Spearman-Korrelationskoeffizient ( $r$ ) zwischen der GcfDNA und den chemischen Leberwerten (AST, ALT, Bilirubin sowie der  $\gamma$ -GT) zeigte in 317 Messungen eine Korrelation ( $r$ ) zwischen 0,28 - 0,62 (siehe Tabelle 15). Dabei zeigte sich die beste Korrelation zwischen der GcfDNA und der Transaminase ALT. Am schlechtesten korrelierte das Bilirubin mit der GcfDNA. Für alle Parameter konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang gezeigt werden.

Tabelle 15: Korrelationen zwischen der GcfDNA und den chemischen Leberwerten (modifiziert nach Schütz et al. 2017)

GcfDNA	ALT	AST	$\gamma$ -GT	Bilirubin
GcfDNA %	0.62 (0.54–0.68)	0.46 (0.37–0.55)	0.45 (0.36–0.54)	0.28 (0.17–0.38)
p- Wert	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

## 5 Diskussion

### 5.1 Nutzen von neuen Biomarkern in der Diagnostik nach Lebertransplantation

In der heutigen Medizin hat die Transplantationsmedizin einen festen Stellenwert. Bei vielen Erkrankungen bedeutet die Transplantation eine letzte Chance auf ein Weiterleben. Eine große Herausforderung für die Gesellschaft ergibt sich aus dem negativen Trend zur postmortalen Organspende. Denn im Jahre 2017 erreichte die postmortale Spende in Deutschland den tiefsten Stand seit über 20 Jahren (DSO-Jahresbericht 2017). Dies verlangt, die vorhandenen Spenderorgane möglichst optimal an die Empfänger zu verteilen. Bei dem herrschenden Organmangel ist die Transplantationsmedizin erst recht gefordert, die Funktionstüchtigkeit der transplantierten Organe so lange wie möglich zu erhalten. Die 10-Jahres-Überlebensrate einer transplantierten Leber liegt bei 56%. Ähnliche 10-Jahres-Überlebensraten werden nach einer Nierentransplantation mit 55% und nach einer Herztransplantation mit 58% angegeben (Arnaud 2018). Faktoren die dabei eine Rolle spielen sind die irreversible chronische Dysfunktion des transplantierten Organs, die akute Abstoßung insbesondere in der Spätphase im zweiten Jahr nach Transplantation und die Nebenwirkungen der immunsuppressiven Therapie wie z. B. Nierentoxizität, kardiovaskuläre Erkrankungen, Infektionen und Malignome (Yazigi 2013; Oellerich et al. 2016b; Levitsky et al 2017). Die optimal auf den Patienten abgestimmte immunsuppressive Therapie nach Transplantation stellt eine große Herausforderung dar. Sie dient auch dem Schutz des Transplantates, damit es von dem Immunsystem des Empfängers nicht abgestoßen wird. Andererseits haben die Immunsuppressiva diverse Nebenwirkungen und können einen erheblichen Schaden hervorrufen. Um die optimale Therapie mit der immunsuppressiven Therapie für den Patienten zu ermöglichen, sollte es das Ziel sein, eine Schädigung durch das eigene Immunsystem des Patienten für das Transplantat zu verhindern und die Nebenwirkungen der Therapeutika auf ein minimales Maß zu reduzieren. Eine Hilfestellung stellt sicherlich das TDM dar. Auch die konventionellen Leberwerte haben in die klinische Routine Einzug gefunden. Eine weitere Möglichkeit zur Beurteilung des Transplantats stellt die Biopsie dar. Diese ist jedoch für den Patienten invasiv und mit daraus resultierenden Komplikationen verbunden. Derzeit erlauben die etablierten Methoden keine genauen Rückschlüsse auf das komplexe Immunsystem und eventuelle Schädigungen des transplantierten Organs.

## 5.2 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Die Ergebnisse dieser prospektiven multizentrischen Studie zeigen, dass die GcfDNA bei Patienten nach einer Lebertransplantation besser als die konventionellen Leberfunktionstests eine akute zelluläre Abstoßungsreaktion identifizieren kann. Zudem hat diese Methode den Vorteil, dass eine Bestimmung innerhalb eines Tages möglich ist. Des Weiteren zeigten sich für die Leberfunktionstests (AST, ALT,  $\gamma$  GT und Bilirubin) mehr Überlappungen zwischen den Patienten mit einer akuten Abstoßung, einer HCV-Infektion sowie einer stabilen Transplantatfunktion. Hier zeigte die GcfDNA die bessere Differenzierung zwischen den Subgruppen. Auch die AUC unter der ROC-Kurve war verglichen zu den konventionellen Lebertests mit 96,5% (95% CI 92,7%-100%) für die GcfDNA am höchsten.

## 5.3 Diskussion der Ergebnisse

In der frühen postoperativen Phase nach Transplantation wurden hohe Werte für die GcfDNA beobachtet. Diese erreichten aber in der 1. postoperativen Woche sukzessive ein Plateau bei ca. 10%. Die initiale Erhöhung spiegelt am ehesten die Transplantatschämie mit resultierender Transplantatschädigung wider. Während dieser frühen postoperativen Phase kann die GcfDNA-Bestimmung bei Erhöhung über das 2,5-Fache des medianen Wertes auf eine akute zelluläre Abstoßung hindeuten. Die erhobenen Daten mit einem hohen GcfDNA-Wert wurden auch bei Patienten mit anderen Komplikationen wie z. B. einem HCC beobachtet, bei denen von einer Transplantatschädigung auszugehen ist.

In den durchgeführten Auswertungen zeigten drei Patienten, die die Kriterien für eine stabile Transplantatfunktion erfüllten, erhöhte GcfDNA-Werte (18,4%- 24,3%). Zudem zeigten sich ebenfalls die konventionellen Leberfunktionstests leicht erhöht. Die Erhöhung der GcfDNA könnte in diesen Fällen auf einen ausgedehnteren Transplantatschaden hindeuten als nach den konventionellen Leberfunktionstests alleine zu erwarten wäre.

Bei weiteren zwei Patienten, bei denen eine akute zelluläre Abstoßung vorlag, wurden keine erhöhten GcfDNA-Werte beobachtet (3,1% und 5,3%). Auch die konventionellen Leberfunktionstest (mit Ausnahme eines  $\gamma$ -GT-Wertes von 734 U/l) lagen bei diesen Patienten unterhalb der Abstoßungsschwelle. Bei beiden Patienten erfolgte eine Therapie der akuten Abstoßung mit Immunsuppressiva. In dieser Phase erfolgten auch die Probenentnahmen. Die kurze Halbwertszeit der GcfDNA und die erfolgreiche Antirejektionstherapie, die durch eine Kontrollbiopsie beobachtet werden konnte, scheinen eine Erklärung zu sein.

Die ausgewerteten Ergebnisse bestätigen die Beobachtung, dass ein schneller Rückgang der GcfDNA in der frühen postoperativen Phase einen guten prognostischen Biomarker sogar bei marginalen Spendertransplantaten darstellen kann (Kanzow et al. 2014). Diese frühe postoperative serielle Auswertung kann bei einem zusätzlichen Anstieg der GcfDNA einen Hinweis auf eine Transplantatschädigung geben.

Nachdem die GcfDNA in der zweiten postoperativen Woche nach Transplantation ein Plateau (Median <10%) erreicht hat, blieb sie bei Patienten ohne Abstoßungsreaktionen und andere Ursachen für Transplantatschädigung in dem beobachteten Zeitraum bis zu einem Jahr postoperativ stabil, sodass dieses Niveau als Schwellenwert anzunehmen ist. Die im ersten postoperativen Jahr gesammelten Daten zeigen die Gesamtüberlegenheit der GcfDNA-Bestimmung im Vergleich zu herkömmlichen laborchemischen Leberfunktionstests. Zudem zeigen die Auswertungen auch, dass die GcfDNA zusätzliche Informationen über die Integrität des Transplantats liefert.

#### 5.4 Diskussion der Methode

Der Hauptunterschied zwischen GcfDNA und den konventionellen Leberfunktionstests basiert auf der Tatsache, dass der GcfDNA-Prozentsatz auf einer genauen Anzahl von DNA-Kopien pro Zelle in einem diploiden Säugetierorganismus basiert. Da eine Zelle ohne DNA nicht lebensfähig ist, spiegelt jede DNA, die im Blutkreislauf nachgewiesen wird, den Zelltod im Transplantat wider. Dadurch korreliert die freigesetzte DNA mit der Anzahl der sterbenden Zellen. Die konventionellen Marker werden von vielen biochemischen Prozessen beeinflusst, wie z. B. der Ribonukleinsäure-Expression und der Proteinsynthese, der Produktion des Markers und unterschiedlicher intrazellulärer Durchlässigkeit.

Diese Überlegungen sowie die Auswertungen dieser Studie legen nahe, dass die GcfDNA als eine „flüssige Biopsie“ verwendet werden kann, um die Integrität des Transplantats zu beurteilen. Dies könnte dabei helfen, Transplantatabstoßungen zu erkennen und frühzeitig eine effektive und individualisierte Therapie zu beginnen. Dies wäre bei den Minimierungsversuchen sowie bei der Anpassung und Veränderungen der Dosierung von Immunsuppressiva von Vorteil (Oellerich et al. 2014). Die Umstellung auf ein anderes Immunsuppressivum wegen Unverträglichkeit oder Toxizität bringt die Herausforderung mit sich, auf der einen Seite die Nebenwirkungen zu minimieren und auf der anderen eine Unterimmunsuppression zu vermeiden (Oellerich et al. 2016a). Denn eine Unterimmunsuppression birgt das Risiko für eine akute Abstoßung. Eine wiederholte

GcfDNA-Bestimmung kann in dieser kritischen Phase von besonderer Bedeutung sein, da sie die Integrität des Transplantates widerspiegelt, die Folgen einer Immunaktivierung und subklinische oder akute Abstoßungen frühzeitig detektieren und Komplikationen entgegenwirken kann. Alleinige Konzentrationsmessungen der Immunsuppressiva während einer Medikamentenumstellung sind oft von begrenztem Nutzen.

Eine akute Abstoßung nach Lebertransplantation geht für den Patienten nach einer Analyse aktueller Daten mit einem signifikant erhöhten Risiko für ein Transplantatversagen und damit resultierender Gesamtmortalität einher (Levitsky et al 2017). Diese zu verhindern sowie frühzeitig zu erkennen und zu therapieren erfordert ein optimales Management in der Nachsorge und Behandlung des lebertransplantierten Patienten. Die Therapie einer akuten Abstoßungsreaktion wird mit Hilfe eines Steroidbolus behandelt, wobei ein schneller Abfall der GcfDNA zu beobachten ist (Kanzow et al. 2014). Dadurch kann die GcfDNA als ein Verlaufsmarker für die Wirksamkeit und den Erfolg einer Abstoßungstherapie angesehen werden. Persistieren erhöhte GcfDNA-Werte trotz der Gabe eines Steroidbolus, könnte dies mit einer steroidresistenten Abstoßung assoziiert sein (Oellerich et al. 2015) oder die Genese der Transplantatschädigung beruht auf keiner Abstoßungsreaktion (Kanzow et al. 2014). Der Vorteil bei der GcfDNA-Bestimmung liegt in der sehr kurzen Halbwertszeit im Blut von <1 h (Beck et al. 2013b; Lo et al. 1999). Dies ermöglicht nahezu eine Echtzeitansicht des Transplantats. Als Beispiel haben z. B. Aminotransferasen wie AST mit 17 Stunden und ALT mit 47 Stunden deutlich längere Halbwertszeiten (Dufour 2012). Transplantatbiopsien weisen aufgrund der Invasivität große Risiken für den Patienten auf und sind Stichprobenfehlern sowie subjektiven Interpretationen unterworfen (Regev et al. 2002).

### **5.5 Praktische Einschränkungen**

Die Bestimmung der GcfDNA weist praktische Einschränkungen auf. Für eine routinemäßige Anwendung ist qualifiziertes Personal sowie der Zugang zu ddPCR-Geräten erforderlich, um zuverlässige Ergebnisse zu generieren und zu interpretieren. Der GcfDNA-Prozentsatz kann durch Veränderungen sowohl der cfDNA des Transplantates als auch der cfDNA des Patienten beeinflusst werden. Ebenfalls können Leukopenien oder Leukozytosen den GcfDNA-Prozentsatz verändern, da die Mehrheit der cfDNA von zirkulierenden Leukozyten stammt (Sun et al. 2015). Auch der Body Mass Index (BMI) kann auf die cfDNA Einfluss nehmen, da bei Patienten mit extrem niedrigem BMI höhere cfDNA-Werte und bei Patienten mit einem hohen BMI niedrigere cfDNA-Werte erhoben

werden (Ashoor et al. 2013). Für solche Patienten könnte anstatt einer Prozentangabe die Konzentrationsangabe in Kopien/Milliliter ermittelt werden, indem eine Gesamt-cfDNA-Quantifizierung zusätzlich durchgeführt wird (Beck et al. 2014, 2015). Dies scheint besonders nach Transplantationen von anderen Organen wie Herz oder Niere mit niedrigeren GcfDNA-Prozentsätzen eine Option zu sein (Snyder et al. 2011; Beck et al. 2013b).

## 5.6 Schlussfolgerung

Hinsichtlich der klinischen Validität zeigen die Ergebnisse dieser prospektiven, beobachtenden multizentrischen Studie, dass die Bestimmung der GcfDNA im Plasma mittels ddPCR eine sensitive und eine um bis zu zwei Wochen frühere Unterscheidung der Patienten mit einer akuten zellulären Abstoßung nach Lebertransplantation als die konventionellen Leberfunktionstests ermöglicht. Zudem könnte die GcfDNA-Bestimmung dabei helfen, eine effektive personalisierte Immunsuppression für den Patienten zu ermöglichen. Weitere Studien werden benötigt, die idealerweise Protokollbiopsien umfassen sollten, um den praktischen Nutzen von GcfDNA-Bestimmungen in der Behandlung von lebertransplantierten Patienten noch weiter zu verifizieren.

## 6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich bei der GcfDNA um einen vielversprechenden Biomarker nach einer Lebertransplantation handelt. Dabei wurden 115 Patienten aus drei Transplantationszentren über einen Zeitraum von bis zu einem Jahr beobachtet sowie GcfDNA-Messungen analysiert. Die GcfDNA wurde unter der Verwendung der digitalen Tropfen-PCR bei der Firma Chronix in Göttingen mit der dort entwickelten Methode bestimmt (Beck et al. 2013b).

In den Auswertungen zeigten sich in der frühen postoperativen Phase erhöhte GcfDNA-Werte (>50%). Dies könnte durch eine Transplantatschämie sowie einen Reperfusionsschaden mitbedingt sein. Die GcfDNA sank jedoch bei Patienten mit einem komplikationslosen Verlauf innerhalb von 7-10 Tagen postoperativ auf Werte unter <10%. Des Weiteren wurden in dieser Studie Kriterien festgelegt, um eine Kategorisierung der GcfDNA-Messungen sowie der konventionellen Lebertests in Subgruppen zu ermöglichen. Anhand dieser Kriterien erfolgte die Probenzuordnung entweder in die Gruppen der stabilen Transplantatfunktion, der HCV+-Patienten oder der Patienten mit einer akuten histologisch gesicherten Abstoßung, um eine Gegenüberstellung sowie weitere Analysen zu ermöglichen. Dabei zeigten sich für die GcfDNA weniger Überlappungen zwischen den definierten Gruppen im Vergleich zu den konventionellen Lebertests. Zudem zeigte die GcfDNA in der ROC-Analyse zwischen Proben von Patienten mit einer stabilen Transplantatfunktion und Proben während einer histologisch gesicherten Abstoßung die beste diagnostische Genauigkeit mit einer AUC bei 96,5 % im Vergleich zu den konventionellen Lebertests. Es konnten auch bei fünf Patienten erhöhte Werte für die GcfDNA schon bis zu 15 Tage vor einer histologisch gesicherten Abstoßung beobachtet werden. Auch wiesen Patienten mit Komplikationen erhöhte GcfDNA-Werte auf, wenn ein Transplantatschaden anzunehmen ist.

Hinsichtlich der klinischen Validität zeigen die Ergebnisse die Nützlichkeit der GcfDNA als Biomarker in der Diagnosestellung, der Differenzialdiagnose sowie der Therapie und des Therapieerfolgs bei Patienten nach einer Lebertransplantation. Weitere Studien sind nötig, um den praktischen Nutzen der GcfDNA als zusätzlichen Marker in der Transplantationsmedizin zu ermitteln und dem Patienten zu einer optimalen Therapie zu verhelfen.

## 7 Anhang

### 7.1 Informations- und Einwilligungsbogen für die durchgeführte Studie

Allgemein- und Viszeralchirurgie, Prof. Dr. med. M. Ghadimi,  
Robert-Koch-Str. 40, 37075 Göttingen

Zentrum 8 Chirurgie  
Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Ghadimi

37099 Göttingen **Briefpost**  
Robert-Koch-Straße 40, 37075 Göttingen **Adresse**  
0551 39-8730 **Telefon**  
**0551 396104 Sekretariat**  
0551 39-6106 **Fax**  
mghadim@chirurgie-goettingen.de **E-Mail**

#### Ihre Ansprechpartner für die vorliegende Studie:

Herr Prof. Dr. med. O. Kollmar  
Anschrift wie oben, Tel.: 0551/39-6736  
Herr Dr. med. J. Gaedcke  
Anschrift wie oben, Tel.: 0551/39-6944

Göttingen, den 22. April 2013

### INFORMATION FÜR PATIENTEN ZUR WISSENSCHAFTLICHEN STUDIE MIT DEM TITEL:

### PERSONALISIERTE IMMUNSUPPRESSION NACH ORGANTRANSPLANTATION: EINE BEOBACHTUNGSSTUDIE ZUM NUTZEN UND ZU THERAPEUTISCHEN BEREICHEN INNOVATIVER BIOMARKER

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

wenn Sie dieses Schreiben lesen, wurden Sie bereits zuvor angesprochen, an einer wissenschaftlichen Untersuchung zur Immunsuppression (Unterdrückung der Organabstoßung) nach Organtransplantation und zur Früherkennung von Abstoßungsreaktionen mittels der Bestimmung von zirkulierenden Nukleinsäuren teilzunehmen. Wir möchten Sie einladen, an unserer Studie teilzunehmen. Der nachfolgende Text soll Ihnen alle wichtigen Informationen zu dieser Studie schriftlich erläutern.

Ihre Teilnahme an dieser Studie ist freiwillig. Dies bedeutet, dass Sie nur dann in diese Studie aufgenommen werden, wenn Sie Ihre schriftliche Einwilligung erklären. Wie immer bei medizinischer Forschung können Sie die Teilnahme an dieser Studie jederzeit widerrufen.

#### Warum wird die Studie durchgeführt?

Nach einer Organtransplantation kommt es aufgrund der Immunreaktion des Körpers gegen das neue Organ zu einer Abstoßungsreaktion. Aus diesem Grund müssen Patienten in der Regel mehrere Medikamente einnehmen, sogenannte Immunsuppressiva, welche die Abstoßung des neuen Organs verhindern sollen. Gegen diese Abstoßung möchte man den Patienten so wenig Immunsuppressiva wie möglich verordnen, da diese Medikamente Nebenwirkungen haben können. Die erforderliche Menge (Dosierung) der Medikamente ist bei den Patienten sehr unterschiedlich. Ziel ist es nach Transplantation für

jeden Patienten eine optimierte Behandlung mit immunsuppressiven Medikamenten anzubieten, wie der Titel unserer Studie sagt, eine personalisierte Immunsuppression.

Bei dieser personalisierten Immunsuppression werden bereits seit langem regelmäßig Laborwerte verwendet, um die richtige Dosis zu finden. Hierfür wird die Konzentration der Medikamente im Blut gemessen, um zu sehen, ob die Medikamente gut in den Körper aufgenommen werden und so ausreichend wirken können. In den letzten Jahren haben wir aber viele Hinweise dafür bekommen, dass es eine ganze Reihe weiterer Labortests gibt, die möglicherweise in Zukunft noch besser helfen können, eine individualisierte Immunsuppression durchzuführen. Wir wissen aber noch nicht, wie zuverlässig diese Laborwerte tatsächlich sind und möchten deshalb diese Laborwerte anhand Ihrer Blutproben messen und mit den Informationen zu Ihrer Gesundheit vergleichen.

Genauer gesagt soll die Studie zur Klärung beitragen, ob Messungen der immunsuppressiven Medikamente in Ihren weißen Blutzellen helfen können, die minimal notwendige Dosis immunsuppressiver Medikamente für jeden einzelnen Patienten zu finden. Außerdem sollen weitere Laborwerte zur Aktivität Ihres Immunsystems gemessen werden und molekulargenetische Tests, die wahrscheinlich in Zukunft helfen können, Organabstoßung, Infektionsrisiko sowie Medikamentenwirkungen vorauszusagen, so dass man diese Tests dann zur weiteren Verbesserung der Behandlung verwenden kann. Hierzu zählt insbesondere die Bestimmung von zirkulierenden Nukleinsäuren, die mit der Anzahl der geschädigten Zellen des transplantierten Organs korreliert.

Diese Blutabnahmen und -untersuchungen sollen im Rahmen Ihrer ohnehin nötigen Kontrolluntersuchungen erfolgen. Keine zusätzlichen Untersuchungszeitpunkte sind vorgesehen.

### **Was geschieht bei der Studie?**

Bei dieser Studie handelt es sich um eine sogenannte Beobachtungsstudie. Dies bedeutet, dass Ihre Behandlung während der Studie genauso sein wird wie es ohnehin der Fall wäre und nach gegenwärtigem Stand der Medizin der Fall sein muss. Sie erhalten also genau die Therapie, wie sie von Ihrem behandelnden Arzt nach gründlicher Überlegung und bestem medizinischen Wissen gewählt wird.

Im Rahmen der Studie möchten wir aber eine Reihe von Daten aus Ihrer Krankenakte aufnehmen sowie Ihr Blut auf die neuen Laborwerte hin untersuchen. Für die Blutuntersuchungen werden wir im Rahmen der ohnehin stattfindenden Blutuntersuchungen zusätzlich die Menge von 25 ml Blut entnehmen. Diese Blutentnahmen werden während der gesamten Studie sieben Mal sowie bei Komplikation stattfinden. In den ersten 14 Tagen Ihres Krankenhausaufenthaltes nach Transplantation (oder weniger, falls Sie früher entlassen werden können) möchten wir zusätzlich zu den genannten 25 ml täglich 5 ml Blut abnehmen. Sollten Sie länger als 14 Tage im Krankenhaus verweilen würden wir ab dem Tag 15 bis zur Entlassung alle drei Tage 5 ml Blut abnehmen. Auch bei Komplikationen in der Zeit nach der Transplantation würden wir 10 ml extra Blut abnehmen. Die Gesamtmenge pro Abnahme beträgt etwa 0,5% der Blutmenge des Körpers, so dass diese zusätzliche Entnahme keine medizinischen Folgen und auch keine Folgen für Ihr Wohlbefinden hat.

Sofern es im folgenden Jahr nach der Organtransplantation nicht zu Erkrankungen (Infektionen, Abstoßungsreaktionen oder anderes) kommt, müssen Sie zu regelmäßigen Terminen in die Nachsorge kommen. Genau an diesen Terminen, die alle im Rahmen der normalen Nachsorge nach einer

Organtransplantation stattfinden, also unabhängig von Ihrer Studienteilnahme, erfolgen dann die zusätzliche Dokumentationen Ihrer Gesundheit und die Blutuntersuchungen.

Welche Daten werden von Ihnen gespeichert? Hierbei handelt es sich um:

- alle von Ihnen eingenommen Medikamente nach der Transplantation
- alle Hinweise bezüglich einer Infektion oder Abstoßungsreaktion
- Laborwerte, die für die individuelle Behandlung mit immunsuppressiven Medikamenten wichtig sein können (Herzwerte, Leberwerte, Nierenwerte, Blutbild, Cholesterin, Zucker)
- übliche medizinische Messgrößen Ihres Gesundheitszustand (z.B. Blutdruck, Körpertemperatur)

In Ihrem Blut wird im Rahmen der Studie zusätzlich untersucht:

- die Konzentrationen der Medikamente innerhalb der Immunzellen
- Laborwerte, welche die Aktivität Ihrer Immunzellen wiedergeben und die Hinweise zu beginnenden Abstoßungen oder Infektionen geben können
- So genannte zirkulierende DNA (zirkulierende Nukleinsäuren), das ist Erbsubstanz, die ins Blut abgegeben wird, wenn irgendwo im Körper Zellen absterben (z.B. bei einer Organabstoßung). Hierfür sind auch die oben genannten zusätzlichen 10 ml Blut bestimmt.
- Varianten der Gene, die für das Risiko der Organabstoßung, der Infektionserkrankung und der Wirkung und Verträglichkeit immunsuppressiver Medikamente von Bedeutung sein können

Die Blutprobe und die studienrelevanten Daten werden an der Universitätsmedizin Göttingen gespeichert. Dort werden auch die meisten der Laboranalysen durchgeführt und Ihre kodierten (pseudoanonymisierten) Daten gespeichert und gemeinsam mit den Ärzten und Wissenschaftlern aus unserer Klinik ausgewertet.

### **Welchen persönlichen Nutzen habe ich von der Teilnahme an der Studie?**

Im Rahmen dieser Studie sollen Daten erfasst, welche möglicherweise in Zukunft helfen können, die immunsuppressive Therapie nach einer Transplantation zu verbessern. Kurzfristig können wir Ihnen aus der vorliegenden Studie keinen konkreten persönlichen Nutzen versprechen. Da wir gegenwärtig ja noch nicht wissen, ob die neuen Laborwerte wirklich helfen, die Einstellung der Therapie zu verbessern, werden wir die Ergebnisse auch noch nicht in Ihrer Behandlung einfließen lassen können. Erst nach Abschluss der Untersuchung in etwa 2 Jahren werden wir über die Ergebnisse Bescheid wissen. Über die Ergebnisse der Studie, werden wir Sie dann gerne informieren.

### **Welche Belastungen und Risiken sind mit der Teilnahme an der Untersuchung verbunden?**

Die Risiken durch die zusätzlich entnommenen Blutmengen sind sehr gering. Es ist aber denkbar, dass Ihnen durch Zuschauen bei der Blutabnahme einmal übel werden könnte und dass es dadurch, dass die Blutabnahme etwa 1 Minuten länger dauert, Blutergüsse (blaue Flecken) an der Entnahmestelle auftreten. Grundsätzlich können bei allen Blutabnahmen in sehr seltenen Fällen einmal ernstere Infektionen oder auch bleibende Schäden von Nerven auftreten, die an der Entnahmestelle verlaufen. Das Risiko derartiger

ernsterer Schäden ist aber sehr gering, etwa in der Häufigkeit von einer unter einer Million Blutnahmen und an unserer Klinik sind derartige Schäden noch nie aufgetreten.

### **Was geschieht mit Ihren Daten?**

**Sofern Sie bereit sind, an dieser Beobachtungsstudie teilzunehmen, werden Ihre Daten in der Universitätsmedizin Göttingen gespeichert und von uns ausgewertet, mit dem Ziel eine in Zukunft bessere und individuell angepasste Therapie nach Transplantationen anzubieten.**

**Für die wissenschaftliche Auswertung werden nur Daten verwendet, aus denen Niemand Rückschlüsse auf Ihre Person ziehen kann. Man spricht hierbei von einer Pseudoanonymisierung, das heißt, Ihre Daten werden für die wissenschaftliche Auswertung unter einer Codenummer auf Papier und in einer elektronischen Datenbank gespeichert, ohne Hinweis auf Ihren Namen, Ihren Wohnort oder andere persönliche Daten.**

**Ein wichtiges Prinzip heutiger medizinischer Forschung ist die sorgfältige Kontrolle aller Daten. Dafür bitten wir um Ihr Einverständnis, dass eine Person, die nicht unserer Chirurgischen Klinik angehört, ein so genannter Monitor, die Studiendaten mit Ihren Krankenakten vergleicht und alles auf Richtigkeit überprüft. Dieser Monitor unterliegt selbstverständlich der Schweigepflicht.**

**Alle Ihre persönlichen Daten werden spätestens 15 Jahre nach Ende der Untersuchung gelöscht. Sie können jederzeit Informationen dazu erhalten, welche Daten von Ihnen gespeichert wurden und Sie können jederzeit die Löschung Ihrer persönlichen Daten verlangen. Wenden Sie sich in diesem Falle an das Sekretariat unserer Klinik oder die weiter unten genannte Person.**

### **Was geschieht mit Ihren Blutproben?**

Die Blutproben werden an die Abteilung für Klinische Chemie der Universitätsmedizin Göttingen geschickt. Dort werden die Blutproben codiert, also ohne Hinweise auf Ihre Person, und vor unberechtigtem Zugriff verschlossen gelagert. Es werden aus den Blutproben ausschließlich solche Laboruntersuchungen durchgeführt, die dazu beitragen, die Behandlung von Patienten nach Organtransplantation zu verbessern. Soweit es sich um sehr spezielle Laboruntersuchungen hat, bitten wir Sie um Ihre Zustimmung, dass wir die Blutproben auch an externe Labors weiterleiten dürfen, wenn wir die Analysen nicht hier durchführen können und diese sehr interessante Ergebnisse versprechen. Gegenwärtig sollen die Untersuchungen in den Labors der UMG gemacht werden. Spezielle Untersuchungen zur zirkulierenden DNA werden zudem in den Göttinger Labors der Firma Chronix Biomedical (verantwortlich dort: Herr PD Dr. E. Schütz) durchgeführt. Die Messungen spezifischer Immunproteine (Zytokine) soll in der Abteilung Transplantationsimmunologie der Medizinischen Hochschule Hannover (verantwortlich dort: Frau Prof. Dr. Falk) erfolgen. Die Weitergabe würde wiederum ausschließlich in codierter Weise erfolgen und die Auswertung bleibt in der Verantwortung der Personen, die Ihnen bekannt sind bzw. die Ihnen hier in diesem Dokument genannt werden. Zu den Laboruntersuchungen gehören auch so genannte pharmakogenomische Untersuchungen. Das bedeutet, dass mit modernen Methoden der Genanalyse untersucht wird, ob es Genvarianten gibt, die in Zukunft helfen können, die Auswahl und Dosierung von

Medikamenten zu verbessern. Auch zu diesen Analysen können Sie Ihre persönlichen Daten einsehen, wenn Sie dies möchten. Allerdings ist vor der Einsicht in Ihre pharmakogenomischen Daten eine Beratung erforderlich, bitte wenden Sie sich in diesem Falle ebenfalls an unser Sekretariat oder die unten genannten Ärzte. Genau wie die medizinischen Daten werden die Blutproben ausschließlich unter Codenummern (pseudonymisiert) gelagert und sofern sie nicht für die zunächst vorgesehenen Untersuchungen komplett verbraucht werden, weiterhin für einen Zeitraum von höchstens 15 Jahren gelagert und ausschließlich für Untersuchungen in der gleichen Zielrichtung wie oben dargestellt (Verbesserung der Behandlung von Patienten nach Organtransplantationen) wissenschaftlich verwendet.

### **Widerruf der Teilnahme**

Sie können Ihre weitere Teilnahme an unserer Studie jederzeit beenden. Wenn Sie nicht weiter teilnehmen möchten, können Sie entscheiden, ob die bis dahin gespeicherten Daten und Blutproben weiterhin für das Forschungsprojekt verwendet werden dürfen oder nicht. Sie können also jederzeit die Vernichtung der

Daten und Blutproben verlangen. Wenden Sie sich in diesem Falle an das Sekretariat unserer Klinik oder gern auch an den für die Datenspeicherung an der Universität Göttingen verantwortlichen Arzt, Herrn Prof. Dr. med. Brockmüller, Abteilung Klinische Pharmakologie, Telefon 0551 395311, der dann gegebenenfalls zusammen mit den Ärzten unserer Klinik die von Ihnen gewünschten Maßnahmen treffen wird.

### **An wen wende ich mich bei weiteren Fragen?**

Sofern Sie nach Lesen dieser Information weitere Fragen haben, wenden Sie sich bitte zunächst an die Ärzte, die an unserer Klinik für Ihre Behandlung zuständig sind. Darüber hinaus können Sie sich telefonisch, per Post, oder per e-mail an Herrn Prof. Brockmüller wenden, der für organisatorische Aspekte der Studie verantwortlich ist:

Prof. Dr. med. Jürgen Brockmüller, Universitätsmedizin Göttingen  
Robert-Koch-Straße 40, 37075 Göttingen  
Tel: 0551 39 5311 (Sekretariat, außerhalb Dienstzeiten Anrufbeantworter); Fax: 0551 39 12767  
E-Mail: jbrockm@gwdg.de.

Eine Kopie dieses Informationsschreibens verbleibt bei Ihnen.

Wir danken Ihnen für Ihr Interesse.

Ihr Studienteam



## 8 Literaturverzeichnis

- Allison AC, Eugui EM (2000): Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 47, 85–118
- American Society of Nephrology (2005): American Society of Nephrology Renal Research Report. *J Am Soc Nephrol* 16, 1886–1903
- Armstrong VW, Oellerich M (2001): New developments in the immunosuppressive drug monitoring of cyclosporine, tacrolimus, and azathioprine. *Clin Biochem* 34, 9–16
- Arnaud CH (2018): Uncovering the hidden signs of organ transplant rejection Researchers are discovering and testing biomarkers to help guide treatment and improve long-term outcomes for transplant patients. *Chem Eng News* 96, 26–30
- Ashoor G, Syngelaki A, Poon LCY, Rezende JC, Nicolaides KH (2013): Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol* 41, 26–32
- Beck J, Bierau S, Balzer S, Andag R, Kanzow P, Hennecke J, Schmitz J, Gaedcke J, Moerer O, Slotta JE, et al. (2013a): Rapid and Cost Effective Measurement of Circulating Cell Free Graft DNA for the Early Detection of Liver Transplant Rejection. *Clin Chem* 59, Supplement A27
- Beck J, Bierau S, Balzer S, Andag R, Kanzow P, Schmitz J, Gaedcke J, Moerer O, Slotta JE, Walson P, et al. (2013b): 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* 59, 1732–1741
- Beck J, Schmitz J, Kanzow P, Kollmar O, Oellerich M, Schütz E (2014): Absolute quantification of graft derived cell-free DNA (GcfDNA) early after liver transplantation (LTx) using droplet digital PCR. *Clin Chem* 60(10) 5–194
- Beck J, Oellerich M, Schulz U, Schauerte V, Reinhard L, Fuchs U, Knabbe C, Zittermann A, Olbricht C, Gummert JF, et al. (2015): Donor-Derived Cell-Free DNA Is a Novel Universal Biomarker for Allograft Rejection in Solid Organ Transplantation. *Transplant Proc* 47, 2400–2403

- Blair JE, Kusne S (2005): Bacterial, mycobacterial, and protozoal infections after liver transplantation—Part I. *Liver Transpl* 11, 1452–1459
- Bloom RD, Bromberg JS, Poggio ED, Bunnapradist S, Langone AJ, Sood P, Matas AJ, Mehta S, Mannon RB, Sharfuddin A, et al. (2017): Cell-Free DNA and Active Rejection in Kidney Allografts. *J Am Soc Nephrol* 28, 2221–2232
- Bruhn HD, Koberstein R: Enzymaktivitätsbestimmungen, Photometrische Bestimmungen diagnostisch wichtiger Metabolite. In: Bruhn HD, Junker R, Schäfer H, Schreiber S (Hrsg.): *LaborMedizin: Indikationen, Methodik und Laborwerte Pathophysiologie und Klinik*. 3. Auflage; Schattauer, Stuttgart 2011, 86-101
- Burton JR, Rosen HR (2006): Acute rejection in HCV-infected liver transplant recipients: The great conundrum. *Liver Transpl* 12, S38-47
- Calne RY, Thiru S, McMaster P, Craddock GN, White DJG, Evans DB, Dunn DC, Pentlow BD, Rolles K (1978): Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet* 312, 1323–1327
- Clipstone NA, Crabtree GR (1992): Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 357, 695–697
- Crettol S, Venetz J-P, Fontana M, Aubert J-D, Ansermot N, Fathi M, Pascual M, Eap CB (2008): Influence of ABCB1 genetic polymorphisms on cyclosporine intracellular concentration in transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics* 18, 307–315
- Demetris AJ, Batts KP, Dhillon AP, Ferrell L, Fung J, Geller SA, Hart J, Hayry P, Hofmann WJ et al. (1997): Banff schema for grading liver allograft rejection: An international consensus document. *Hepatology* 25, 658–663
- Derosa G, Maffioli P: Traditional Markers in Liver Disease. In: Patel VB, Preedy VR (Hrsg.): *Biomarkers in Liver Disease, Biomarkers in Disease: Methods, Discoveries and Applications*. Springer Science+Business Media, Dordrecht 2017, 1-22
- Dessilly G, Elens L, Panin N, Capron A, Decottignies A, Demoulin J-B, Haufroid V (2014): ABCB1 1199G>A genetic polymorphism (Rs2229109) influences the intracellular accumulation of tacrolimus in HEK293 and K562 recombinant cell lines. *PLoS ONE* 9, e91555
- De Vlaminc I, Valantine HA, Snyder TM, Strehl C, Cohen G, Luikart H, Neff NF, Okamoto J, Bernstein D, Weisshaar D, et al. (2014): Circulating cell-free DNA enables noninvasive diagnosis of heart transplant rejection. *Sci Transl Med* 6, 241ra77

- De Vlaminck I, Martin L, Kertesz M, Patel K, Kowarsky M, Strehl C, Cohen G, Luikart H, Neff NF, Okamoto J, et al. (2015): Noninvasive monitoring of infection and rejection after lung transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 13336–1334
- [https://www.dso.de/uploads/tx\\_dsodl/JB\\_2017\\_web\\_01.pdf](https://www.dso.de/uploads/tx_dsodl/JB_2017_web_01.pdf); Zugriff am 12.04.2018
- Dufor DR: Liver disease. In: Burtis CA, Ashwood ER, Brund DE, Editors (Hrsg.): *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. Elsevier Health Sciences, London 2012, 700-723
- Elens L, Capron A, Kerckhove VV, Lerut J, Mourad M, Lison D, Wallemacq P, Haufroid V (2007): 1199G>A and 2677G>T/A polymorphisms of ABCB1 independently affect tacrolimus concentration in hepatic tissue after liver transplantation. *Pharmacogenet Genomics* 17, 873–883
- Engelmann G: Biomarkers in Focus: Alanine Aminotransferase. In: Patel VB, Preedy VR (Hrsg.): *Biomarkers in Liver Disease*. Springer Science+Business Media, Dordrecht 2017, 267-280
- European Liver Transplant Registry - ELTR. <http://www.eltr.org/>; Zugriff am 24.04.2018
- Falck P, Asberg A, Guldseth H, Bremer S, Akhlaghi F, Reubsæet JLE, Pfeffer P, Hartmann A, Midtvedt K (2008): Declining intracellular T-lymphocyte concentration of cyclosporine a precedes acute rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation* 85, 179-184
- Ganschow R, Pollok J-M, Jankofsky M, Junge G (2014): The role of everolimus in liver transplantation. *Clin Exp Gastroenterol* 7, 329-343
- Gielis EM, Ledeganck KJ, De Winter BY, Del Favero J, Bosmans J-L, Claas FHJ, Abramowicz D, Eikmans M (2015): Cell-Free DNA: An Upcoming Biomarker in Transplantation. *Am J Transplant* 15, 2541–2551
- Gordon PMK, Khan A, Sajid U, Chang N, Suresh V, Dimnik L, Lamont RE, Parboosingh JS, Martin SR, Pon RT, et al. (2016): 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* 3, 33
- Grskovic M, Hiller DJ, Eubank LA, Sninsky JJ, Christopherson C, Collins JP, Thompson K, Song M, Wang YS, Ross D, et al. (2016): Validation of a Clinical-Grade Assay to Measure Donor-Derived Cell-Free DNA in Solid Organ Transplant Recipients. *J Mol Diagn* 18, 890–902

- Halloran PF (1996): Molecular mechanisms of new immunosuppressants. *Clin Transplant* 10, 118–123
- Hartmann B, Schmid G, Graeb C, Bruns CJ, Fischereeder M, Jauch K-W, Heeschen C, Guba M (2005): Biochemical monitoring of mTOR inhibitor-based immunosuppression following kidney transplantation: a novel approach for tailored immunosuppressive therapy. *Kidney Int* 68, 2593–2598
- Hidestrand M, Tomita-Mitchell A, Hidestrand PM, Oliphant A, Goetsch M, Stamm K, Liang H-L, Castleberry C, Benson DW, Stendahl G, et al. (2014): Highly sensitive noninvasive cardiac transplant rejection monitoring using targeted quantification of donor-specific cell-free deoxyribonucleic acid. *J Am Coll Cardiol* 63, 1224–1226
- Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, Bright IJ, Lucero MY, Hiddessen AL, Legler TC, et al. (2011): High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem* 83, 8604–8610
- Hoerning A, Wilde B, Wang J, Tebbe B, Jing L, Wang X, Jian F, Zhu J, Dolff S, Kribben A, et al. (2015): Pharmacodynamic monitoring of mammalian target of rapamycin inhibition by phosphoflow cytometric determination of p70S6 kinase activity. *Transplantation* 99, 210–219
- Kamm RC, Smith AG (1972): Nucleic Acid Concentrations in Normal Human Plasma. *Clin Chem* 18, 519–522
- Kanzow P, Kollmar O, Schütz E, Oellerich M, Schmitz J, Beck J, Walson PD, Slotta JE (2014): Graft-derived cell-free DNA as an early organ integrity biomarker after transplantation of a marginal HELLP syndrome donor liver. *Transplantation* 98, e43-45
- Kershner RP, Fitzsimmons WE (1996): Relationship of FK506 whole blood concentrations and efficacy and toxicity after liver and kidney transplantation. *Transplantation* 62, 920–926
- Kim WR, Lake JR, Smith JM, Skeans MA, Schladt DP, Edwards EB, Harper AM, Wainright JL, Snyder JJ, Israni AK, Kasiske BL (2016): Liver. *Am J Transplant* 16 Suppl 2, 69–98
- Krämer BK, Zülke C, Kammerl MC, Schmidt C, Hengstenberg C, Fischereeder M, Marienhagen J, European Tacrolimus vs. Cyclosporine Microemulsion Renal Transplantation Study Group (2003): Cardiovascular risk factors and estimated risk for CAD in a randomized trial comparing calcineurin inhibitors in renal transplantation. *Am J Transplant* 3, 982–987

- Lemaitre F, Blanchet B, Latournerie M, Antignac M, Houssel-Debry P, Verdier M-C, Dermu M, Camus C, Le Priol J, Roussel M, et al. (2015): Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in liver transplant recipients: inside the white blood cells. *Clin Biochem* 48, 406–411
- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ (1977): Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. *Cancer Res* 37, 646–650
- Levitsky J, Goldberg D, Smith AR, Mansfield SA, Gillespie BW, Merion RM, Lok ASF, Levy G, Kulik L, Abecassis M et al. (2017): Acute Rejection Increases Risk of Graft Failure and Death in Recent Liver Transplant Recipients. *Clin Gastroenterol Hepatol* 15(4), 584-593
- Lo YM, Tein MS, Pang CC, Yeung CK, Tong KL, Hjelm NM (1998): Presence of donor-specific DNA in plasma of kidney and liver-transplant recipients. *Lancet* 351, 1329–1330
- Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM (1999): Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 64, 218–224
- Mandel P, Metais P (1948): Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil* 142 (3-4), 241-243.
- Méndez-Sánchez N, Vítek L, Aguilar-Olivos NE, Uribe M: Bilirubin as a Biomarker in Liver Disease. In: Patel VB, Preedy VR (Hrsg.): *Biomarkers in Liver Disease*. Springer Science+Business Media, Dordrecht 2017, 281-304
- Noceti OM, Woillard J-B, Boumediene A, Esperón P, Taupin J-L, Gerona S, Valverde M, Touriño C, Marquet P (2014): Tacrolimus pharmacodynamics and pharmacogenetics along the calcineurin pathway in human lymphocytes. *Clin Chem* 60, 1336–1345
- Oellerich M, Schütz E, Kanzow P, Schmitz J, Beck J, Kollmar O, Streit F, Walson PD (2014): Use of graft-derived cell-free DNA as an organ integrity biomarker to reexamine effective tacrolimus trough concentrations after liver transplantation. *Ther Drug Monit* 36, 136–140
- Oellerich M, Beck J, Kanzow P, Schmitz J, Kollmar O, Walson PD, Schütz E: Graft-derived cell-free DNA as a marker of graft integrity after transplantation. In: Oellerich M, Dasgupta A (Hrsg.): *Personalized immunosuppression in transplantation. Role of Biomarker Monitoring and Therapeutic Drug Monitoring*. Elsevier Science, Amsterdam 2016a, 153-176
- Oellerich M, Walson PD, Beck J, Schmitz J, Kollmar O, Schütz E (2016b): Graft-Derived Cell-Free DNA as a Marker of Transplant Graft Injury. *The Drug Monit* 38 Suppl 1, S9-75

- Oxnard GR, Paweletz CP, Kuang Y, Mach SL, O'Connell A, Messineo MM, Luke JJ, Butaney M, Kirschmeier P, Jackman DM, Jänne PA (2014): Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA. *Clin Cancer Res* 20, 1698–1705
- Pichlmayr R, Ringe B, Gubernatis G, Hauss J, Bunzendahl H Transplantation einer Spenderleber auf zwei Empfänger (Splitting-Transplantation) - Eine neue Methode in der Weiterentwicklung der Lebersegmenttransplantation. *Langenbecks Arch Chiv* 373, 127–130
- Pratt DS, Kaplan MM (2000): Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. *N Engl J Med* 342, 1266–1271
- Raia S, Nery J, Mies S (1989): Liver transplantation from live donors. *Lancet* 334, 497
- Regev A, Berho M, Jeffers LJ, Milikowski C, Molina EG, Pyrsopoulos NT, Feng Z-Z, Reddy KR, Schiff ER (2002): Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *Am J Gastroenterol* 97, 2614–2618
- Rianthavorn P, Ettenger RB, Malekzadeh M, Marik JL, Struber M (2004): Noncompliance with immunosuppressive medications in pediatric and adolescent patients receiving solid-organ transplants. *Transplantation* 77, 778–782
- Richtlinie gemäß § 16 Abs. 1 S. 1 Nr. 1 TPG für die Regeln zur Feststellung des Todes nach § 3 Abs. 1 S. 1 Nr. 2 TPG und die Verfahrensregeln zur Feststellung des endgültigen, nicht behebbaren Ausfalls der Gesamtfunktion des Großhirns, des Kleinhirns und des Hirnstamms nach § 3 Abs. 2 Nr. 2 TPG, Vierte Fortschreibung - irrev.Hirnfunktionsausfall.pdf.  
[http://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user\\_upload/downloads/irrev.Hirnfunktionsausfall.pdf](http://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/downloads/irrev.Hirnfunktionsausfall.pdf); Zugriff am 25.07.2018
- Rodríguez-Perálvarez M, Germani G, Darius T, Lerut J, Tsochatzis E, Burroughs AK (2012): Tacrolimus trough levels, rejection and renal impairment in liver transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Am J Transplant* 12, 2797–2814
- Rodríguez-Perálvarez M, Germani G, Papastergiou V, Tsochatzis E, Thalassinou E, Luong TV, Rolando N, Dhillon AP, Patch D, O'Beirne J, et al. (2013): Early tacrolimus exposure after liver transplantation: relationship with moderate/severe acute rejection and long-term outcome. *J Hepatol* 58, 262–270

- Schütz E, Fischer A, Beck J, Harden M, Koch M, Wuensch T, Stockmann M, Nashan B, Kollmar O, Matthaei J, Kanzow P, Walson P, Brockmöller J, Oellerich M (2017): Graft-derived cell-free DNA, a noninvasive early rejection and graft damage marker in liver transplantation: A prospective, observational, multicenter cohort study. *PLoS Med* 14, e1002286
- Seehofer D, Schöning W, Neuhaus P (2013): Lebertransplantation mit postmortalen Organen. *Chirurg* 84, 391–397
- Snyder TM, Khush KK, Valantine HA, Quake SR (2011): Universal noninvasive detection of solid organ transplant rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 6229–6234
- Starzl TE, Marchioro TL, Kaulla KNV, Hermann G, Brittain RS, Waddell WR (1963): Homotransplantation of the liver in humans. *Surg Gynecol Obstet* 117, 659–676
- Streit F, Armstrong VW, Oellerich M (2002): Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry routine method for simultaneous determination of sirolimus, everolimus, tacrolimus, and cyclosporin A in whole blood. *Clin Chem* 48, 955–958
- Sun K, Jiang P, Chan KCA, Wong J, Cheng YKY, Liang RHS, Chan W, Ma ESK, Chan SL, Cheng SH, et al. (2015): Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, E5503-5512
- Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG (1966a): Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 45, 1732–1740
- The National Institutes of Health (NIH) Consensus Development Program: Liver Transplantation. <https://consensus.nih.gov/1983/1983livertransplantation036html.htm>; Zugriff am 12.04.2018
- TPG - Gesetz über die Spende, Entnahme und Übertragung von Organen und Geweben. <https://www.gesetze-im-internet.de/tpg/BJNR263100997.html>; Zugriff am 12.04.2018
- Turner AP, Knechtle SJ (2013): Induction immunosuppression in liver transplantation: a review. *Transpl Int* 26, 673–683
- Vassalli G, Kaski JC, Tousoulis D, Kiowski W, Turina M, Follath F, Gallino A (1996): Low-dose cyclosporine treatment fails to prevent coronary luminal narrowing after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 15, 612–619

- Wiesner RH, Demetris AJ, Belle SH, Seaberg EC, Lake JR, Zetterman RK, Everhart J, Detre KM (1998): Acute hepatic allograft rejection: Incidence, risk factors, and impact on outcome. *Hepatology* 28, 638–645
- Wong D, Moturi S, Angkachatchai V, Mueller R, DeSantis G, van den Boom D, Ehrich M (2013): Optimizing blood collection, transport and storage conditions for cell free DNA increases access to prenatal testing. *Clin Biochem* 46, 1099–1104
- Yazigi NA (2013): Long Term Outcomes after Pediatric Liver Transplantation. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr* 16(4), 207–218

**Danksagung**

Zuallererst möchte ich Herrn Professor Dr. Dr. Oellerich herzlich danken, für die Vergabe des überaus interessanten Forschungsthemas, für seine über viele Jahre reichende kontinuierliche und stets hervorragende Unterstützung bei der Anfertigung dieser Dissertation sowie eine beispielgebende großartige Betreuung während der Durchführung und Auswertung der Studienergebnisse. Besonders danken möchte ich auch für die Ermöglichung der erfolgreichen Publikation.

Herrn Markus Harden danke ich für die umfangreiche Betreuung in allen Fragen zur medizinischen Statistik.

Danken möchte ich auch Herrn Professor Dr. Schütz, Frau Dr. Beck und der Firma Chronix Biomedical in Göttingen für die Analysen der GcfDNA-Proben sowie der guten Zusammenarbeit über die Jahre.

Ein Dank gilt auch Herrn Dr. Kanzow für die Einarbeitung in die Studie und die Betreuung während der Zeit.

Frau Zimara danke ich als Sekretärin von Herrn Professor Dr. Dr. Oellerich für die stets vorbildhafte Kommunikation.