

Aus dem Klinikum Stuttgart
Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen
Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin mit Laborpraxis
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. E. Wieland

**Zirkulierende freie DNA aus dem Transplantat als
Biomarker für den Organschaden in der frühen Phase nach
Nierentransplantation**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Verena Schauerte

aus

Darmstadt

2020

Dekan: Prof. Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Wieland

2. Berichterstatter: Prof. Dr. S. Nadalin

Tag der Disputation: 14.06.2021

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Immunsuppression nach Nierentransplantation	1
1.1.1	Induktionstherapie	1
1.1.1.1	Basiliximab	1
1.1.1.2	Thymoglobulin	2
1.1.2	Erhaltungstherapie	3
1.1.2.1	Kortikosteroide	4
1.1.2.2	Tacrolimus	4
1.1.2.3	Mycophenolat	5
1.1.3	Grenzen der immunsuppressiven Therapie	6
1.2	Monitoring der Transplantatnierenfunktion	7
1.2.1	Möglichkeiten der Abschätzung der Nierenfunktion	7
1.2.2	Nierenbiopsie	8
1.2.3	Therapeutisches Drugmonitoring von Immunsuppressiva	9
1.2.4	Weitere laborchemische Möglichkeiten zum Monitoring der Transplantatnierenfunktion	10
1.3	Zellfreie DNA	12
1.3.1	Zellfreie zirkulierende DNA	12
1.3.2	Zellfreie zirkulierende DNA nach Organtransplantation	13
1.4	Zielsetzung	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Studienprotokoll	18
2.1.1	Rekrutierung	18
2.1.2	Einschlusskriterien	18
2.1.3	Ausschlusskriterien	18
2.2	Studiendesign	19
2.2.1	Immunologisches Risiko	21
2.2.2	Stabilitätskriterien	22
2.3	Analytisches Monitoring	23
2.3.1	Droplet-Digital PCR	23
2.3.2	Differenzierung zwischen Spender- und Empfänger-DNA	26
2.3.3	Probenverarbeitung	27
2.3.3.1	SNP Hydrolyse Assay	27
2.4	GcfDNA-Messung	30
2.4.1	GcfDNA- Quantifizierung	30
2.4.2	Urin als alternatives Agens für die Gentypisierung von Donor und Empfänger	31
2.4.3	Bias DNA-Fragmentlänge	32
2.5	Biopsien	35
2.6	Abbruchkriterien	40
2.7	Statistische Analyse	41
3	Ergebnisse	43
3.1	Fallzahl/Patientenkollektiv	43
3.2	Frühphase nach Transplantation	47
3.2.1	Immunsuppressive Therapie	48
3.2.2	Ischämiezeiten	50
3.3	Ereignisse im Verlauf des Beobachtungszeitraums	53
3.3.1	Entwicklung von Donorspezifischen Antikörpern (DSAs)	53
3.3.2	Verschlechterung der Transplantatnierenfunktion	53
3.3.2.1	Transplantatnierenbiopsien	53
3.3.3	Plasmaaustausch	55

3.3.4	Transplantatverlust	55
3.3.5	Infektiologische Komplikationen	56
3.3.5.1	Virusinfektionen	56
3.4	Zellfreie donorspezifische DNA (gcfDNA)	58
3.4.1	Freisetzungskinetik von gcfDNA nach Nierentransplantation (stabile Phase)	58
3.4.2	Frühe postoperative Phase	60
3.4.2.1	Form der Organspende	60
3.4.2.1.1	Lebendspende	61
3.4.2.1.2	Organspende von Verstorbenen	62
3.4.2.1.3	Lebendspende und Blutgruppengleichheit	65
3.4.2.2	Immunologisches Risiko	69
3.4.3	Einfluss von Akutereignissen nach Stabilisierung der Transplantatnierenfunktion	73
3.4.3.1	Akute Verschlechterung der Transplantatnierenfunktion	73
3.4.3.2	Verhalten von GcfDNA entsprechend histopathologischen Merkmalen bei Transplantatnierenbiopsien	75
3.4.3.3	Infektionen	85
3.4.3.3.1	Polyomavirämie	87
4	Diskussion	89
4.1	Kinetik der gcfDNA	89
4.1.1	Allgemeine Kinetik	89
4.1.2	Form der Organspende	90
4.1.3	Immunologisches Risiko	91
4.1.4	Wertung der gcfDNA-Kinetik	91
4.2	Einflussgrößen auf die Freisetzung von gcfDNA	93
4.2.1	Akute Schädigung im Transplantat allgemein	93
4.2.2	Histopathologische Aspekte	95
4.2.3	Infektiologische Ereignisse	99
4.2.4	Wertung akute Freisetzung von gcfDNA	100
4.3	Meßmethode zur Quantifizierung von gcfDNA	103
4.3.1	Next-Generation Sequencing	103
4.3.2	Droplet-digital PCR	103
4.3.3	INDEL qPCR	104
4.3.4	Einordnung Messmethoden	104
4.4	Absolute und fraktionelle GcfDNA-Werte	106
4.5	Schlußfolgerung	108
5	Zusammenfassung	110
6	Literaturverzeichnis	112
7	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	122
8	Veröffentlichungen	123
9	Danksagung	124

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ursachen von Akutem Nierenversagen. Modifiziert nach (Richard J. Johnson, 2015b).....	8
Abbildung 2: Ursprünge zirkulierender Nukleinsäuren. Modifiziert nach (Vishnu Swarup, 2007).....	13
Abbildung 3: Ablaufschema für Selektion von geeigneten SNPs und Messung von GcfDNA. Modifiziert nach (Beck et al., 2013a).....	15
Abbildung 4: Schaubild zur Funktionsweise der ddPCR. Modifiziert nach (BIO-RAD).....	25
Abbildung 5: Ablaufschema für Selektion von geeigneten SNPs und Messung von GcfDNA. Modifiziert nach (Beck et al., 2013a, Mengel et al., 2012).....	29
Abbildung 6: Ablaufschema Probenverarbeitung:	34
Abbildung 7: Darstellung Rekrutierungsprozess.....	43
Abbildung 8: Verteilung der nephrologischen Grunderkrankung im Patientenkollektiv.....	44
Abbildung 9: Beziehungsverhältnis zwischen Nierenspende und Empfänger bei den Lebendnierentransplantationen.....	44
Abbildung 10: Anteil an Patienten im immunologischen Hochrisikoprofil. Prozentuale Verteilung der Einzelkriterien und Darstellung des Gesamtanteils, jeweils im Vergleich zur Gesamtkohorte.....	46
Abbildung 11: Verteilung der Induktionstherapie im Studienkollektiv.....	50
Abbildung 12: Darstellung der Kalten Ischämiezeiten bei Lebendspenden, Verstorbenenspenden und im Gesamtkollektiv.....	51
Abbildung 13: Darstellung der Warmen Ischämiezeiten bei Lebendspenden, Verstorbenenspenden und im Gesamtkollektiv.....	52
Abbildung 14: Prozentuale Verteilung der Transplantatnierenbiopsien entsprechend histopathologischer Untersuchung in den eindeutig zuordenbaren Gewebeeränderungen.....	55
Abbildung 15: Ursachen für Transplantatverlust im Studienkollektiv.....	56
Abbildung 16: Gegenüberstellung allgemeiner infektiologischer Komplikationen und BKVirämien im Beobachtungszeitraum.....	57
Abbildung 17: Kinetik der gcfDNA über ein Jahr nach Nierentransplantation in der stabilen Phase. GcfDNA wird als absoluter Wert angegeben (cp/ml)......	58
Abbildung 18: Median der gcfDNA nach Erreichen des Steady-State (Zeitraum V5-V15). Angabe der gcfDNA als absolutem Wert (cp/ml). Die Box-Plots zeigen innerhalb der Boxen den Interquartilrange und den Median an, die Klammern zeigen bei fehlenden Ausreisserwerten den Minimal- bzw. Maximalwert an. Ausreisserwerte wurden definiert als außerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstands. Bei Vorhandensein von Ausreisserwerten zeigen die Klammern den ersten Wert innerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstand an.....	59
Abbildung 19: GcfDNA als absoluter Wert bei Lebendnierentransplantationen. Die Darstellung erfolgt aufgeschlüsselt für die definierten Visitenzeitpunkte V1 - V3 bis maximal 5. postoperativen Tag.....	61
Abbildung 20: GcfDNA als absoluter Wert bei Verstorbenentransplantationen. Die Darstellung erfolgt aufgeschlüsselt für die definierten Visitenzeitpunkte V1 - V3 bis maximal 5. postoperativen Tag.....	62
Abbildung 21: Vergleich der Mediane an gcfDNA bei Lebendspende und Verstorbenenspende. Angabe der gcfDNA als absolute Werte (cp/ml). Darstellung der jeweiligen Werte zu den Zeitpunkten V1, V2, V3 bis einschließlich 5. Postoperativem Tag.....	63
Abbildung 22: Vergleich der Freisetzung von gcfDNA als absolutem Wert (cp/ml) bei Patienten nach Lebendnierentransplantation und Verstorbenennierentransplantation bei Betrachtung der absoluten Frühphase nach Transplantation (bis einschließlich Tag 5 postoperativ).....	63
Abbildung 23: ROC-Kurve für den Vergleich der Freisetzung von gcfDNA als absoluten Wert (cp/ml) bei Patienten nach Lebendnierentransplantation und Verstorbenennierentransplantation bei Betrachtung der absoluten Frühphase nach Transplantation (bis einschließlich Tag 5 postoperativ). Mit einer AUC von 0,42 sind Sensitivität und Spezifität für das Ereignis niedrig.....	64

Abbildung 24: GcfDNA als absoluter Wert bei AB0-kompatiblen Lebennierentransplantationen. Die Darstellung erfolgt aufgeschlüsselt für die definierten Visitenzeitpunkte V1 - V3 bis maximal 5. postoperativen Tag.	65
Abbildung 25: GcfDNA als absoluter Wert bei AB0-inkompatiblen Lebennierentransplantationen. Die Darstellung erfolgt aufgeschlüsselt für die definierten Visitenzeitpunkte V1 - V3 bis maximal 5. postoperativen Tag.	66
Abbildung 26: Vergleich der Mediane an gcfDNA bei AB0kompatibler und AB0inkompatibler Lebendspende. Angabe der gcfDNA als absolute Werte (cp/ml). Darstellung der jeweiligen Werte zu den Zeitpunkten V1, V2, V3 bis einschließlich 5. postoperativem Tag.	67
Abbildung 27: Vergleich der Freisetzung von GcfDNA als absolutem Wert (cp/ml) bei Patienten nach Lebendnierentransplantation bezüglich blutgruppengleicher (AB0-kompatibler) und blutgruppenungleicher (AB0-inkompatibler) Organspende. Betrachtung der absoluten Frühphase nach Transplantation (bis einschließlich Tag 5 postoperativ).	68
Abbildung 28: ROC-Kurve für den Vergleich der Freisetzung von GcfDNA als absolutem Wert (cp/ml) bei Patienten nach Lebendnierentransplantation bezüglich blutgruppengleicher (AB0-kompatibler) und blutgruppenungleicher (AB0-inkompatibler) Organspende. Betrachtung der absoluten Frühphase nach Transplantation (bis einschließlich Tag 5 postoperativ).	68
Abbildung 29: gcfDNA im Kollektiv mit niedrigem immunologischem Risiko.	69
Abbildung 30: gcfDNA im Kollektiv mit hohem immunologischem Risiko.	70
Abbildung 31: Vergleich der Mediane an gcfDNA bei hohem und niedrigem immunologischem Risiko. Angabe der gcfDNA als absolute Werte (cp/ml). Darstellung der jeweiligen Werte zu den Zeitpunkten V1, V2, V3 bis einschließlich 5. postoperativem Tag.	71
Abbildung 32: Vergleich der Freisetzung von gcfDNA als absolutem Wert (cp/ml) bei Patienten mit hohem und niedrigem immunologischem Risiko. Betrachtung der absoluten Frühphase nach Transplantation (bis einschließlich Tag 5 postoperativ).	71
Abbildung 33: : ROC-Kurve für den Vergleich der Freisetzung von gcfDNA als absolutem Wert (cp/ml) bei Patienten hohem und niedrigem immunologischem Risiko. Betrachtung der absoluten Frühphase nach Transplantation (bis einschließlich Tag 5 postoperativ).	72
Abbildung 34: Vergleich der Freisetzung von gcfDNA bei akuter Verschlechterung der Transplantatnierenfunktion und in der stabilen Phase. Angabe der gcfDNA als absoluten Wert (cp/ml). Betrachtung des Zeitraums von 5 Tagen bis 12 Monate (+/- 1 Monat) entsprechen V4 – V15 nach Transplantation.	74
Abbildung 35: ROC-Kurve für den Vergleich der Freisetzung von gcfDNA als absolutem Wert (cp/ml) bei akuter Verschlechterung der Transplantatnierenfunktion und in der stabilen Phase für dem Zeitraum ab 5 Tage nach Transplantation bis 12 Monate (+/- 1 Monat) nach Transplantation (entsprechend V4 – V15)	75
Abbildung 36: Vergleich der Freisetzung von gcfDNA entsprechend Biopsiekategorie.....	77
Abbildung 37: Vergleich der Freisetzung von gcfDNA in der stabilen Phase mit bioptisch nachgewiesenen Rejektionen (Borderline TCMR (a) und BPR (c)) sowie Werte bei negativen Biopsien mit bioptisch nachgewiesenen Rejektionen (Borderline TCMR (b) und BPR (d)). Ausgabe gcfDNA als absoluter Wert (cp/ml).....	78
Abbildung 38: ROC-Kurve für den Vergleich der Freisetzung von gcfDNA als absolutem Wert (cp/ml) bei BPR und in der stabilen Phase für den Zeitraum ab 5 Tage nach Transplantation bis 12 Monate (+/- 1 Monat) nach Transplantation (entsprechend V4 – V15). Vorab publiziert: (Oellerich et al., 2019).....	79
Abbildung 39: ROC-Kurve für den Vergleich der Freisetzung von gcfDNA als absolutem Wert (cp/ml) bei Borderline-TCMR und in der stabilen Phase für den Zeitraum ab 5 Tage nach Transplantation bis 12 Monate (+/- 1 Monat) nach Transplantation (entsprechend V4 – V15)	79
Abbildung 40: ROC-Kurven für den Vergleich der Freisetzung von gcfDNA als absolutem Wert (cp/ml) bei negativen Biopsien und BPR (a) bzw. negativen Biopsien und Borderline-TCMR (b) für den Zeitraum ab 5 Tage nach Transplantation bis 12 Monate (+/- 1 Monat) nach Transplantation (entsprechend V4 – V15)	80
Abbildung 41: Vergleich der Freisetzung von gcfDNA in der stabilen Phase mit bioptisch nachgewiesenen Interstitieller Fibrose und Tubulusatrophie (IFTA (a)) bzw. Akuter	

Tubulusnekrose (ATN (c)) sowie bei negativen Biopsien und IFTA (b) und negativen Biopsien und ATN (d). Ausgabe gcfDNA als absoluter Wert (cp/ml).....	81
Abbildung 42: ROC-Kurven für den Vergleich der Freisetzung von gcfDNA als absolutem Wert (cp/ml) in der stabilen Phase und IFTA (a), bei negativen Biopsien und IFTA (b), in der stabilen Phase und ATN (c) sowie bei negativen Biopsien und ATN (d). Jeweils für den Zeitraum ab 5 Tage nach Transplantation bis 12 Monate (+/- 1 Monat) nach Transplantation (entsprechend V4 – V15)	82
Abbildung 43: Vergleich der Freisetzung von gcfDNA in der stabilen Phase mit negativen Biopsien (a) sowie Vergleich der beiden Rejektionskategorien (Borderline TCRM und BPR (b)). Ausgabe gcfDNA als absoluter Wert (cp/ml).....	83
Abbildung 44: Vergleich der Freisetzung von gcfDNA bei Borderline-TCMR und IFTA (a) bzw. ATN (c) sowie BÜR und IFTA (b) bzw. ATN (d). Ausgabe gcfDNA als absoluter Wert (cp/ml).	84
Abbildung 45: ROC-Kurve für den Vergleich der Freisetzung von gcfDNA als absolutem Wert (cp/ml) bei BPR und IFTA für den Zeitraum ab 5 Tage nach Transplantation bis 12 Monate (+/- 1 Monat) nach Transplantation (entsprechend V4 – V15)	84
Abbildung 45: Vergleich der Freisetzung von gcfDNA bei Infektionen und in der stabilen Phase. Angabe der gcfDNA als absoluten Wert (cp/ml). Betrachtung des Zeitraums von 5 Tagen bis 12 Monate (+/- 1 Monat) entsprechend V4 – V15 nach Transplantation.....	86
Abbildung 46: ROC-Kurve für den Vergleich der Freisetzung von gcfDNA als absolutem Wert (cp/ml) bei Infektionen und in der stabilen Phase für dem Zeitraum ab 5 Tage nach Transplantation bis 12 Monate (+/- 1 Monat) nach Transplantation (entsprechend V4 – V15)	86
Abbildung 47: Vergleich der Freisetzung von gcfDNA bei Polyomavirämie und in der stabilen Phase. Angabe der gcfDNA als absoluten Wert (cp/ml). Betrachtung des Zeitraums von 5 Tagen bis 12 Monate (+/- 1 Monat) entsprechend V4 – V15 nach Transplantation.....	87
Abbildung 48: ROC-Kurve für den Vergleich der Freisetzung von gcfDNA als absolutem Wert (cp/ml) bei Polyomavirämie und in der stabilen Phase für dem Zeitraum ab 5 Tage nach Transplantation bis 12 Monate (+/- 1 Monat) nach Transplantation (entsprechend V4 – V15).	88

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: KDIGO-Klassifikation der akuten Nierenschädigung. Modifiziert nach (Khwaja, 2012).....	7
Tabelle 2: Beobachtungszeiträume im Studienverlauf ab Zeitpunkt der Nierentransplantation	19
Tabelle 3: Beobachtungsparameter im Studienverlauf: Basisparameter und während jeder Visite erhobene Beobachtungsparameter.....	20
Tabelle 4: Kriterienkatalog immunologisches Hochrisikoprofil (van Gelder et al., 2010)	21
Tabelle 5: Definition Stabilitätskriterien für die Beobachtungsphase	22
Tabelle 6: Verwendete Primer und Proben der ddPCR-Reaktion	30
Tabelle 7: Probenbestandteile für die ddPCR-LI-Berechnung	33
Tabelle 8: BANFF-Klassifikation zur Bewertung von Transplantatnierenbiopsien hinsichtlich von Rejektionszeichen (nach (Haas et al., 2014, Mengel et al., 2012, Racusen et al., 2003, Racusen et al., 2004, Racusen et al., 1999, Sis et al., 2010, Solez et al., 1993, Solez et al., 1996, Solez et al., 2008, Solez et al., 2007)	35
Tabelle 9: Gruppierung der Rejektionen für die Studie mit entsprechendem Äquivalent in der BANFF-Klassifikation	39
Tabelle 10: Kriterienkatalog immunologisches Hochrisikoprofil	45
Tabelle 11: verwendetes immunsuppressives Regime zur Induktionstherapie.....	48
Tabelle 12: verwendetes immunsuppressives Regime zur Erhaltungstherapie.....	49
Tabelle 13: Vergleich Kalte Ischämiezeit im Studienkollektiv.....	51
Tabelle 14: Vergleich Warme Ischämiezeiten im Studienkollektiv.	52
Tabelle 15: Darstellung der gcfDNA im zeitlichen Verlauf nach Nierentransplantation in der stabilen Phase. Angabe der gcfDNA als absolute Werte (cp/ml) sowie für jeden Zeitpunkt (V1-V15) nach Nierentransplantation die Anzahl an vorhandenen Proben im Kollektiv. Dargestellt wird für jeden Zeitpunkt der Minimal- und Maximalwert, die Interquartilwerte sowie der Median.	59
Tabelle 16: Mediane der gcfDNA nach Erreichen des Steady-State mit Angabe von minimalem und maximalen Wert, Interquartilrange und Median für die Zeitpunkten V5-V15. Angabe der gcfDNA als absolute Werte (cp/ml).	60
Tabelle 17: GcfDNA als absoluter Wert (cp/ml) bei Lebendnierentransplantationen.	61
Tabelle 18: GcfDNA als absoluter Wert (cp/ml) bei Verstorbenenentransplantationen.	62
Tabelle 19: GcfDNA als absoluter Wert (cp/ml) bei ABO-kompatibler Lebendtransplantationen.	65
Tabelle 20: GcfDNA als absoluter Wert (cp/ml) bei ABO-kompatibler Lebendtransplantationen.	66
Tabelle 21: gcfDNA bei niedrigem immunologischem Risiko. Darstellung der Visitenzeitpunkte V1 - V3 (bis maximal 5. postoperativer Tag), Minimal- und Maximalwerte sowie Median und Interquartilwerte.	69
Tabelle 22: gcfDNA bei niedrigem immunologischem Risiko. Darstellung der Visitenzeitpunkte V1 - V3 (bis maximal 5. postoperativer Tag), Minimal- und Maximalwerte sowie Median und Interquartilwerte	70
Tabelle 24: gcfDNA in der stabilen Phase und bei akuter Verschlechterung der Transplantatnierenfunktion. Ausgabe der gcfDNA als absolute Werte (cp/ml), Angabe von Minimal- und Maximalwerten, Medianen sowie Interquartilwerten.....	74
Tabelle 26: gcfDNA in der stabilen Phase und bei Transplantatnierenbiopsien. Ausgabe als absoluter Wert (cp/ml) und Sortierung entsprechend Biopsieergebnis. Verwendet wurden nur eindeutig kategorisierbare Biopsien mit simultan erfasstem gcfDNA-Wert. Darstellung von Minimal- und Maximalwert, Medianen und Interquartilwerten. Ausschließlich Verwendung des Beobachtungszeitraums ab dem 5. Postoperativen Tag bis 12 Monate nach Transplantation (V4 – V15).	76
Tabelle 27: gcfDNA in der stabilen Phase und bei akuter Infektion. Betrachtung aller Werte ab dem 5. Postoperativen Tag bis 12 Monate (+/- 1 Monat) nach Transplantation. Darstellung von Minimal- und Maximalwert, Median und Interquartilwerten.	85

Tabelle 28: gcfDNA in der stabilen Phase und bei akuter Infektion. Betrachtung aller Werte ab dem 5. Postoperativen Tag bis 12 Monate (+/- 1 Monat) nach Transplantation. Darstellung von Minimal- und Maximalwert, Median und Interquartilwerten..... 87

Abkürzungsverzeichnis

A

ABCMR	Acute B-Cell-Mediated Rejection
ADPKD	Autosomal Dominant Polycystic Kidneydisease
AMP	Adenosinmonophosphat
ATCMR	Acute T-Cell-Mediated Rejection
ATG	Anti-T-Lymphozyten-Globulin
ATN	Akute Tubulusnekrose
AUC	Area Under the Curve

B

BKV	BK-Virus = Polyomavirus
Borderline-TCMR	Borderline-T-Cell-mediated Rejection
Bp	Basenpaare
BPR	Biopsy-proven Rejection; deutsch: Biopsie-gesicherte Abstoßung

C

CABMR	chronic-active B-Cell-mediated Rejection
CATMR	chronic-active T-Cell-mediated Rejection
CD	Cluster of Differentiation
cfDNA	cell-free Desoxyribonucleinacid; deutsch: zellfreie Desoxyribonukleinsäure
CI	Confidenceintervall; deutsch: Konfidenzintervall
CMV	Cytomegalievirus
CYP	Cytochrom P450

D

dPCR	digital Polymerase Chain Reaction; deutsch: digitale Polymerasekettenreaktion
ddPCR	droplet digital Polymerase Chain Reaction; deutsch: digitale Tröpfchen-Polymerasekettenreaktion
DNA	Desoxyribonucleinacid; deutsch: Desoxyribonukleinsäure
DSA	Donorspezifische Antikörper

E

ELISA Enzyme-linked Immunosorbent Assay

EM Elektronenmikroskopie
et al. et alii/ et aliae, deutsch: und andere

F

FFP Fresh Frozen Plasma
FKBP12 FK506-Bindingprotein12
foxP3 forkhead box P3
FSGS Fokal Segmentale Glomeruloslerose

G

gcfDNA Graft-derived cell-free DNA = donorspezifische zellfreie DNA
GFR Glomeruläre Filtrationsrate
GMP Guanosylmonophosphat

H

HLA Humanes Leukozyten Antigen
HSV Herpes Simplex Virus
HTS High Throuphput Sequencing

I

IFTA Interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie
IgG ImmunglobulinG
IMPDH Inosinmonophosphatdehydrogenase
iNOS induzierbare NO-Synthase = induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
i.v. intravenös

K

KDIGO Kidney Disease: Improving Global Outcomes
KG Körpergewicht
KI Konfidenzintervall

KIZ Kalte Ischämiezeit

M

MAF Minor Allelic Frequency

mRNA Messenger Ribonucleinacid

mTOR mechanistic Target of Rapamycin; früher: mammalian Target of Rapamycin

N

NFAT Nuclear Factor of activated T-Cells

nf- κ B Nuclear factor Kappa B

NGAL Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin

NGS Next-Generation Sequencing

P

PCR Polymerase Chain Reaction; deutsch: Polymerasekettenreaktion

PRA Panel Reaktive Antikörper

p.o. per os

R

RNA Ribonucleinacid; deutsch: Ribonukleinsäure

ROC Receiver Operating Characteristic

Q

qPCR Quantitative Polymerase Chain Reaction

S

SNP Single Nucleotide Polymorphism

SLE Systemischer Lupus Erythematodes

T

TCMR T-Cell-mediated Rejection

TDM Therapeutisches Drug Monitoring

TMA Thrombotische Mikroangiopathie

U

uNGAL Urine Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin

V

vPRA Virtual Panel Reactive Antibody

VZV Varizella Zoster Virus

W

WIZ Warme Ischämiezeit

1 Einleitung

1.1 Immunsuppression nach Nierentransplantation

Die Etablierung einer immunsuppressiven Therapie nach Nierentransplantation ist essentiell zur Vermeidung von akuten und chronischen Rejektionen und damit für das Organüberleben.

Unterschieden wird zwischen einer Induktionstherapie, die in der Akutphase der Organtransplantation das Immunsystem unterdrückt und einer Erhaltungstherapie, die die Aktivität des Immunsystems dauerhaft so modulieren soll, dass eine bestmögliche Organfunktion etabliert und erhalten werden kann.

1.1.1 Induktionstherapie

In der Akutphase um die Nierentransplantation kommt es durch perioperativen Stress sowie den Schaden durch Ischämie und Reperfusion zu einer massiven Inflammationsreaktion. Diese wird durch Aktivierung des innaten (angeborenen) Immunsystems und über Antigenpräsentation auch über Aktivierung des adaptiven (erworbenen) Immunsystems ausgelöst (Richard J. Johnson, 2015a). Im transplantierten Organ kommt es hierdurch zu erheblichem Schaden.

Ziel der Induktionstherapie ist es, den Empfängerorganismus durch immunmodulatorische Maßnahmen so zu konditionieren, dass die Immunreaktion auf das fremde Gewebe nicht oder nur minimal stattfindet. Maßgeblich hierfür ist die Unterdrückung der T-Zellfunktion.

Hierfür haben sich zwei Medikamente etabliert: der Interleukin-2-Antagonist Basiliximab und Thymoglobulin (ATG) (Richard J. Johnson, 2015b).

1.1.1.1 Basiliximab

Basiliximab ist ein chimärer (muriner/humaner) monoklonaler IgG_{1κ}-Antikörper. Er bindet an die α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors auf der Oberfläche von aktivierten T-Lymphozyten. Der Interleukin-2-Rezeptor besteht aus einer α -Kette (CD25), einer β -Kette (CD122) und einer γ -Kette (CD132). Im Normalzustand, d.h. bei ruhenden T-Lymphozyten, wird CD25 kaum exprimiert. CD25 bewirkt eine schnelle Assoziation

von CD122 und CD 132. Dies führt zu einer klonalen T-Zell-Expansion. Nach allogener T-Zell-Stimulation, z.B. durch die Implantation von Fremdgewebe, kommt es zu einer massiven CD25-Expression auf aktivierten T-Lymphozyten, somit zu einer klonalen T-Zell-Expansion.

Die Bindung von Basiliximab an CD25 führt zu einer kompetitiven Hemmung der CD25-Wirkung und damit der T-Zell-Expansion.

Die Halbwertszeit beträgt 1-2 Wochen. In einer Placebo-kontrollierten Studie führte eine Kumulativdosis von 40mg (2 Einzelgaben à 20mg an Tag 0 und Tag 4) zu einer signifikanten Reduktion an biopsisch nachgewiesenen Rejektionen 6 und 12 Monate nach Transplantation (Nashan et al., 1997).

Aufgrund der guten Verträglichkeit und niedrigerem Nebenwirkungsprofil wird Basiliximab in vielen Transplantationszentren als Standardinduktion verwendet.

1.1.1.2 Thymoglobulin

Thymoglobulin ist ein polyklonaler purifizierter Antikörper aus Kaninchenserum und wird in der Prävention und Behandlung von Abstoßungen nach Nierentransplantation verwendet (Kreis et al., 1981). In der Herstellung werden pathogenfreie Kaninchen mit Zelllösungen von humanen Thymozyten immunisiert (Halloran, 2004). Das Kaninchenserum wird gesammelt, Immunglobuline gegen Thymozyten isoliert und aufbereitet. Um eine hohe Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, werden Proben von >26000 Kaninchen gepoolt.

Die Hauptwirkung von Thymoglobulin beruht auf Lymphozytendepletion im peripheren Blut durch Komplement-abhängige Zellyse, Antikörper-gesteuerte Zytotoxizität und aktivierten Zelltod (Genestier et al., 1998). Neben dem peripheren Blut kommt es auch zu einer Lymphozytendepletion in sekundären lymphatischen Gewebe mit Ausnahme des Thymus (Preville et al., 2001). Neben der absoluten Lymphozytendepletion werden Funktionen der Lymphozyten durch Herunterregulation von Oberflächenantigenen, die die T-Zellaktivierung und die Endotheladhäsion steuern, gehemmt (Michallet et al., 2003).

Thymoglobulin wirkt mit großer Affinität gegen T-Lymphozyten, jedoch hemmt es auch die Ausreifung/Aktivierung von B-Lymphozyten durch Apoptoseinduktion in naiven und aktivierten B-Zellen sowie Plasmazellen im Knochenmark (Zand et al., 2005). So wird das Risiko von Antikörpervermittelten Rejektionen nach Nierentransplantation bei präformierten Donorspezifischen Antikörpern (DSA) gesenkt (Bachler et al., 2010).

Zusätzlich haben die Antithymozyten-Antikörper einen depletierenden – wenn auch deutlich geringer ausgeprägten - Effekt auf Natürliche Killerzellen, Monozyten, Neutrophile Granulozyten, Thrombozyten und Erythrozyten und können somit zu einer Panzytopenie führen.

Es gibt eine Reihe von unerwünschten Wirkungen. In der Akutphase der Applikation kann Thymoglobulin zum „Cytokine-Release-Syndrom“ führen. Dies zeichnet sich durch akute Anaphylaxie, Fieber, Schüttelfrost, Dyspnoe, Unwohlsein, Blutdruckdysregulation, Exanthem und Kopfschmerz aus. Meist kann dies durch Infusionsstopp und Applikation von Epinephrin beherrscht werden. In selten Fällen kann es zu schweren refraktären Hypotonien, Lungenödem, Myokardinfarkt und Tod kommen (Guttman et al., 1997).

Etwa 5-15 Tage nach Applikation kann eine Serumkrankheit auftreten, die sich durch Auftreten von Fieber, Exanthem, Arthralgien und Myalgien auszeichnet und gut auf die Gabe von Corticosteroiden anspricht.

An infektiologischen Komplikationen sind das vermehrte Auftreten von CMV-Infektionen (13%), Sepsis (12%), Candidose (3%), HSV-Infektion (5%), Urogenitaltraktinfektionen (19%) beschrieben, insbesondere bei Kumulativdosierungen von >7mg/kg KG (Clesca et al., 2007).

Trotz des höheren Nebenwirkungsspektrums zeigt Thymoglobulin Vorteile bezüglich Auftreten von akuten Abstoßungen, verzögerter Transplantatfunktionsaufnahme und Transplantatüberleben (Martins et al., 2005) (Abouna et al., 1993). Insbesondere bei immunologisch hohem Risiko, wie etwa bei vortransplantierten oder vorimmunisierten Patienten, präformierten Antikörpern oder langen Ischämiezeiten, zeigt die Induktion mit Thymoglobulin günstigere Ergebnisse als Basiliximab (Brennan et al., 2006), so dass Thymoglobulin regelhaft bei erhöhtem Risiko für immunologische Ereignisse zur Induktion eingesetzt wird.

1.1.2 Erhaltungstherapie

Die Immunsuppression in der Erhaltungsphase nach Nierentransplantation hat zum Ziel, das Immunsystem so zu modulieren, dass der Empfängerorganismus Toleranz für das implantierte Organ entwickelt und erhält. Gleichzeitig gilt es, eine Überimmunsuppression zu verhindern. Insbesondere im Langzeitverlauf steht die Vermeidung von chronisch-humoralen Abstoßungen mit verkürztem Organüberleben im Vordergrund.

Eine Tripletherapie aus niedrig-dosiertem Tacrolimus, Mycophenolsäure und Prednisolon zeigte bezüglich GFR, bioptisch gesicherten akuten Abstoßungen und Organüberleben günstige Effekte (Ekberg et al., 2007). Diese Therapie ist heute in vielen Transplantationszentren Standardtherapie.

1.1.2.1 Kortikosteroide

Kortikosteroide unterdrücken die Produktion einiger Zytokine und vasoaktiver Substanzen, u.a. Interleukin-1, Tumornekrosefaktor α , Interleukin-2, Chemokinen und Proteasen (Richard J. Johnson, 2015c).

Die komplette immunsuppressive Wirkung der Kortikosteroide ist sehr komplex. Sie haben Einfluss auf Zytokinbildung, Funktionalität von Adhäsionsmolekülen und inflammatorischen Zellen sowie Apoptose.

Sie induzieren eine Neutrophilie bei gleichzeitiger Hemmung der Chemotaxis und Adhäsion der Neutrophilen.

Kortikosteroide wirken als Agonisten am Kortikoidrezeptor, der normalerweise als inaktiver Komplex an Hitzeschockproteine gebunden im Zytoplasma vorliegt. Durch Aktivierung über Bindung des Kortikosteroids können Gentranskriptionen aktiviert oder supprimiert werden.

Kortikosteroide stimulieren außerdem Lipocortin, welches die Phospholipase A2 inhibiert und hierüber die Produktion von Leukotrienen und Prostaglandinen hemmt (Flower, 1988).

Relevante unerwünschte Wirkungen sind Osteoporose, gestörte Glucosetoleranz, Cataractbildung, Hüftkopfnekrose, Induktion oder Verschlechterung einer Arteriellen Hypertonie, Diuretikaresistenz, Peptische Ulzerationen des Gastrointestinaltrakts, Gewichtszunahme, Hirsutismus, Akne, Schlaflosigkeit, Myopathie, Pschyosen (Richard J. Johnson, 2015c).

1.1.2.2 Tacrolimus

Tacrolimus ist ein Makrolidlacton und gehört zur Gruppe der Calcineurininhibitoren. Es wurde erstmals 1987 bei der Fermentation einer japanischen Bodenprobe, die *Streptomyces tsukubaensis*, ein gram-pos. Bakterium, enthielt, entdeckt.

Die Wirkung der Calcineurininhibitoren beruht auf der Bindung an sog. Immunophiline. Im Fall von Tacrolimus an das FK-binding protein 12 (FKBP12), welches dadurch seine Affinität für Calcineurin erhöht und dieses hemmt (Ho et al., 1996).

Calcineurin phosphoryliert den inaktiven Kernfaktor für aktivierte T-Zellen (NFAT_c) im Cytosol. Dieser wird damit aktiviert, kann in den Zellkern übertreten und dort an den Kernfaktor für aktivierte T-Zellen (NFAT_n) im Nucleus binden. Dieser NFAT_n-NFAT_c-Komplex bindet an die Promotorregion des Interleukin-2-Gens und initiiert die Interleukin-2-Bildung.

Wird Calcineurin durch die Bindung von Tacrolimus an FKBP12 gehemmt, wird entsprechend die Interleukin-2-Produktion und damit die T-Zell-Aktivierung gehemmt. Die Absorption von Tacrolimus ist sehr variabel, die Bioverfügbarkeit wird mit 5-67% beschrieben. Die Absorption hängt von der Verweildauer im Gastrointestinaltrakt, Anwesenheit von Nahrung und deren Fettgehalt ab. Ebenso sind ethnische Unterschiede beschrieben. Kaukasier benötigen in der Regel niedrigere Dosierungen als Lateinamerikaner oder Afroamerikaner. Tacrolimus wird über das CYP3A4-System verstoffwechselt.

Die Ursache für die ethnischen Unterschiede in der Dosierung von Tacrolimus ist das CYP3A5-Gen (Rojas et al., 2015)

Wegen geringer therapeutischer Breite und sehr variabler individueller Dosis, wird in der Regel therapeutisches Drugmonitoring zur Dosisfindung durchgeführt (Schiff et al., 2007).

Wichtige unerwünschte Effekte von Tacrolimus sind gestörte Glucosetoleranz, Nephrotoxizität, Induktion einer Thrombotischen Mikroangiopathie, Alopezie, Schlaflosigkeit, Tremor, Myopathie, Abdominalschmerzen, Diarrhoe, Diuretikaresistenz, Typ-4-Renal-Tubuläre-Azidose, Elektrolytstörungen (Hyperkaliämie, Hypomagnesiämie, Hypophosphatämie).

1.1.2.3 Mycophenolat

Mycophenolatmofetil und enterisch ummanteltes Mycophenolatnatrium sind wichtige Komponenten des immunsuppressiven Regimes nach Nierentransplantation.

Aktiver Metabolit ist die Mycophenolsäure, die eine potente reversible Hemmung von Inosinmonophosphatdehydrogenase (IMPDH) verursacht. IMPDH bestimmt die de novo Synthese der Guanosylmonophosphat (GMP). Durch die Hemmung von IMPDH entsteht ein relativer Mangel an GMP und ein relativer Überschuss an Adenosinmonophosphat (AMP). GMP und AMP kontrollieren die de novo Purinsynthese. Über den relativen GMP-Mangel wird somit die Purinsynthese gehemmt (Allison and Eugui, 1996).

Mycophenolsäure hemmt vor allem die Typ2-Isoform der IMPDH. Diese wird in den meisten aktivierten Lymphozyten exprimiert, wohingegen gewöhnliche Zellen hauptsächlich die Typ1-Isoform der IMPDH exprimieren. Somit hat Mycophenolsäure einen potenten zytostatischen Effekt auf aktivierte Lymphozyten und entfaltet so die immunsuppressive Wirkung.

Es gibt drei weitere Mechanismen, die die potente immunsuppressive Wirkung von Mycophenolsäure erklären. Mycophenolsäure initiiert die Apoptose von aktivierten T-Lymphozyten. Zusätzlich wird durch die GMP-Depletion die Glycosilierung einiger Adhäsionsmoleküle gehemmt und hierüber die Einwanderung von Lymphozyten und Monozyten an Orte mit Inflammationsaktivität verhindert. Die GMP-Depletion hat außerdem eine verringerte Aktivität von Tetrahydrobiopterin zur Folge. Dieser ist Cofaktor der induzierten Form der Nitritoxidsynthase (iNOS). Durch den Tetrahydrobiopterinmangel wird die NO-Synthese gehemmt und somit die NO-gesteuerte Gewebeschädigung verringert (Allison and Eugui, 2000).

Wichtige unerwünschte Wirkungen sind Diarrhoen, Erbrechen, Übelkeit, gastrointestinale Ulcerationen und eine teils ausgeprägte Myelotoxizität.

Es gibt Hinweise, dass eine dauerhaft hohe Erhaltungsdosis von Mycophenolsäure chronisch humorale Rejektionen effektiv verhindern kann (Allison and Eugui, 2005).

1.1.3 Grenzen der immunsuppressiven Therapie

Über die Jahre hat sich bei der Nierentransplantation ein Protokoll für eine standardisierte Immunsuppression etabliert. Diese besteht aus einer Induktionstherapie und einer Tripletherapie mit Kortikosteroid, Mycophenolsäure und Tacrolimus, die dauerhaft fortgeführt wird. Entsprechend immunologischem Risikoprofil und Begleiterkrankungen wird dieses Protokoll modifiziert.

In der Klinik zeigt sich, dass trotz intensiven Patientenmonitorings das Outcome bezüglich immunologischer und infektiologischer Komplikationen nur sehr bedingt vorhersagbar ist.

Mit dem gleichen Regime gibt es Patienten, die viele Rejektionsereignisse haben. Andere wiederum erleiden mit formal gleichem immunologischem Risiko unter gleicher Medikation schwerste infektiologische Komplikationen.

1.2 Monitoring der Transplantatnierenfunktion

1.2.1 Möglichkeiten der Abschätzung der Nierenfunktion

Die Bestimmung des Serumkreatinins ist immer noch die am meisten verbreitete Methode zur Abschätzung der Nierenfunktion (Vidal-Petiot and Flamant, 2017) und wird auch regelhaft zum Monitoring der Transplantatfunktion nach Nierentransplantation verwendet.

Aufgrund von insbesondere während des Beginns der akuten Nierenschädigung deutlich schneller veränderter GFR im Vergleich zur Veränderung des Serumkreatinins (Bellomo et al., 2004) wurde versucht, durch das Hinzuziehen der quantitativen Urinausscheidung eine etwas präzisere Beschreibung der Nierenschädigung zu erreichen (Mehta et al., 2007).

Entsprechend wird die Veränderung des Serumkreatinins in Kombination mit der Urinausscheidung auch zur Beschreibung und Klassifikation der akuten Nierenschädigung herangezogen (Khwaja, 2012).

Tabelle 1: KDIGO-Klassifikation der akuten Nierenschädigung. Modifiziert nach (Khwaja, 2012)

Zusammengesetzte Klassifikation der Akuten Nierenschädigung der KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes)		
Stadium	Serumkreatinin	Urinausscheidung
1	1,5-1,9fache Erhöhung des Baselinewertes oder Anstieg um $\geq 0,3\text{mg/dl}$ ($\geq 26\mu\text{mol/l}$)	$< 0,5\text{ml/kg/h}$ für 6-12 Stunden
2	2,0-2,9fache Erhöhung des Baselinewertes	$< 0,5\text{ml/kg/h}$ für ≥ 12 Stunden
3	3,0fache Erhöhung des Baselinewertes oder Anstieg bis $\geq 4,0\text{mg/dl}$ ($\geq 352\mu\text{mol/l}$) oder Beginn Nierenersatztherapie oder bei Patienten unter 18 Jahren Verringerung der eGFR $< 35\text{ml/min/1,73m}^2$	$< 0,3\text{ml/kg/h}$ für ≥ 24 Stunden oder Anurie für ≥ 12 Stunden

Die Aussage, die hiermit über die tatsächliche Nierenschädigung erhoben werden kann, ist jedoch sehr unpräzise.

Dies liegt vor allem daran, dass der akuten Nierenschädigung nicht eine einzelne Erkrankung zugrunde liegt, sondern eine Vielzahl an unterschiedlichen Syndromen Grund der Funktionsstörung sein können (Ronco et al., 2019).



Abbildung 1: Ursachen von Akutem Nierenversagen. Modifiziert nach (Richard J. Johnson, 2015b)

Da der KDIGO-Klassifikation der akuten Nierenschädigung lediglich eine funktionelle Beschreibung der Nierenfunktion zugrunde liegt, kann hierbei ohne weitere Diagnostik keine Aussage über die Ursache der Nierenschädigung und damit über die tatsächliche Schädigung im Nierengewebe erfolgen.

1.2.2 Nierenbiopsie

Zur weiterführenden Abklärung der Funktionsverschlechterung ist oft die Durchführung einer Nierenbiopsie notwendig (Hogan et al., 2016).

Histopathologisches Korrelat der akuten Nierenschädigung unabhängig von der Ursache ist der Nachweis eines akuten Tubulusschadens (Moeckel, 2018). Es gibt mittlerweile Hinweise, dass anhand bestimmter Typen von Tubuluszellorganellen eine

histologische Einschätzung der Dauer und damit auch der Prognose des Akuten Tubulusschadens und damit des Nierenversagens erfolgen könnte (Kudose et al., 2018).

Bei der Nachsorge von Patienten nach Nierentransplantation sind neben den genannten Einflussfaktoren auf die Nierenfunktion einige Besonderheiten wie weniger Toleranz gegen Schwankungen in der Hämodynamik, erhöhte Infektionsgefahr, Nephrotoxizität einiger Immunsuppressiva, Rekurrenz der Grunderkrankung und auch einige immunologische Faktoren, insbesondere Rejektionen zu beachten (Abu Jawdeh and Govil, 2017).

Letztere spielen insgesamt für das Transplantatüberleben eine wichtige Rolle (Sellares et al., 2012), insbesondere in der Frühphase nach Nierentransplantation sind akute Rejektionen der Hauptgrund für Transplantatversagen (Parajuli et al., 2019).

1.2.3 Therapeutisches Drugmonitoring von Immunsuppressiva

Immunsuppressive Medikamente haben erheblich zum Erfolg der Organtransplantation beigetragen. Wegen enger therapeutischer Breite und signifikanter interindividueller Variabilität der Blutkonzentration benötigen viele dieser Medikamente zur richtigen Dosisfindung therapeutisches Drugmonitoring (Chou, 1993).

Letzteres ist definiert als die laborchemische Bestimmung eines Parameters, der mit passender medizinischer Bewertung direkt die Verschreibung von Medikamenten beeinflusst (Touw et al., 2005).

Therapeutisches Drugmonitoring ist weit verbreitet für die Calcineurininhibitoren CyclosporinA und Tacrolimus, die mTor-Inhibitoren Sirolimus und Everolimus sowie für Mycophenolsäure (Kahan et al., 2002, Shaw et al., 1999). Für die Calcineurin- und mTor-Inhibitoren ist Therapeutisches Drugmonitoring sogar als Teil der Zulassung gefordert, bei Mycophenolsäure ist dies nicht der Fall.

Zwar gibt es Hinweise, dass niedrige Blutspiegel von Immunsuppressiva zu erhöhten Rejektionsraten und höhere Konzentrationen zu vermehrter Toxizität führen (Hedayat et al., 1996, Johnston and Holt, 1999), jedoch ist insbesondere aufgrund des sehr unterschiedlichen klinischen Hintergrunds das therapeutische Fenster für bestimmte Medikamente im Kontext zwischen Rejektionsprophylaxe und Toxizitätspotential interindividuell sehr unterschiedlich (Mohammadpour et al., 2011).

Im klinischen Alltag können daher relativ viele Patienten einer Unter- oder Überimmunsuppression ausgesetzt sein (Brunet et al., 2016, Nashan et al., 2016). Anhand der klinischen Evaluation (Grunderkrankung, individuelle Patientencharakteristika) können Hochrisikopatienten identifiziert werden, ein alltagstaugliches Vorhersagemodell existiert jedoch nicht.

Therapeutisches Drug Monitoring ist bei der Therapiesteuerung zwar hilfreich, aber trotzdem unzureichend. Dies liegt am niedrigen Vorhersagewert der notwendigen Medikamentenexposition und der hohen Varianz der Pharmakokinetik der Immunsuppressiva, insbesondere aufgrund von genetischen Polymorphismen von Stoffwechsellenzymen und Medikamententransportern. Hier könnte zusätzlich paralleles Monitoring von biochemischen Parametern und klinischen Aspekten die individuelle Therapie für Organempfänger optimieren (Brunet et al., 2016).

Die Identifikation von neuen Biomarkern mit besserer Sensitivität und Spezifität für die Steuerung der Immunsuppressiven Therapie ist daher dringend notwendig um die Therapiesteuerung von Organempfängern und somit die klinischen Ergebnisse zu verbessern (Dewitte et al., 2015). Dies kann vor allem durch die Vermeidung bzw. frühzeitige Erkennung von Abstoßungsreaktionen gelingen.

1.2.4 Weitere laborchemische Möglichkeiten zum Monitoring der Transplantatnierenfunktion

Für das weiterführende Monitoring der Organfunktion nach Nierentransplantation, insbesondere auch zur Früherkennung von Komplikationen, sind somit neben der Abschätzung der Transplantatnierenfunktion über die Serumkreatininbestimmung auch weitere Tests notwendig. Im klinischen Alltag sind diesbezüglich bereits das Monitoring von Donorspezifischen Antikörpern (Messung über ELISA oder Luminex-Assay) oder auch Protokollbiopsien im Einsatz. Der Nutzen dieser Parameter für das Langzeittransplantatüberleben ist allerdings noch nicht endgültig geklärt (Schinstock and Gandhi, 2018). Hinzu kommt die Kostenintensität der regelmäßigen HLA-Antikörperbestimmung und im Falle der Biopsien die Invasivität des Verfahrens. Somit sind beide Verfahren keine idealen regelmäßigen Verlaufsparemeter.

Angesichts deutlicher Fortschritte in der Gensequenzierung, der Proteomik und weiterer Labormethoden, befinden sich aktuell einige Biomarker in Entwicklung, um das invasive Verfahren der Transplantatnierenbiopsie in der klinischen Praxis zur

Diagnostik von Komplikationen nach Nierentransplantation zu ergänzen und potentiell zu ersetzen.

So ist es bereits jetzt teilweise möglich, krankheitsspezifische Prozesse auf molekularbiologischer Ebene zu detektieren bevor diese klinisch oder histopathologisch evident werden (Salvadori and Tsalouchos, 2017).

Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass NGAL im Urin (uNGAL - Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin) unabhängiger Risikofaktor für eine verzögerte Funktionsaufnahme des Nierentransplantats und eine schlechtere Langzeitfunktion des Transplantats ist (Rostami et al., 2013, Ramirez-Sandoval et al., 2015).

Nuclear factor kappa B (nf-KB) im Serum zeigte ebenso eine Assoziation mit akuten Rejektionen (Wu et al., 2011) wie erhöhte Level von forkhead box P3 (foxP3) messenger RNA (mRNA) im Urin.

Neben den oben genannten Beispielen gibt es noch viele weitere Biomarker, die in Studien Potential zur besseren Steuerung der Immunsuppression und zum besseren Monitoring der Organfunktion nach Nierentransplantation gezeigt haben. Bisher hat es noch keiner dieser Biomarker geschafft, sich im Alltag zu etablieren.

Ein vielversprechender Ansatz zur Detektion von Transplantatschäden ergibt sich in der Untersuchung von donorspezifischer zellfreier DNA (gcfDNA).

1.3 Zellfreie DNA

1.3.1 Zellfreie zirkulierende DNA

Zellfreie Nukleinsäuren (DNA; RNA) können in menschlichen Körperflüssigkeiten (Plasma/Serum, Urin, Speichel) nachgewiesen werden. Dies gelang erstmals 1940 (Mandel, 1948).

Erst einige Jahrzehnte später hat der Nachweis freier Nukleinsäuren an Bedeutung gewonnen und ist als nicht-invasive, schnelle und sensitive diagnostische Methode bei verschiedensten Erkrankungen (Tumorerkrankungen, Pränataldiagnostik, SLE, Rheumatoide Arthritis, Myokardinfarkt, Schlaganfall) von Nutzen. Es gibt einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen Gewebsschädigung und der Konzentration freier Nukleinsäuren im Plasma. Hintergrund sind hier verschiedenste Mechanismen der Freisetzung der freien Nukleinsäuren, beispielsweise durch Zellyse, Apoptose oder Nekrose, diaplazentaren Durchtritt von freien Nukleinsäuren, aktive Sezernierung durch aktivierte Lymphozyten oder Bluthirnschrankenstörungen (Vishnu Swarup, 2007).

DNA liegt im Körper in der Regel in Form von Chromosomen vor. Diese bestehen aus kompakt gepacktem Chromatin. Das Chromatin wiederum besteht aus DNA in Verbindung mit Strukturproteinen, sogenannten Nukleosomen (= Komplex aus DNA und Histonen). Die Abfolge der Nukleosompakete im Chromatin, welche die DNA dort stabilisieren, wird Solenoidstruktur genannt (Hayes and Hansen, 2001).

Wird zellfreie DNA im Rahmen von Zelltod im Organismus über einen der oben erwähnten Mechanismen freigesetzt, so ist sie in Form von Mononucleosomen, Oligonucleosomen, Nucleolipproteinen oder Apoptotischen Vesikeln in der Blutzirkulation vorhanden.

Je nach Ursache der DNA-Freisetzung sind unterschiedliche Längen an DNA-Fragmenten beschrieben. So finden sich bei Nekrosen DNA-Fragmente von >10000 bp (= Basenpaare), bei Apoptose hingegen deutlich kleinere Fragmente von 180-200 bp (Jiang and Lo, 2016).

Die Halbwertszeit von zellfreier DNA im Plasma ist im Median 16,3 Minuten (4-30 Minuten; beschrieben für fetale cfDNA) (Lo et al., 1999).

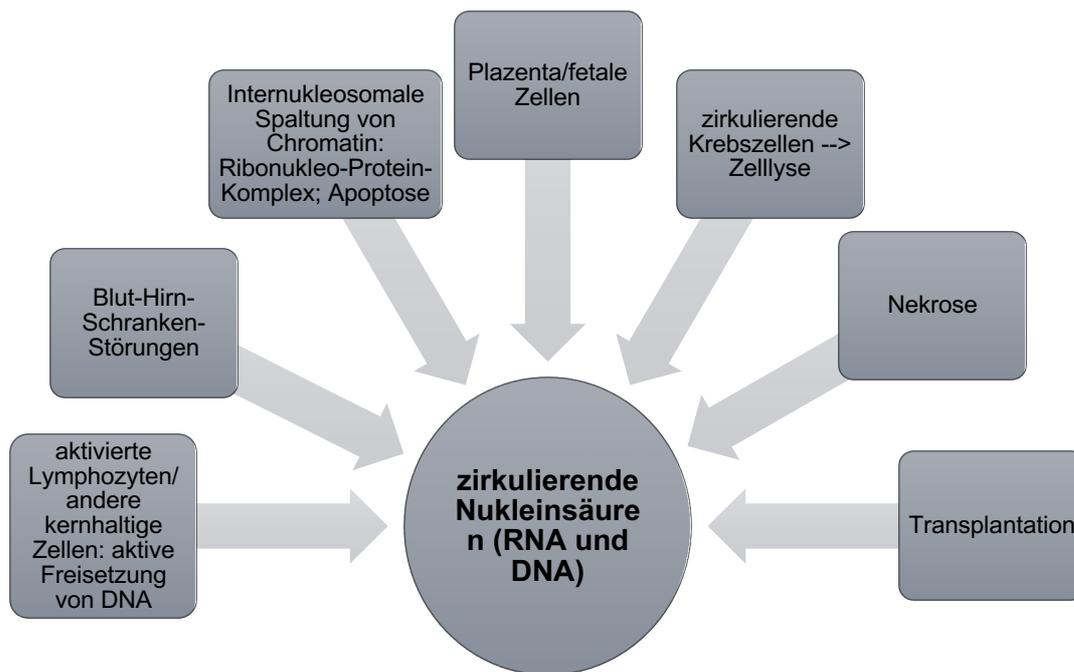


Abbildung 2: Ursprünge zirkulierender Nucleinsäuren. Modifiziert nach (Vishnu Swarup, 2007)

1.3.2 Zellfreie zirkulierende DNA nach Organtransplantation

Der größte Anteil an frei zirkulierender DNA wird im Knochenmark freigesetzt (Lui et al., 2002). Der Anteil an zellfreier DNA, die aus soliden Organen stammt, variiert je nach Organ, ist aber jeweils sehr klein. Einen signifikanten Unterschied zwischen körpereigenen und transplantierten Organen gibt es hierbei nicht solange die transplantierten Organe keinen Schaden haben (Lui et al., 2003).

Da die Freisetzung von zellfreier DNA mit Zelltod assoziiert ist, wird vermutet, dass bei Zelluntergang im Transplantat, etwa bei Abstoßungen oder Zelluntergang anderer Ursache (Infekte, Tumoren des Transplantats, Ischämien), vermehrt zellfreie DNA freigesetzt wird. Ein erhöhter Gehalt an donorspezifischer zellfreier DNA im Urin von nierentransplantierten Patienten mit akuter Rejektion konnte bereits nachgewiesen werden (Zhang et al., 1999).

Der quantitative Nachweis von donorspezifischer zirkulierender DNA ist aufgrund der geringen Menge (ca. 10 Genomkopien/ml Plasma) jedoch schwierig.

Zunächst gelang dies nur durch Y-Chromosom-Sequenzierung in geschlechtsungleichen Spender-Empfänger-Paaren nach Organtransplantation und war somit nur für einen Teil der Patienten möglich (Zhang et al., 1999).

Allen Patienten zugänglich ist die Nutzung der HLA-Mismatches zwischen Donor und Empfänger zur Detektion der zellfreien donorspezifischen DNA. Hierzu ist die Kenntnis der HLA-Typisierung von Spender und Empfänger für die mehreren hundert HLA-

Genotypen sowie die Optimierung der Laborchemischen Assays für jedes Spender-Empfänger-Paar zwingende Voraussetzung (Gadi et al., 2006, Lo, 2011). Durch den sehr großen logistischen und finanziellen Aufwand ist diese Methode nicht alltagstauglich.

Aufgrund zunehmend besserer Verfügbarkeit und kürzerer Messzeit von Einzelmolekülzähltechniken wie z.B. HTS (High Throughput Sequencing) oder dPCR (digital PCR) ist die Messung der donorspezifischen zellfreien DNA als Verlaufparameter für die Transplantatgesundheit in letzter Zeit zunehmend interessant geworden (De Vlaminc et al., 2014, Snyder et al., 2011, Beck et al., 2013a). Zielparameter sind hier jeweils SNPs (Single Nucleotic Polymorphisms) verschiedener Allele bei Organspender und –empfänger.

SNPs entstehen bei Ablesefehlern im Rahmen der DNA-Replikation. Bei der ddPCR werden SNPs verwendet, die bei sogenannten MAFs (Minor Allelic Frequency) – seltener auftretenden Allelen in einer Population – gehäuft auftreten. Vorab werden hierfür aus öffentlich zugänglichen Gendatenbanken (beispielsweise HepMap oder 1000Genomes) geeignete SNPs vorselektioniert. Ziel ist es, geeignete SNPs aus dem Organspenderpool und beim Organempfänger zu finden, die möglichst bei einem (z.B. Empfänger) homozygot auftreten, aber im anderen Organismus (z.B. Organspender) nicht vorhanden sind. Limitation ist hier, die initial notwendige Menge an Untersuchungsmaterial für die Vorselektion der SNPs.

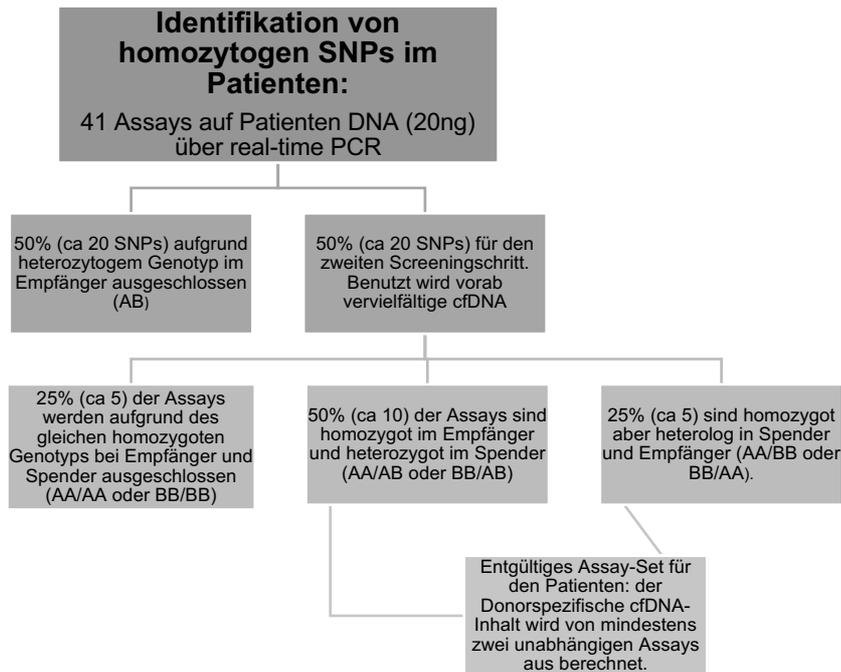


Abbildung 3: Ablaufschema für Selektion von geeigneten SNPs und Messung von GcfDNA. Modifiziert nach (Beck et al., 2013a)

Im ersten Schritt wird DNA aus dem Spendergenom mittels real-time-PCR amplifiziert. Hier werden alle SNPs des Empfängers mit einem heterozygoten Genotyp eliminiert. Im folgenden Schritt wird präamplifizierte cfDNA verwendet. Hier wird mittels ddPCR zwischen SNPs unterschieden, die homozygot im Empfänger sind und entweder homozygot im Empfänger und heterozygot im Spender oder homozygot im Spender und heterolog zwischen Spender und Empfänger. Letztere sind die bevorzugten SNPs des Empfängers (durchschnittlich 5 pro Probe). Die Zahlen wurden für MAF von 0,5% berechnet und können zwischen einzelnen Patienten variieren.

Im Gegensatz zur quantitativen PCR, die meist in Echtzeitmessung eine relative Quantifizierung erzielen kann, ermöglicht die digitale PCR die absolute Quantifizierung von bestimmten Nukleinsäuren einer Probe, z.B. von SNPs. Dies gelingt durch Aufteilen der Probe in viele PCR-Subreaktoren, so dass jeder dieser Teilbereiche entweder einige wenige oder überhaupt keine der Ziel-Nukleinsäuresequenzen enthält. Nach Amplifikation kann mittels Endpunkt-Fluoreszenzmessung eine genaue Quantifizierung der jeweiligen Zielnukleinsäure erfolgen. Hierüber kann die Messung einer effektiven Konzentration auch seltener Nukleinsäuren gelingen.

Als eine Form der digitalen PCR werden in der sogenannten „droplet digital“ PCR wässrige Tropfen als Mikroreaktoren innerhalb einer nicht mischbaren Öllösung verwendet. Die Aufteilung der wässrigen Tropfen erfolgt über magnetische Kügelchen, die die Zielsequenz über gedrosselte Verdünnung aufnehmen können, wo folgend die Amplifikation stattfindet und im Anschluss die genaue Quantifizierung mittels Endpunktfluoreszenz erhoben wird. Die Emulsionen werden mittels mechanischer Scherbewegungen aufrecht erhalten (Quan et al., 2018).

Im Vergleich zum HTS weist die ddPCR Vorteile in Kosten- und Zeiteffektivität auf. Dies äußert sich beispielsweise im Erhalt von Untersuchungsergebnissen innerhalb eines Tages. Somit ist mit der ddPCR eine alltagstaugliche Methode zur Messung von gcfDNA vorhanden.

1.4 Zielsetzung

Alle vorhandenen Parameter zum Patientenmonitoring nach einer Nierentransplantation haben Schwächen. So ergeben sie entweder ein inkomplettes Bild wie TDM oder sind völlig unspezifisch wie konventionelle Laborparameter.

In der weiterführenden Abklärung wird zumeist eine Transplantatnierenbiopsie durchgeführt, um anhand des histopathologischen Bildes eine spezifische Therapie einleiten zu können.

Aus logistischen und forensischen Gründen vergehen bis zur Durchführung und Erhalt des Biopsieergebnisses oft mehr als 24 Stunden. Dies liegt einerseits an den vorab notwendigen laborchemischen Tests zur Evaluation des Interventionsrisikos, aber auch an dem in der Regel nicht rund um die Uhr verfügbarem Personal zur Durchführung der Biopsie. Da die Nephropathologie, insbesondere in der Transplantationsmedizin, sehr viel Expertise seitens des Pathologen erfordert, werden die Biopsien regelhaft an eines der wenigen Nephropathologiezentren versandt. Hierdurch geht allein durch den Transportweg nochmals Zeit verloren.

Donorspezifische zellfreie DNA ist ein vielversprechender Parameter zum Verlaufsmonitoring nach Nierentransplantation.

Insbesondere die Assoziation mit Zellschädigung – wie sie vor allem bei schweren Rejektionen auftritt - und dem hiernach verhältnismäßig schnellen Anstieg der cfDNA im Empfängerplasma, sowie die deutlich verbesserte und nun alltagstaugliche Messmethodik zeigen neue vielversprechende Möglichkeiten zur klinischen Nutzung der donorspezifischen zellfreien DNA auf.

Die Zielsetzung dieses Projekts war die Beurteilung der Bedeutung der Analytik zellfreier DNA aus Nierentransplantaten zum Monitoring von Transplantatschädigungen in den ersten 12 Monaten nach Transplantation. Insbesondere die Evaluation, ob hiermit eine „Liquid Biopsy“ zur Frühdetektion von Rejektion möglich ist.

2 Material und Methoden

2.1 Studienprotokoll

2.1.1 Rekrutierung

Die Rekrutierung erfolgte aus dem Patientenkollektiv der Klinik für Nieren-, Hochdruck- und Autoimmunerkrankungen und des Transplantationszentrums im Klinikum Stuttgart zum Zeitpunkt der Nierentransplantation.

Die Studie wurde mit Zustimmung der Ethik-Kommission (Zulassungsnummer 616/2013BO2-) und nach Aufklärung und schriftlichem Einverständnis mit dem jeweiligen Patienten durchgeführt.

2.1.2 Einschlusskriterien

- Terminale Nierenerkrankung mit geplanter Nierentransplantation
- Einwilligungsfähigkeit

2.1.3 Ausschlusskriterien

- Fehlende Einverständniserklärung zur Studienteilnahme
- Keine spezifischen Altersgrenzen solange die Transplantationsfähigkeit vorlag
- schwangeren Patientinnen (da grundsätzlich Ausschluß Schwangerschaft vor Transplantation)

2.2 Studiendesign

Ab dem Zeitpunkt der Nierentransplantation wurden bei den eingeschlossenen Patienten im Rahmen einer monozentrischen prospektiven Kohortenstudie regelmäßig Daten erhoben, entweder während einer stationären Behandlung oder bei den ambulanten Vorstellungen in der Transplantationsprechstunde.

Die Erhebung der klinischen Daten und der gcfDNA-Werte erfolgten unabhängig voneinander und ohne Kenntnisse der Daten der jeweils anderen Gruppe. Die Entblindung fand erst nach Ende der Datenerhebung statt.

Zu festgelegten Zeitpunkten wurden klinische und laborchemische Daten erfasst sowie gcfDNA in absoluter (cp/mL) Konzentration gemessen. Konnten zu einem der festgelegten Beobachtungszeitpunkte keine Daten erhoben werden, so war dies kein Ausschlusskriterium. Wurde während eines Beobachtungszeitpunkts eine Prednisolonpulstherapie verabreicht, so wurden die gemessenen gcfDNA-Werte nicht berücksichtigt. Die gcfDNA wurden auch nicht in der ersten Woche und nach einer Biopsie berücksichtigt.

Tabelle 2: Beobachtungszeiträume im Studienverlauf ab Zeitpunkt der Nierentransplantation

Visitennummer	Zeitpunkt nach Nierentransplantation
V1	Tag 1
V2	Tag 3 +/- 1
V3	Tag 5 +/- 1
V4	Tag 7 +/- 1
V5	Tag 10 +/- 2
V6	Tag 20 +/- 3
V7	Tag 30 +/- 3
V8	Monat 2 +/- 14 Tage
V9	Monat 3 +/- 14 Tage
V10	Monat 4 +/- 14 Tage
V11	Monat 5 +/- 14 Tage
V12	Monat 6 +/- 14 Tage
V13	Monat 8 +/- 1 Monat

V14	Monat 10 +/- 1 Monat
V15	Monat 12 +/- 1 Monat

Tabelle 3: Beobachtungsparameter im Studienverlauf: Basisparameter und während jeder Visite erhobene Beobachtungsparameter

Basisparameter
<ul style="list-style-type: none"> • Alter bei Studieneintritt • Geschlecht • Kalte Ischämiezeit • (zweite) warme Ischämiezeit • Anzahl der vorherigen Transplantationen • Art der Organspende (postmortal/Lebendspende) <ul style="list-style-type: none"> ○ Bei Lebendspenden: ABO-Kompatibilität, Dialysepflichtigkeit vor Transplantation/präemptive Transplantation • HLA-Mismatch • PRA • CMV-Status (Empfänger/Spender) • Induktionstherapie • Renale Grunderkrankung • Funktionsaufnahme Transplantat (sofort/verzögert)
Beobachtungsparameter (während jeder Visite erhoben)
<ul style="list-style-type: none"> • Tagesdosis Immunsuppressive Therapie (Steroid, Mycophenolsäure, Calcineurininhibitor, mTor-Inhibitor) • Therapeutisches Drugmonitoring der Calcineurininhibitoren (CyclosporinA oder Tacrolimus) mittels Angabe des Medikamentenspiegels • Glucosetoleranzstörung • Dialysepflichtigkeit • Transplantatnierenfunktionsverschlechterung (Anstieg Serumkreatinin > 0,3mg/dl seit der letzten Visite) • Stattgehabte Rejektion • Leukopenie • Anämie • Auftreten von Infekten • Vorhandensein von Diarrhoe • Stationäre Therapie? • Transplantatverlust? • BK-Virämie? • Cytomegalievirämie? • Auftreten von DSA (Donorspezifischen Antikörpern)
Interventionsparameter (bei jeder vorhandenen Visite gemessen)
<ul style="list-style-type: none"> • Serumkreatinin (mg/dl) • Proteinurie

- GcfDNA (%)
- gcfDNA (cp/mL)

2.2.1 Immunologisches Risiko

Die Kriterien zur Differenzierung hinsichtlich hohem und normalem immunologischem Risikoprofil wurden wie folgt definiert:

Tabelle 4: Kriterienkatalog immunologisches Hochrisikoprofil (van Gelder et al., 2010)

Kriterienkatalog immunologisches Hochrisikoprofil	
Erfüllung mindestens einer der folgenden Bedingungen:	
-	Delayed graft function (> eine Dialyse nach Transplantation)
-	Vortransplantierte Patienten (\geq 2. Transplantation)
-	PRA \geq 15 %
-	> 3 HLA-Mismatches
-	Schwarze Hautfarbe

Im Rahmen der Vorbereitung zur Transplantation wird bei allen Patienten der PRA bestimmt. PRA steht für „Panel Reactive Antibody“. In der Testung wird Patientenserum mit einem Feld verschiedener HLA-Antigene inkubiert, die in etwa der Verteilung in der Normalbevölkerung entsprechen. Der PRA gilt als der Prozentsatz positiver Immunreaktionen in diesem Feld und somit als Vorhersagewert einer positiven Crossmatchreaktion. Somit wird der PRA als „Vorhersagewert“ der Vorimmunisierung eines potentiellen Donors verwendet (Mishra and Baliga, 2013).

In unserer Studie wurde zur Ermittlung der Vorimmunisierung der virtuelle PRA (vPRA) in Bezug zur Donorpopulation im Eurotransplant-Gebiet berechnet. Der vPRA wird nur auf der Grundlage von unakzeptablen HLA-Antigenen auf den Loci für HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR und HLA-DQ, die aus dem HLA-Antikörperscreening des jeweiligen Spenders hervorgehen, berechnet (Eurotransplant Reference Laboratory).

2.2.2 Stabilitätskriterien

Um eine Basis für eine möglichst standardisierte Freisetzung (= ohne zusätzliche Noxen am Transplantat) der zellfreien donorspezifischen DNA zu erhalten, wurden innerhalb der Kohorte Stabilitätskriterien festgelegt.

Für die Studienkohorte wurde folgendes definiert:

Tabelle 5: Definition Stabilitätskriterien für die Beobachtungsphase

Stabilitätskriterien
1. Wochenstabilität
NICHT stabil, wenn eines der folgenden Ereignisse zum Visitenzeitpunkt auftritt: <ul style="list-style-type: none">• Rejektion (Mindestabstand zu Rejektion: 15 Tage)• Verzögerte Transplantatnierenfunktionsaufnahme• Einmalige Dialyse• BK-Virämie (innerhalb eines Jahres)• Infektion• Steroidbolus während der Visite (Mindestabstand zu Steroidbolus: 7 Tage)• Plasmapherese im Beobachtungszeitraum
2. Jahresstabilität
alle 15 Visiten im ersten Jahr der Beobachtung erfüllen die Kriterien für die Wochenstabilität
3. Stabile Phase
<ul style="list-style-type: none">• Drei aufeinander folgende Visiten Wochenstabilität UND<ul style="list-style-type: none">○ keine Transplantatnierenfunktionsverschlechterung (definiert als Anstieg Serumkreatinin $\geq 0,5\text{mg/dl}$ und/oder signifikante Proteinurie)○ Keine Veränderung der immunsuppressiven Medikation○ Keine Biopsie○ Mindestens 15 Tage nach Transplantation

In die Datenanalyse gingen Patientendaten ein, die nach erfolgter Nierentransplantation bis maximal 12 Monate (+/- 1 Monat) nach Transplantationsdatum erhoben wurden. In diesem Zeitraum wurden 15 definierte Visitenzeiträume berücksichtigt. Wenn innerhalb eines Tages vor Visite ein Prednisolonpuls gegeben wurde, wurde die jeweilige Visite in der Datenanalyse ausgeschlossen.

2.3 Analytisches Monitoring

2.3.1 Droplet-Digital PCR

Die **Polymerase-Chain-Reaction (PCR)** ist eine in vitro-Technik, die DNA-Abschnitte vervielfältigen und in kurzer Zeit viele Millionen DNA-Kopien eines bestimmten Abschnitts herstellen kann. Es werden typischerweise eine Serie von Temperaturzyklen durchgeführt, die ungefähr 20-40mal wiederholt werden. Hierbei wird zunächst die vorhandene DNA denaturiert. Folgend werden DNA-Oligonukleotide, sogenannte Primer, mit der denaturierten DNA hybridisiert. Sie markieren die DNA-Zielsequenz. Mit jedem durchgeführten Zyklus kommt es zu einer Verdopplung der DNA, im Gesamten zu einem exponentiellen Wachstum (Arya et al., 2005).

Bei der **Real-Time-PCR** werden die PCR-Produkte nach jedem Amplifikationszyklus mittels Fluoreszenztechniken in der exponentiellen Wachstumsphase abgelesen. So kann – wenn mit einer Standardkurve mit der gleichen Amplifikationseffektivität und bekannten Werten kalibriert - eine quantitative DNA-Messung erfolgen (Bustin et al., 2009). Hierfür wird auch der Begriff „**quantitative PCR oder qPCR**“ benutzt. Limitationen des Verfahrens sind die hohe Arbeitsintensität und die eingeschränkte Reproduzierbarkeit (Bustin et al., 2013).

Die **digitale PCR (dPCR)** ermöglicht eine absolute DNA-Quantifizierung mit im Vergleich zur qPCR vereinfachtem Arbeitsaufwand und besserer Reproduzierbarkeit (Vogelstein and Kinzler, 1999). Hierbei wird die Probe mit DNA, die vervielfältigt werden soll, vor Beginn der Amplifikation in kleinste Subreaktoren unterteilt. Diese enthalten entweder wenig Ziel-DNA oder gar keine Ziel-DNA. Nach Abschluss der PCR wird der Anteil der Subreaktoren, die vervielfältigte Ziel-DNA enthalten, mittels Endpunktmessung durch Fluoreszenzsignale gemessen (Huggett et al., 2013). Somit entsteht ein binäres System (Subreaktor mit Ziel-DNA oder Subreaktor ohne Ziel-DNA). Der Anteil an Subreaktoren, die Ziel-DNA enthalten, wird verwendet, um die Zielsequenz mit statistisch definierter Genauigkeit durch Poisson-Verteilung zu quantifizieren (Whale et al., 2013). Durch die Verteilung der Ziel-DNA auf Subreaktoren kommt es zu weniger Konkurrenz um die Primer. Daher ist mittels qPCR die Detektion seltener Mutationen in Proben, die auch Wildtyp-DNA enthalten, möglich. Ein weiterer Vorteil der qPCR ist die Unabhängigkeit von Kalibrierungskurven und somit eine bessere Reproduzierbarkeit.

Die **Droplet Digital PCR (ddPCR)** ist eine Unterform der digitalen PCR, die auf Wasser-Öl-Emulsions-Tropfen-Technologie basiert (Diehl et al., 2006, Hindson et al., 2011).

Die Tröpfchen werden in einer Wasser-Öl-Emulsion gebildet. So formieren sich kleine Untereinheiten, die die einzelnen Ziel-DNA-Moleküle separieren. Jede dieser Untereinheiten funktioniert wie ein kleiner Subreaktor, in dem die PCR stattfindet. Hierdurch sind wesentlich kleinere Probenmengen notwendig als sonst in der dPCR üblich.

Die Probe wird unter Verwendung einer Kombination von Mikrolösungen und patentrechtlich geschützten Surfactantchemikalien in 20000 Tröpfchen separiert. Diese feine Unterteilung der Probe in die Tröpfchen ist ein Schlüsselaspekt der ddPCR-Technik.

Im ddPCR-System wird Ziel-DNA vervielfältigt und mittels Fluoreszenz am Ende der Amplifikation sichtbar gemacht. Positive Tröpfchen, die mindestens eine Kopie an Ziel-DNA enthalten, zeigen im Vergleich zu negativen Tröpfchen, die keine Ziel-DNA enthalten, eine erhöhte Fluoreszenz. So kann die Anzahl positiver und negativer Tröpfchen in jeder Probe gezählt werden. Die Fraktion der positiven Tröpfchen wird dann in eine Poisson-Verteilung eingepasst, um die absolute Kopienzahl der Ziel-DNA in der ursprünglichen Probe zu erhalten. Die **Poisson-Verteilung** ist eine Funktion, die die Auftretenswahrscheinlichkeit einer definierten Anzahl an Ereignissen bestimmt, die unabhängig voneinander in einer definierten Probe stattfinden, wenn die durchschnittliche Auftretenswahrscheinlichkeit dieser Ereignisse bekannt ist.

Für eine korrekte Bestimmung der Ziel-DNA müssen positive Tröpfchen zu Beginn der Analyse nicht zwingend nur eine Kopie der Ziel-DNA enthalten, sondern können auch mehrere Kopien enthalten.

Durch die systemische und maschinell durchgeführte Probenaufteilung in die vielen Tausend Tröpfchen werden Pipettierfehler vermieden. Durch die Vielzahl der Tröpfchen werden im Rahmen der Analyse sehr viele Datenpunkte erhoben, so dass eine hohe statistische Aussagekraft erzielt werden kann und insbesondere DNA-Fragmente mit niedrigen Konzentrationen gut gemessen werden können. Mittlerweile sind Geräte kommerziell erhältlich, die den Prozess der ddPCR automatisiert haben. Damit erlangt das Verfahren eine hohe Alltagstauglichkeit (BIO-RAD).

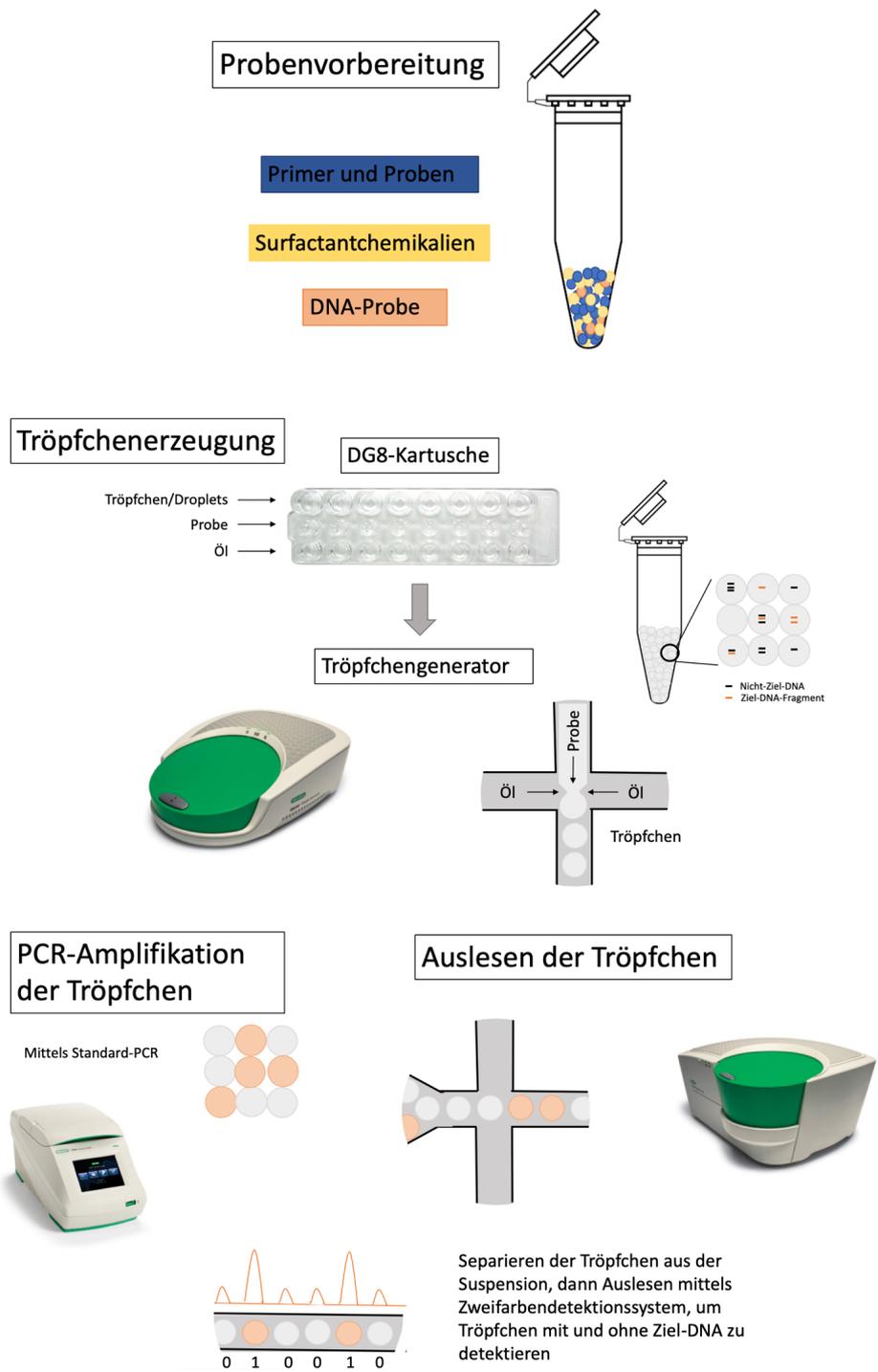


Abbildung 4: Schaubild zur Funktionsweise der ddPCR. Modifiziert nach (BIO-RAD)

2.3.2 Differenzierung zwischen Spender- und Empfänger-DNA

Eine einfache Methode, DNA eines Organempfängers und eines Organspenders in einer Laborprobe zu unterscheiden, kann mittels Verwendung von SNPs (= Single Nucleotid Polymorphism) erfolgen. Hierbei werden sowohl Organspender als auch Empfänger für das Vorliegen bestimmter SNPs untersucht, die im jeweiligen Organismus homozygot vorliegen, jedoch unterschiedlich bei Spender und Empfänger – also heterolog - sind. Limitierend bei dieser Methode ist, dass für diese Untersuchung DNA des Organspenders notwendig ist, die meistens nur schwierig erhältlich ist, insbesondere, wenn die Transplantation Jahre zurück liegt.

Diese Problematik kann unter Verwendung von SNPs, die für ihre MAF (Minor Allelic Frequency) untersucht wurden und deren Auftretenswahrscheinlichkeit beispielsweise größer als 0,4 ist, umgangen werden. Unter der Annahme einer Hardy-Weinberg-Verteilung kommt ein SNP mit einer MAF zwischen 0,4 und 0,5 in homozygoter Form sowohl bei Empfänger als auch bei Spender in 23-25% der Fälle für jedes Allel vor. Benutzt man etablierte Modelle für die Berechnung von Ausschlusswahrscheinlichkeiten (Jamieson and Taylor, 1997), wäre dann die Wahrscheinlichkeit für Spender und Empfänger verschiedene Allele zu haben bei ca. 12%. Um somit mindestens 3 brauchbare SNPs zu identifizieren, müssten mindestens 30-35 verschiedene SNPs untersucht werden. Bei unselektierten SNPs wäre diese Zahl ungleich höher (ca. 3000 Assays).

Über diese SNP-Vergleiche kann die Menge an DNA, die vom Spenderorgan in die Blutbahn des Empfängers freigesetzt wird, berechnet werden und als Biomarker für Organintaktheit verwendet werden.

Sobald die SNPs, die bei Organspender und -empfänger unterschiedlich sind, identifiziert sind, müssen in der Folge nur noch SNPs mit der besten Sensitivität (Homozygot in Spender und Empfänger aber heterolog (unterschiedlich bei Spender und Empfänger)) gemessen werden.

Die einzige Einschränkung dieses Verfahrens ist die Menge an DNA, die untersucht wird, die meistens bestimmt wird durch das Volumen der Blutprobe. Für eine adäquate Menge an SNPs ist eine Blutprobe von mindestens 2ml notwendig (Jung et al., 2003). Eine Amplifikation der freigesetzten DNA kann mit verschiedenen Techniken durchgeführt werden. Für die regelhaft sehr kurze zellfreie DNA (Beck et al., 2009) hat sich jedoch die direkte Adaptor Ligation bewährt (Lo et al., 2010). Nach Ligieren der Amplifikationsadaptoren wird eine moderate Anzahl an DNA-Vermehrungszyklen (ca.

10 Zyklen) durchgeführt. Das hieraus gewonnene Material wird nach Entfernung von Primern und Adaptoren als Vorlage für die oben erwähnten SNP-Abfragen verwendet.

2.3.3 Probenverarbeitung

Bei jeder der durchgeführten Visiten wurden verschiedene Laborproben gewonnen. Für die Quantifizierung der Donor-stämmigen zellfreien DNA wurden EDTA-Vollblutproben von etwa 9ml gewonnen. Innerhalb von zwei Stunden nach Probenabnahme wurde aus dem Vollblut das Plasma separiert und bei -20°C gelagert. Außerdem wurde eine EDTA-stabilisierte Urinprobe von jedem Patienten gewonnen. Die weiterführende Probenverarbeitung wurde bei der Firma Chronix Biomedical in Göttingen durchgeführt.

Bei der ersten Probe jedes Organempfängers wurde zunächst aus den Lymphozyten die DNA des Empfänger-Genoms extrahiert.

Folgend wurde aus etwa 1ml Plasma die zellfreie DNA der Probe extrahiert.

2.3.3.1 SNP Hydrolyse Assay

Aus verschiedenen Sammlungen öffentlicher Datenbanken (z.B. HepMap, 1000Genomes) wurden SNPs ausgewählt, die eine bekannte MAF von $>0,43$ in der weißen Bevölkerung haben.

SNPs in oder unmittelbar anschließend an ein repetitives Element wurden entfernt. Die hiernach verbleibenden SNPs wurden im sogenannten Hydrolyse Assay auf Brauchbarkeit überprüft. Hierbei wird über thermodynamische Berechnungen die Bindungsdifferenz für die zwei Proben, die bei der angestrebten Temperatur von 65°C und unter Standard-PCR-Puffer an die zwei Allele hybridisieren, optimiert.

Da der Kurvenverlauf bezüglich des Schmelzpunktes einer Probe mit DoppelstrangDNA hauptsächlich von der Enthalpie der Probe abhängt, bestimmt die Enthalpie die Selektion für eine maximale Differenz an freier Gibbs-Energie während der Allel-Bindung unter standardisierten Bedingungen (Marky and Breslauer, 1987).

Es wurden 41 Probensets designed, die unterschiedliche Testsubstanzen für jedes der zwei Allele verwendeten. Die Fluoreszenzfärbungen FAM und HEX wurden in Verbindung mit BHQ1 als Quencher verwendet (MWG-Biotech). Unter Verwendung oben beschriebener Bedingungen und publizierter Formeln (Schutz and von Ahsen, 2009) war das mediane theoretische thermodynamische Bindungsverhältnis des designten Allels zum falschen (zweiten) Allel bei 30 (4,2 – 197). Dies ist sicher

ausreichend für die eindeutige Abgrenzung der Allele in den Tröpfchen. Die zugehörigen PCR-Primer wurden so designed, dass die Schmelztemperatur 68°C und die thermodynamische Bindungskapazität bei 60°C > 95% betrug.

Jeder der Assays wurde zunächst unter Hinzugabe des ddPCR Supermix (Labor Bio-Rad) in einem LightCycler 480 (Roche Applied Science) verarbeitet. Folgend wurde die für die ddPCR notwendige Tröpfchengenerierung durchgeführt. Es wurden zwei verschiedene Temperierungen etabliert, um die Effizienz und die Differenzierung der Allele zu maximieren.

Vor der Extraktion der GcfDNA wurden die Plasmaproben bei 4000G für 20 Minuten bei einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Die GcfDNA-Extraktion erfolgte ohne Carrier-RNA mit dem "High Pure Viral Extraction Large Volume Kit" der Firma Roche Applied Science aus Mannheim entsprechend der Anwendungsempfehlungen der Firma. Das erhaltene Volumen war 50µl. Ein künstlicher Spike aus B.taurus-DNA (320Basenpaare, 1-2mL/Probe; B.tau 4.61 BTA3:124.5MB), der vorab mit PCR auf Vektor-klonale Fragmente vorbereitet wurde, wurde unmittelbar vor Hinzugabe des Protease/Bindungs-Puffer der Lösung zugeführt. Das Spike-Produkt wurde in 1,46facher Konzentration gelagert und frisch vor der Extraktion wieder verdünnt.

Bei der ersten Probe jedes Patienten wurde dies in zwei Schritten durchgeführt: einmal mit der aus den Lymphozyten isolierten Genom-DNA des Empfängers und einmal mit der gesamten zellfreien DNA einer Probe. Anhand dieser beiden Proben wurde wie oben beschrieben geeignete Empfänger- und Spender-SNPs identifiziert. Letztere wurde bei der Verarbeitung aller folgenden Proben, wo jeweils nur die zellfreie DNA im Plasma verwendet wurde, als Vorlage verwendet.

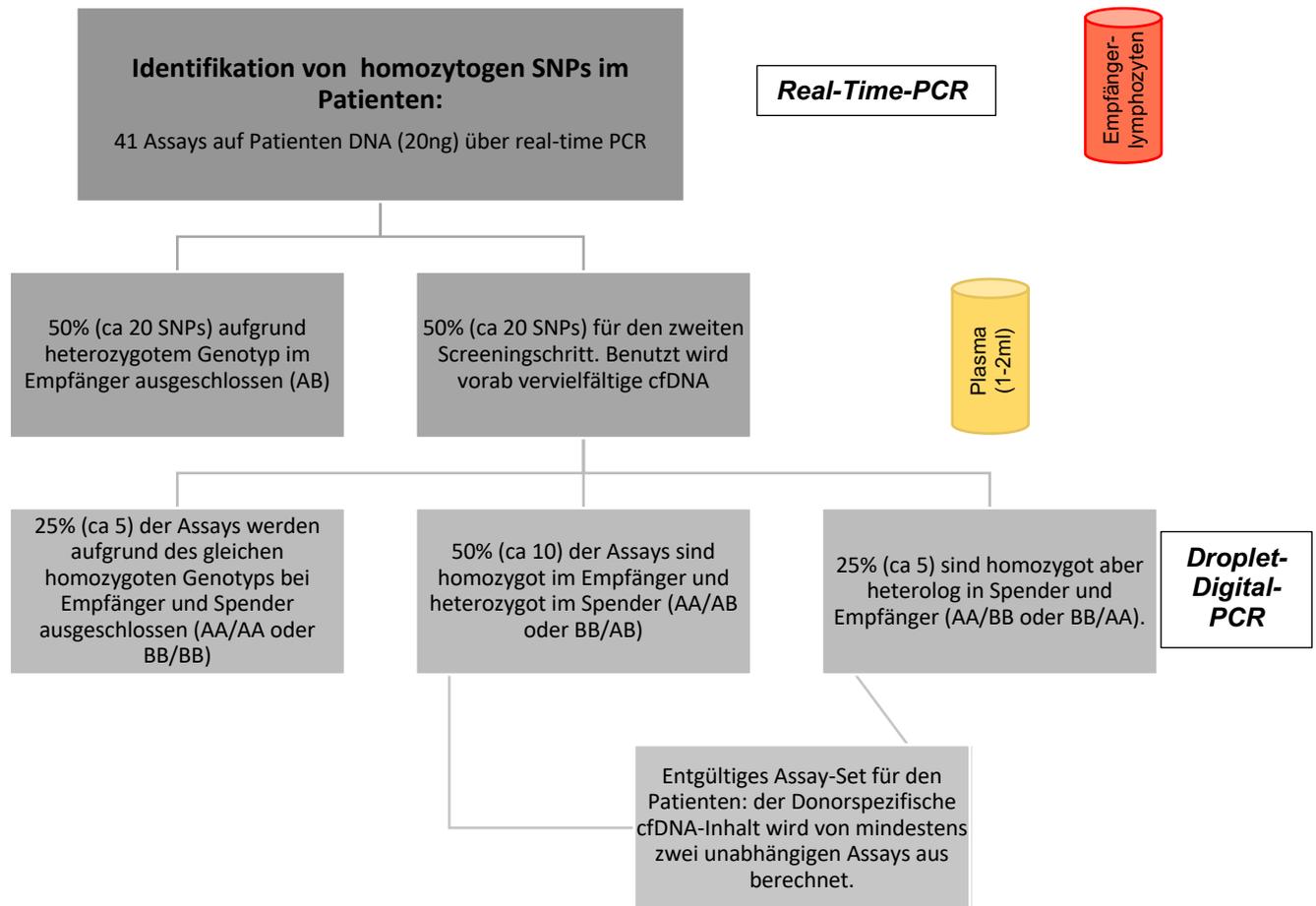


Abbildung 5: Ablaufschema für Selektion von geeigneten SNPs und Messung von GcfDNA. Modifiziert nach (Beck et al., 2013a, Mengel et al., 2012)

Im ersten Schritt wird DNA aus dem Spendergenom mittels Real-time-PCR amplifiziert. Hier werden alle SNPs des Empfängers mit einem heterozygoten Genotyp eliminiert. Im folgenden Schritt wird präamplifizierte cfDNA verwendet. Hier wird mittels ddPCR zwischen SNPs unterschieden, die homozygot im Empfänger sind und entweder homozygot im Empfänger und heterozygot im Spender oder homozygot im Spender und heterolog zwischen Spender und Empfänger. Letztere sind die bevorzugten SNPs des Empfängers (durchschnittlich 5 pro Probe). Die Zahlen wurden für MAF von 0,5% berechnet und können zwischen einzelnen Patienten variieren.

2.4 GcfDNA-Messung

GcfDNA wurde mit „droplet digital PCR“ gemessen, sowohl in Fraktionen (im Verhältnis zur gesamten vorliegenden freien DNA), als auch numerisch mit Kopien pro mL Plasma (cp/mL). Für die Messungen wurde ein QX200 Droplet Digital PCR System der Firma Bio-Rad verwendet. Der Probenursprung wurde mittels Vergabe einer eindeutigen Studiennummer an jeden Patienten maskiert. Diese Studiennummer wurde während der gesamten Studie zur Probenverfolgung verwendet.

2.4.1 GcfDNA- Quantifizierung

Für die absolute Quantifizierung der gcfDNA (cp/mL) wurde die DNA-Extraktions-Effektivität mittels nicht-humaner DNA als interner Standard gemessen. Der absolute gcfDNA-Wert (cp/mL) wird über das Produkt der gesamten zellfreien DNA in der Probe mit der gcfDNA-Fraktion (%) gebildet. Die absolute gcfDNA-Messung hat den Vorteil, dass sie nicht von Veränderungen der Empfänger-stämmigen zellfreien DNA abhängt, welche beispielsweise bei Infektionen oder körperlicher Betätigung vermehrt freigesetzt wird. In Fällen von niedrigen Kopienzahlen kann die Urinanalyse hilfreich sein, um homozygote Donor-SNPs zu identifizieren.

Die verwendeten Primer wurden bei Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) erworben und die Testsubstanzen von Eurofins MWG (Ebersberg, Deutschland).

Jede ddPCR-Reaktion enthielt die folgenden Primer und Proben:

Tabelle 6: Verwendete Primer und Proben der ddPCR-Reaktion

Genetische Assays
S55.F (5'-TGGTTAAACTGTAGTACATCCATGGA-3', 0.6 µmol/L)
S55.R (5'-ACCTTTTGGGACTGGCTTTCT-3', 0.6 µmol/L)
S55.ProbeA (0.15 µmol/L, HEX-acttctcagcaacagCctgga-BHQ1)
S55.ProbeB (0.15 µmol/L, HEX-ctctggaaattcatccagCctgt-BHQ1)
S110.F (0.6 µmol/L, 5'-GGTCCTACCGAGGTGGGTGA-3')
S110.R (0.6 µmol/L, 5'-CATTGCCAAGGACAGAGGGAGA-3')
S110.ProbeA (0.15 µmol/L, HEX-tttggtaggaaggaactcCcaat-BHQ1)
S110.ProbeB (0.15 µmol/L, HEX-atcagtggccattgTgagttcc-BHQ1)
Spike Assays

Spike.F (0.6 µmol/L, 5'-GATGAGTGTTCTGGGTGGAAG-3')

Spike.R (0.6 µmol/L, 5'-CTGTGTCTGCCCATCTCTG-3')

Spike.Probe (0.3 µmol/L, FAM-AGGTCCCTAGTCTCTGCCTTCCC-BHQ1)

Die Zyklusbedingungen waren:

- Initiale Denaturierung: 95°C für 10 Minuten
- 40 Zyklen: 95°C für 30 Sekunden, 55°C für 1 Minute
- Finale Hitzestabilisierung: 98°C für 10 Minuten

Droplet Digital PCR wurden mit einem Volumen von 20µl mit dem QX200-System (Bio-Rad Labore, Hercules, USA) durchgeführt. Hier war jeweils der ddPCR Supermix für Laborproben (Bio-Rad Labore, München) und 2µl an extrahierter zellfreier DNA enthalten. Um die Sensitivität über eine steigende Anzahl an positiven Tröpfchen zu erhöhen, wurden jeweils zwei Assays, die unterschiedliche Einzelkopie-Gen-Loci als Zielsubstanz haben, zusammen mit einem künstlichen Spike-Produkt (FAM channel) in einer ddPCR (HEX channel) kombiniert. 20µl der Spike-Lösung, die für die jeweilige Extraktion benutzt wurde, wurde zu einem endgültigen Volumen von dreimal 50µl verdünnt. Jede der Lösungen wurde doppelt gemessen. Der Mittelwert dieser 6 Messungen der nichtextrahierten Spike-Kontrolle wurde benutzt, um die Spike-Erholungsrate für jede einzelne Probe zu berechnen. Die GcfDNA-Konzentrationen jeder Probe wurden mit der entsprechenden Spike-Erholungsrate korrigiert.

Die Datenanalyse erfolgte mit der QuantaSoft-Software Version 1.7.4 (Bio-Rad) und in für weitere Berechnungen in Excel exportiert.

2.4.2 Urin als alternatives Agens für die Gentypisierung von Donor und Empfänger

Bei einigen Patienten wurde abweichend von der oben beschriebenen Methode Urin-DNA zur Bestimmung des aussagefähigen SNP-Sets benutzt, da in Fällen von niedrigen Kopienzahlen an cfDNA die Urinanalyse hilfreich sein kann, um homozygote Donor-SNPs zu identifizieren.

Die Urin-DNA wurde ohne Carrier-RNA unter Verwendung des High Pure Viral Extraction Large Volume (LV) Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) entsprechend Anwenderempfehlungen der Firma extrahiert. Urin-DNA (4ng) wurde als Matrix in einer Präamplifikationsreaktion benutzt. Jede Präamplifikation enthielt Primer (à 0,1µmol/l) für 10 Assays, die beim Empfänger als homozygoter Genotyp vorlagen.

Diese wurden anhand des initialen Screenings des Empfängers mittels DNA aus Blutzellen bestimmt. In der Präamplifikation wurden 2 Einheiten Faststart Taq Polymerase (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) und 200µmol je dNTP in Roche Faststart Puffer.

Zyklus Konditionen waren:

- 95°C für 10 Minuten
- 10 Zyklen von: 95°C für 30 Sekunden, 64°C für 2 Minuten, 72°C für 30 Sekunden
- Finaler Elongationsschritt bei 72°C für 5 Minuten

Folgend wurde 1µl der Präamplifikationsreaktion für die individuellen ddPCRs benutzt, wodurch der Genotyp des transplantierten Organs bestimmt wurde. Diese wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

2.4.3 Bias DNA-Fragmentlänge

In den meisten klinischen Plasmaproben ähnelt die GcfDNA-Größenverteilung dem Muster von apoptotischer DNA mit drei charakteristischen Längenfraktionen um 180bp, 360bp und 540bp mit den meisten Molekülen in der 180bp-Fraktion. Das Verhältnis der verschiedenen apoptotischen DNA-Längenfraktionen wie auch das Verhältnis von nekrotischer zellfreier DNA kann jedoch zwischen einzelnen Laborproben variieren. Allgemein gesehen entsteht durch die Amplicon-basierte Quantifizierung durch Zufallsverteilung der Schablonenmoleküle abhängig von dem mittleren Molekulargewicht der Fragmente eine gewisse Messabweichung. Um diese Abweichung auszugleichen und bei der Konzentrationsmessung in jeder Probe zu berücksichtigen, wurde ein ddPCR-Assay entwickelt, der Amplicons mit zwei verschiedenen Längen enthält. So kann die DNA-Fragmentlängenverteilung jeder Probe abgeschätzt werden. Es wurde ein Längenindex (ddPCR-LI) der zellfreien DNA berechnet aus einer vier-Einheiten ddPCR mit zwei kurzen Amplicons (92bp und 94 bp) und zwei langen Amplicons (248bp und 250bp). ddPCRs wurden mit ca. 500 Kopien an zellfreier DNA durchgeführt mit einem Reaktionsvolumen von 20µl.

Tabelle 7: Probenbestandteile für die ddPCR-LI-Berechnung

Probenbestandteile für ddPCR-LI-Berechnung
Evagreen dd-PCR-Supermix (Bio-Rad Labore, Hercules, USA)
0,1µmol/l der Kurz-Amplicon-Primer: <ul style="list-style-type: none"> • Chr18-94bp.F CCTGCCTTACCCCCACATCA • Chr18-94bp.R TCCTATGGCCACCTCCAGTCT • Chr5-92bp.F TGCTTCTGACTTTCTCCCTGA • Chr5-92bp.R ACACTGCTGCTGCTGATGAC
0,15µmol/l der Lang-Amplicon-Primer: <ul style="list-style-type: none"> • Chr3-250bp.F CCTCCGGCCCATGTATGTGT • Chr3-250bp.R GCAGTCAATACGGTCCCCCA • Chr20-248bp.F GCTTGAGAACCACTACCTCAGGT • Chr20-248bp.R TATCCCGGGGTGTAGCTGGA).

Zyklusbedingungen waren:

- 95°C für 5 Minuten
- 40 Zyklen: 95°C für 30 Sekunden, 60°C für 30 Sekunden
- 4°C für 5 Minuten
- 90°C für 5 Minuten

ddPCR-LI wurde als anteilige Menge der langen Amplicons definiert und wurde benutzt, um die endgültige absolute Konzentration an zellfreier DNA (cp/mL) zu berechnen.

Hierfür wurde folgende Formel verwendet:

$$korrigierte_cfDNA = \frac{gemessene_cfDNA}{1,32} * \left(\frac{ddPC_LI}{100}\right)^2 + 0,274 * \frac{ddPCR_LI}{100} + 0,515$$

Bei Proben, wo die ddPCR-LI-Messung durch technisches Versagen nicht gelang, wurde eine Standard-Korrekturfaktor von 0,6 benutzt.

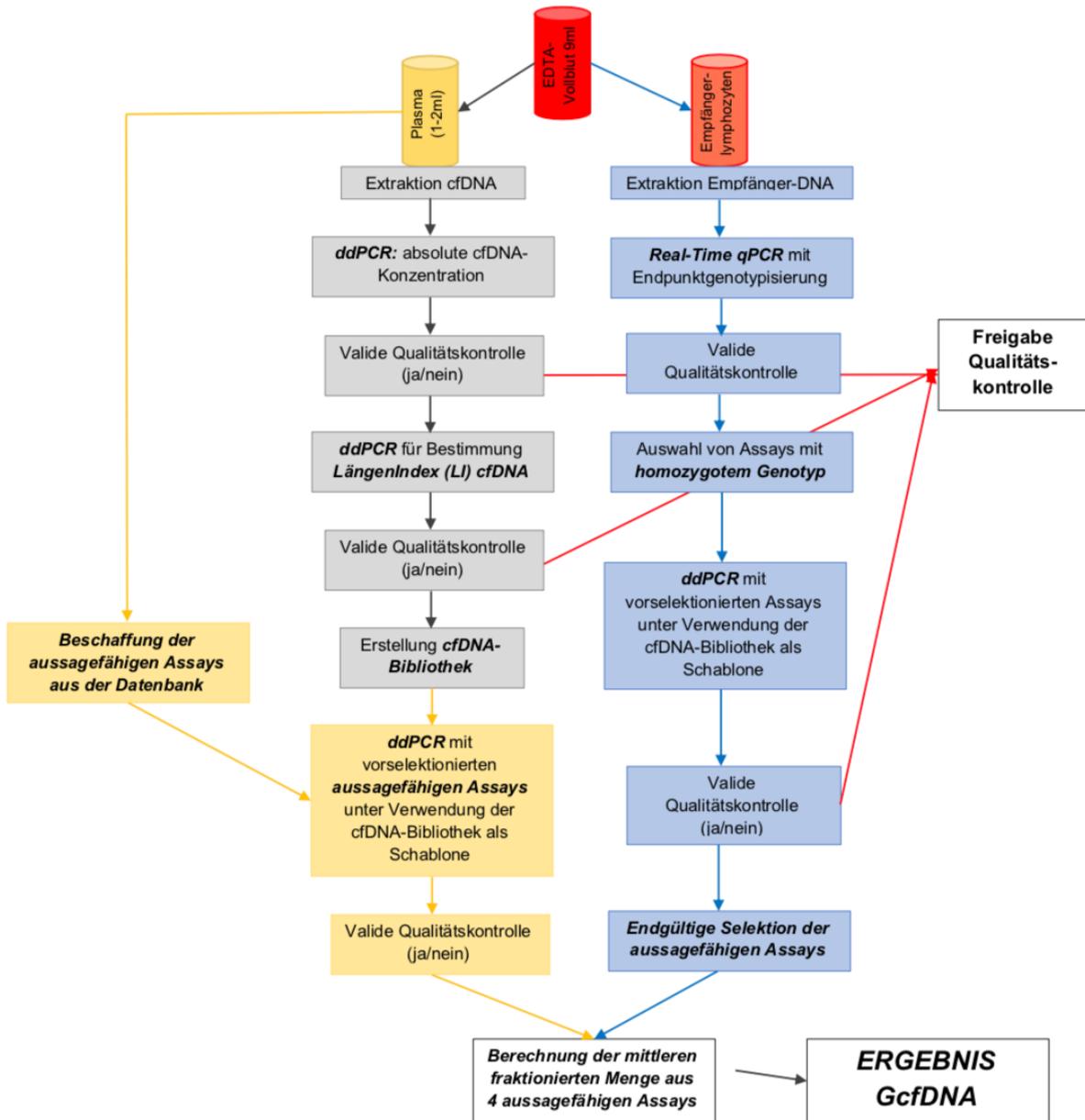


Abbildung 6: Ablaufschema Probenverarbeitung:

Blaue Boxen und Pfeile: Initiale Assay-Selektion

- Genotypisierung Transplantatempfänger und Erstellung der SNP-Sets unter Verwendung der Empfängerlymphozyten und gängiger Datenbanken
- Testung der ausgewählten Assays mit dem Empfänger-genotyp und der cfDNA zur Selektion aussagefähiger Assays (i.D.R. ca 5 Assays)

Gelbe Boxen und Pfeile: bei wiederholten Untersuchungen des gleichen Patienten werden die aussagefähigen Assays aus der initialen Probe wiederverwendet (Speicherung in Datenbank)

Graue Boxen und Pfeile: Arbeitsablauf, der sowohl bei der ersten Probe eines Patienten als auch bei allen folgenden Proben notwendig ist

2.5 Biopsien

Bei klinisch vermuteter Abstoßung wurden perkutane Transplantatnierenbiopsien durchgeführt.

Alle Biopsien wurden von Pathologen beurteilt, die keine Kenntnis über die GcfDNA-Ergebnisse hatten. Die Biopsien wurden von den Pathologen entsprechend der BANFF-Klassifikation bewertet.

Tabelle 8: BANFF-Klassifikation zur Bewertung von Transplantatnierenbiopsien hinsichtlich von Rejektionszeichen (nach (Haas et al., 2014, Mengel et al., 2012, Racusen et al., 2003, Racusen et al., 2004, Racusen et al., 1999, Sis et al., 2010, Solez et al., 1993, Solez et al., 1996, Solez et al., 2008, Solez et al., 2007))

BANFF-Klassifikation			
Qualitätskriterien für Transplantatnierenbiopsien			
Ungenügend		Weniger als 7 Glomeruli und keine Arterien	
Marginal		7 Glomeruli mit einer Arterie	
Adäquat		10 oder mehr Glomeruli mit mindestens 2 Arterien	
Mindestanforderung Aufarbeitung		8 Schnitte: 3HE, 3PAS oder Silberfärbung, 1Trichrom und 1C4d	
Numerische Klassifikation			
Tubulitis („t“)		Tubuläre Atrophie („ct“)	
t0	Keine monoklonalen Zellen in Tubuli	ct0	Keine tubuläre Atrophie
t1	Vereinzelt 1-4 monoklonale Zellen pro Tubulusquerschnitt oder pro 10 tubuläre Zellen	ct1	Tubuläre Atrophie in bis zu 25% des kortikalen Tubulusbereichs
t2	Bereich mit 5-10 monoklonalen Zellen pro Tubulusquerschnitt	ct2	Tubuläre Atrophie in 26-50% des kortikalen Tubulusbereichs
t3	Bereich mit >10 monoklonalen Zellen pro Tubulusquerschnitt oder Anwesenheit von mindestens zwei Bereichen mit Zerstörung der tubulären Basalmembran begleitet von i2/i3-Inflammation und t2-Tubulitis in anderen Biopsiearealen	ct3	Tubuläre Atrophie in >50% des kortikalen Tubulusbereichs
Interstitielle Inflammation („i“)		Interstitielle Fibrose („ci“)	
i0	Keine oder nur minimale Inflammation (<10% des nicht-vernarbten Gewebes)	ci0	Interstitielle Fibrose in bis zu 5% des Cortexbereichs>
i1	10-25% des Parenchyms ist mit Inflammationszellen durchsetzt	ci1	Milde interstitielle Fibrose in 6-25% des Cortexbereichs
i2	26-50% inflammiertes Parenchym	ci2	Moderate interstitielle Fibrose von 26-50% des Cortexbereichs

i3	>50% Inflammation im Parenchym	ci3	Schwere interstitielle Fibrose in >50% des Cortextbereichs
Frühe Allograftglomerulitis („g“)		Allograftglomerulopathie („cg“)	
g0	Keine Glomerulitis	cg0	Keine Glomerulopathie, doppel-konturierte Basalmembranen in <10% der Kapillarschlingen in schwerst angegriffenen Glomerulus
g1	Glomerulitis in >25% der Glomeruli	cg1a	Keine glomerulären Doppelkonturen in der Lichtmikroskopie, aber Doppelkonturierte Basalmembranen (inkomplett oder zirkumferent) in mindestens 3 glomerulären Kapillaren in der Elektronenmikroskopie (EM) verbunden mit Endothelzellschwellung und/oder subendothelialer Erweiterung
		cg1b	Eine oder mehr glomeruläre Kapillaren mit doppelkonturierten Basalmembranen in einem nicht-sklerotisierten Glomerulus in der Lichtmikroskopie
g2	Segmentale oder globale Glomerulitis in 25-75% der Glomeruli	cg2	Doppelkonturen in 26-50% der peripheren Kapillarschlingen im am schwersten betroffenen nicht-sklerotisierten Glomerulus
g3	Glomerulitis (meist global) in >75% der Glomeruli	cg3	Doppelkonturen in >50% der peripheren Kapillarschlingen im am meisten betroffenen nicht-sklerotisierten Glomerulus
Intimale Arteritis („v“)		Fibrinöse Intimaverdickung („cv“)	
v0	Keine Arteritis	cv0	Keine chronischen vaskulären Veränderungen
v1	Milde bis moderate intimale Arteritis in mindestens einem arteriellen Querschnitt	cv1	Gefäßverengung in bis zu 25% des Gefäßlumens durch fibrointimale Verbreiterung der Arterien und Durchbruch der internen Lamina elastica bzw. Anwesenheit von Schaumzellen oder gelegentlich Monoklonalen Zellen
v2	Schwere intimale Arteritis mit mindestens 25% Lumenverdünnung in mindestens einem arteriellen Querschnitt	cv2	Steigender Schweregrad der Veränderungen wie bei cv1 beschrieben mit 26-50% Lumeneinengung der Gefäße
v3	Arterielle Fibrinoide Umbau und/oder transmurale Arteritis mit medialer glatter Muskel-Nekrose und lymphatischer Inflammation	cv3	Schwere Gefäßveränderungen mit >50% Lumeneinengung des Gefäßes
Arteriöle Hyalinose („ah“)		Mesangiale Matrixvermehrung („mm“)	
ah0	Keine PAS-positive hyaline Wandverdickung der Arteriolen	mm0	Keine mesangiale Matrixvermehrung
ah1	Milde bis moderate PAS-positive hyaline Verdickung in mindestens einer Arteriole	mm1	Bis zu 25% der nicht-sklerotisierten Glomeruli sind mit mindestens moderater mesangialer Matrixvermehrung betroffen

ah2	Moderate bis schwere PAS-positive hyaline Verdickung in mehr als einer Arteriole	mm2	26-50% der nicht-sklerosierten Glomeruli sind betroffen (mindestens moderate mesangiale Matrixvermehrung)
ah3	Schwere PAS-positive hyaline Verdickung in mehreren Arteriolen	mm3	>50% der nicht-sklerosierten Glomeruli sind von mindestens moderater mesangialer Matrixvermehrung betroffen
Peritubuläre Kapillaritis („ptc“)		C4d-Färbung	
ptc0	Keine signifikanten kortikalen peritubulären inflammatorischen Veränderungen	C4d0	Negativ
ptc1	Peritubuläre kortikale Kapillaren mit 3-4 luminalen inflammatorischen Zellen	C4d1	Minimale C4d-Anfärbung/Detektion (1- <10%)
ptc2	Peritubuläre kortikale Kapillaren mit 5-10 luminalen inflammatorischen Zellen	C4d2	Fokale C4d-Anfärbung/Detektion (10-50%)
ptc3	Peritubuläre kortikale Kapillaren mit >10 luminalen inflammatorischen Zellen	C4d3	Diffuse C4d-Anfärbung/Dejektion (>50%)
BANFF-Klasse 1: normales Nierengewebe			
BANFF-Klasse 2: Antikörper-vermittelte Veränderungen			
Kann zusätzlich zu Kategorie 3,4,5 und 6 auftreten			
Akute/aktive Antikörper-vermittelte Abstoßung (ABMR)			
- Alle 3 Kriterien müssen erfüllt sein:			
<ol style="list-style-type: none"> <u>Histologischer Nachweis einer akuten Gewebeschädigung</u>, mindestens eines der folgenden Kriterien: <ul style="list-style-type: none"> • Mikrovaskuläre Entzündung (g>0 und/oder ptc>0) • Intimale oder transmurale Arteritis (v>0) • Akute thrombotische Mikroangiopathie (TMA) (Ausschluß andere Ursachen) • Akute Tubulusschädigung (Ausschluß andere Ursachen) <u>Hinweise für aktuelle/kürzlich stattgehabte Antikörper-Endothel-Interaktion</u>, mindestens eines der folgenden Kriterien <ul style="list-style-type: none"> • Linearer C4d-Nachweis in peritubulären Kapillaren (C4d2 oder C4d3 in der Immunfluoreszenz von Gefrierschnitten, oder C4d>0 in der Immunfluoreszenz von Paraffinschnitten) • Mindestens moderate mikrovaskuläre Entzündung (g+ptc≥2) • Vermehrte Expression von Gentranskripten im Biopsiegewebe, die auf eine Endothelzellschädigung hinweisen <u>Serologischer Nachweis von donorspezifischen Antikörpern (DSA)</u> (HLA oder andere Antigene) 			
Chronische aktive Antikörper-vermittelte Abstoßung (CABMR)			
• Alle 3 Kriterien müssen erfüllt sein:			
<ol style="list-style-type: none"> <u>Histologischer Nachweis einer chronischen Gewebeschädigung</u>, mindestens eines der folgenden Kriterien: <ul style="list-style-type: none"> • Transplantatglomerulopathie (cg>0), bei fehlendem Hinweis auf eine chronische thrombotische Mikroangiopathie • Schwere Basalmembranaufsplitterung (multilayerin) der peritubulären Kapillaren (benötigt Elektronenmikroskopie) • Neuauftretene arterielle Intimafibrose (Ausschluß anderer Ursachen) <u>Hinweise für aktuelle/kürzlich stattgehabte Antikörper-Endothel-Interaktion</u>, mindestens eines der folgenden Kriterien <ul style="list-style-type: none"> • Linearer C4d-Nachweis in peritubulären Kapillaren (C4d2 oder C4d3 in der Immunfluoreszenz von Gefrierschnitten, oder C4d>0 in der Immunfluoreszenz von Paraffinschnitten) • Mindestens moderate mikrovaskuläre Entzündung (g+ptc≥2) • Vermehrte Expression von Gentranskripten im Biopsiegewebe, die auf eine Endothelzellschädigung hinweisen 			

3. <u>Serologischer Nachweis von donorspezifischen Antikörpern (DSA) (HLA oder andere Antigene)</u>
C4d-Nachweis ohne Nachweis einer Rejektion
<ul style="list-style-type: none"> • Alle 3 Kriterien müssen erfüllt sein:
<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Linearer C4d-Nachweis in peritubulären Kapillaren</u>, (C4d2 oder C4d3 in der Immunfluoreszenz in Gefrierschnitten, C4d>0 in der Immunfluoreszenz von Paraffinschnitten) <ul style="list-style-type: none"> • Transplantatglomerulopathie (cg>0), bei fehlendem Hinweis auf eine chronische thrombotische Mikroangiopathie • Schwere Basalmembranaufsplitterung (multilayerin) der peritubulären Kapillaren (benötigt Elektronenmikroskopie) • Neuaufgetretene arterielle Intimafibrose (Ausschluß anderer Ursachen) 2. <u>g=0, ptc=0, cg=0 (in der Lichtmikroskopie und so vorhanden in der EM)</u>, v=0, keine TMA, keine Basalmembranaufsplitterung (multilayering) der peritubulären Kapillaren, keine akute Tubulusnekrose(ATN) (mit Ausschluß anderer Ursachen) <ul style="list-style-type: none"> • Linearer C4d-Nachweis in peritubulären Kapillaren (C4d2 oder C4d3 in der Immunfluoreszenz von Gefrierschnitten, oder C4d>0 in der Immunfluoreszenz von Paraffinschnitten) • Mindestens moderate mikrovaskuläre Entzündung (g+ptc≥2) • Vermehrte Expression von Gentranskripten im Biopsiegewebe, die auf eine Endothelzellschädigung hinweisen 3. <u>Keine zelluläre Abstoßung (> BANF IA oder Borderline-Veränderungen)</u>
BANFF-Klasse 3: Borderline-Veränderungen
Kann zusätzlich zu Kategorie 2,5 und 6 auftreten
Verwendung dieser Kategorie bei v=0 , aber eine der beiden folgenden Konstellationen vorliegt
<ul style="list-style-type: none"> • Tubulitis (t1, t2 oder t3) mit minimaler interstitieller Infiltration (i0 oder i1) ODER • Interstitielle Infiltration (i2 oder i3) mit milder Tubulitis (t1)
BANFF-Klasse 4: T-Zell-Vermittelte Rejektion (TCMR)
Kann zusätzlich zu Kategorie 2,5 und 6 auftreten
Akute T-Zell-vermittelte Abstoßung (Typ/Grad)
Ia: t2 + i≥2 Ib: t3 + i≥2 IIa: v1 IIb: v2 III: v3
Chronisch -aktive T-Zell-vermittelte Abstoßung
„Chronische Allograft Arteriopathie“ (Arterielle Intimafibrose mit mononukleärer Zellinfiltration der Fibrose, Neo-Intima-Bildung)
BANFF-Klasse 5: Interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie (IFTA)
Kein Hinweis auf eine spezifische Ursache
(kann unspezifische vaskuläre und glomeruläre Sklerose beinhalten, der Schweregrad wird nach tubulointerstitieller Schädigung eingeteilt)
<u>Grad:</u>
I.: Milde interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie (>25% der Rindenregion)
II.: Moderate interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie (26-50% der Rindenregion)
III.: Schwere interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie (>50% der Rindenregion)

BANFF-Klasse 6: Andere Veränderungen

Kein Zusammenhang mit akuter/chronischer Abstoßung

(kann isolierte g, cg oder cv-Läsionen beinhalten und mit den Kategorien 2, 3, 4 und 5 auftreten)

In der klinischen Auswertung wurden die Biopsien wie folgt eingeteilt:

Tabelle 9: Gruppierung der Rejektionen für die Studie mit entsprechendem Äquivalent in der BANFF-Klassifikation

Studieneinordnung	BANFF-Klassifikation (Pathologe)
Biopsie negativ	Keine Rejektionszeichen (BANFF Klasse 1, 5,6)
Borderline-Rejektion (T-Zell-vermittelt) = borderline TCMR	Borderline-Rejektion (BANFF Klasse 3) – jedoch ohne zusätzlich humorale Komponente
Biopsisch nachgewiesene akute Rejektion	Akute/chronische T-Zell-vermittelte Rejektion (BANFF Klasse 4) oder Akute/chronische Antikörper-vermittelte Rejektion (BANFF Klasse 2) oder Gleichzeitiges Vorhandensein von akuter/chronischer T-Zell- und Antikörpervermittelter Rejektion (BANFF 2 + BANFF 4)

2.6 Abbruchkriterien

Rücknahme der Einverständniserklärung.

2.7 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen wurden unter Verwendung von R3.5.1 (2018-07-02) und Microsoft Excel 2016 Version 16.41 durchgeführt.

Kontinuierliche Daten wurden mittels Medianen und interquartilen Abweichungen oder mittlerer und Standardabweichungen dargestellt. Soweit möglich wurden 95% Konfidenzintervalle aufgeführt. Auftretensfrequenzen wurden im Sinne von Proportionen dargestellt.

Vergleiche von gcfDNA-Freisetzungen in Subgruppen, wie beispielsweise Darstellung der Stablen Phase, Borderline-Rejektionen oder Infektionen, wurden mittels Stichprobenabschnitten über Verwendung von Linearmodellen (Wilcoxon-Rangsummentest) aufgeführt. GcfDNA-Werte wurden logarithmisch transformiert bevor sie in Linearmodellen aufgeführt wurden. Die hieraus resultierenden P-Werte aus paarweisen Vergleichen wurden nicht bereinigt vor Darstellung. Alle p-Werte $<0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

Ausreißer aus der Gruppe in der Stablen Phase wurden mittels Verwendung eines GESD-Tests identifiziert (generalized extreme studentized deviate test for outliers). GcfDNA wurde gleichsam mit diesem Test betrachtet über Dimensionsreduktion mit PCA (principal component analysis). Alle Analysen von diagnostischen Werten (AUC, optimale Grenzen, Sensitivität, Spezifität, positive prädiktive Werte, negative prädiktive Werte) wurden unter Ausschluss von vorab identifizierten Ausreißern durchgeführt. Entsprechend der ICH E9 Richtlinie wurden analytische Ergebnisse für die unbereinigten Datensets ebenfalls dargestellt.

ROC-Analysen wurden dargestellt, um zu beurteilen, wie gut gcfDNA signifikante Ereignisse außerhalb der stabilen Phase im Vergleich zur stabilen Phase erfassen kann. ROC-Kurven und AUCs wurden mit 95%-Bootstrap-Konfidenzintervallen dargestellt. Optimale Grenzen wurden berechnet mittels Verwendung von simultaner Maximierung von Sensitivität und Spezifität. Sensitivität und Spezifität wurden mittels 95%-Bootstrap-Konfidenzintervallen aufgeführt. Diagnostische Odds-Ratios für optimale Grenzen wurden mittels 95%-Konfidenzintervallen dargestellt.

Es wurde eine Sensitivitäts-Analyse durchgeführt unter Verwendung je eines Werts pro Patient per Zufallsprinzip, um den Effekt von wiederholten Messungen auf die ROC-Analyse zu beurteilen.

Die statistische Beratung erfolgte durch Herrn Thomas Asendorf, Leitung der Arbeitsgruppe Biometrie und Studiendokumentation, Institut für Medizinische Statistik, Universitätsmedizin Göttingen.

3 Ergebnisse

3.1 Fallzahl/Patientenkollektiv

Es wurden vorab Daten, die aus dieser Studie hervorgehen, publiziert (Oellerich et al., 2019). Somit gibt es Übereinstimmungen der demographischen Daten in der genannten Publikation und dieser Arbeit.

Im Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Klinikum Stuttgart konnten in Zusammenarbeit mit der Klinik für Nieren-, Hochdruck- und Autoimmunerkrankungen zwischen Oktober 2013 und Februar 2017 (40 Monate) 218 Patienten unmittelbar nach Nierentransplantation in die Studie eingeschlossen werden. Der Beobachtungszeitraum begann jeweils am Tag der Nierentransplantation und endete 12 Monate (+/- 1 Monat) nach Transplantation.

Insgesamt 28 Patienten wurden ausgeschlossen. Grund hierfür war fehlendes Einverständnis seitens der Patienten in 27 Fällen. In einem Fall fand die Transplantation nicht statt. Von den 190 Patienten, die in die Studie eingeschlossen wurde, wurden nur 189 analysiert, da ein Patient im Studienverlauf sein Einverständnis zurückzog.



Abbildung 7: Darstellung Rekrutierungsprozess (analog (Oellerich et al., 2019))

Von den eingeschlossenen Patienten waren 69 Patienten weiblich (36,5%) und 120 männlich (63,5%). 184 Patienten (entsprechend 97,4%) waren kaukasischer Rasse, 5 (entsprechend 2,6%) asiatischer Rasse.

21 Patienten im Kollektiv (11,1%) wurden präemptiv transplantiert. Die übrigen 168 Patienten (88,9%) waren vor der Transplantation von einem alternativen Nierenersatzverfahren abhängig (Hämodialyse oder Peritonealdialyse).

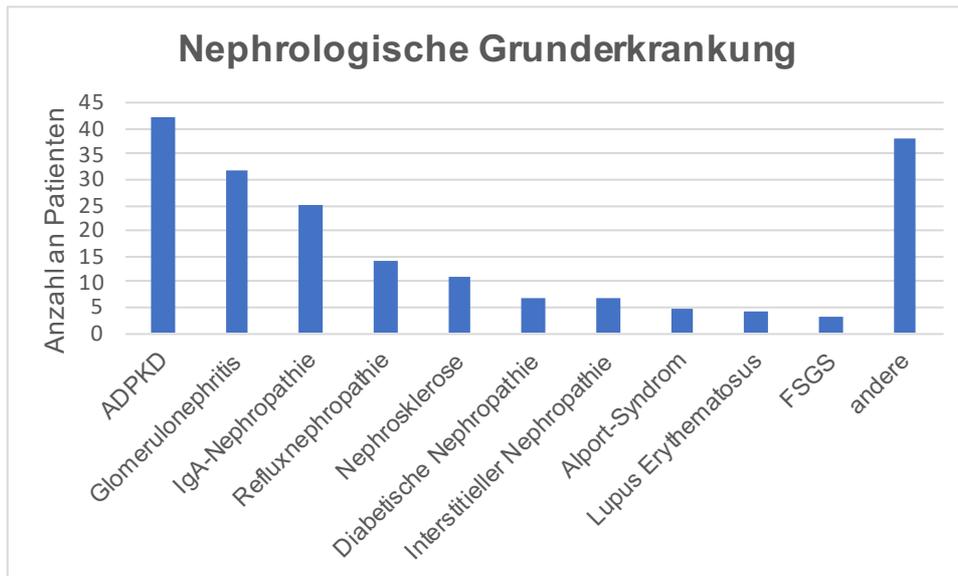


Abbildung 8: Verteilung der nephrologischen Grunderkrankung im Patientenkollektiv (analog (Oellerich et al., 2019))

Während des Beobachtungszeitraums wurden 118 der Nierentransplantatempfänger (61,9%) im Rahmen einer Verstorbtenenspende transplantiert, 71 Patienten (37,6%) erhielten das transplantierte Organ im durch eine Lebendspende. Der jeweilige Spender war größtenteils Ehe- bzw. Lebenspartner oder Verwandter 1.Grades.

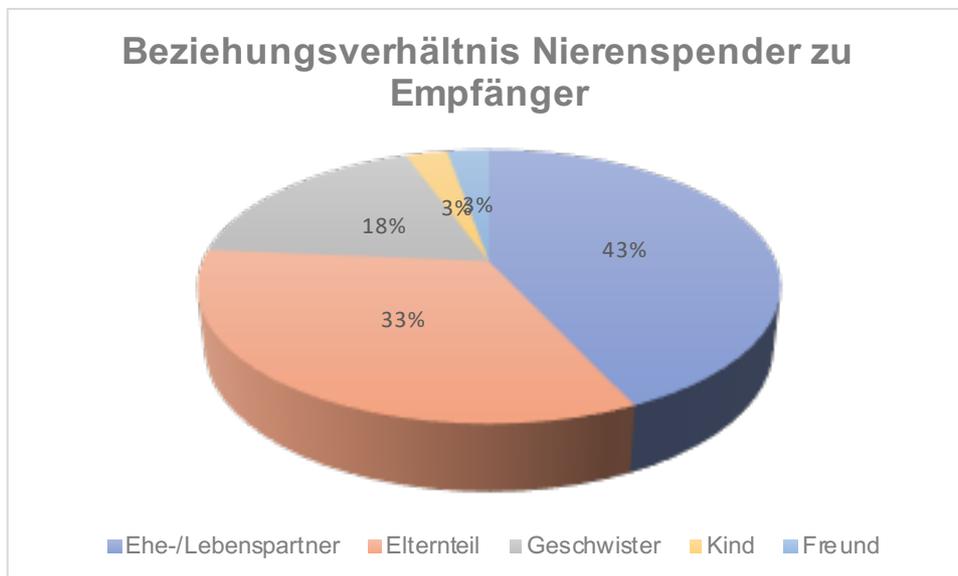


Abbildung 9: Beziehungsverhältnis zwischen Nierenspender und Empfänger bei den Lebendnierentransplantationen

Von den Transplantationen wurden 165 Nieren AB0-kompatibel (87,3% - hierin enthalten sind alle Transplantationen durch Verstorbtenenspende und 47 Transplantationen durch Lebendspende (24,88% des Gesamtkollektivs, 66,20% aller Lebendtransplantationen)) und 24 Nieren (12,7% des Gesamtkollektivs, 33,8% aller

Lebendspenden) AB0-inkompatibel durchgeführt. Bei Letzteren erfolgte zusätzlich zur Induktionstherapie vorab eine AB0-Antikörper-Desensibilisierung mittels B-Zell-Depletion (Rituximab 375mg/m²KÖF) gefolgt von Plasmaseparation, bis der AB0-Titer ausreichend gesenkt war.

Von den 189 untersuchten Patienten wurden 161 (85,2%) zum ersten Mal transplantiert. Für 23 Patienten (12,2%) war es die zweite Nierentransplantation, für 4 Patienten (2,1%) die dritte Nierentransplantation und für eine Patientin (1%) die fünfte Transplantation. Es befanden sich keine Patienten im Kollektiv, die Viertnierentransplantiert wurden.

Tabelle 10: Kriterienkatalog immunologisches Hochrisikoprofil (van Gelder et al., 2010)

Kriterienkatalog immunologisches Hochrisikoprofil	
Erfüllung mindestens einer der folgenden Bedingungen:	
-	Delayed graft function (> eine Dialyse nach Transplantation)
-	Vortransplantierte Patienten (≥ 2. Transplantation)
-	PRA ≥ 15 %
-	> 3 HLA-Mismatches
-	Schwarze Hautfarbe

127 Patienten der Kohorte (67,2%) erfüllten die festgelegten Kriterien für ein immunologisches Hochrisikoprofil.

Bei insgesamt 55 Patienten (29,1%) kam es zu einer verzögerten Aufnahme der Transplantatnierenfunktion („Delayed Graft Function“), welche für die untersuchte Kohorte als mehr als eine postoperative Dialyse nach Transplantation definiert wurde. In der Kohorte gab es 28 Patienten (14,8%), die mindestens das zweite Mal ein Nierentransplantat erhielten.

Einen PRA von ≥15% hatten im Patientenkollektiv insgesamt 27 Patienten (14,3%).

Neben der PRA-Bestimmung erhalten die Patienten vor Listung zur Nierentransplantation ein HLA-Antikörper-Screening. Im hier untersuchten Patientenkollektiv fanden sich vor Transplantation bei insgesamt 35 Patienten (18,52%) präformierte HLA-Antikörper.

Während des Allokationsprozesses wird ein HLA-Matching auf 3 HLA-Antikörper-Loci ermittelt (Klasse I: HLA-A, HLA-B, Klasse II: HLA-DR). Ab einem HLA-Mismatch > 3

besteht ein erhöhtes immunologisches Risiko (s. Tabelle). In der untersuchten Kohorte hatten 81 Patienten (40,2%) ein HLA-Mismatch >3.

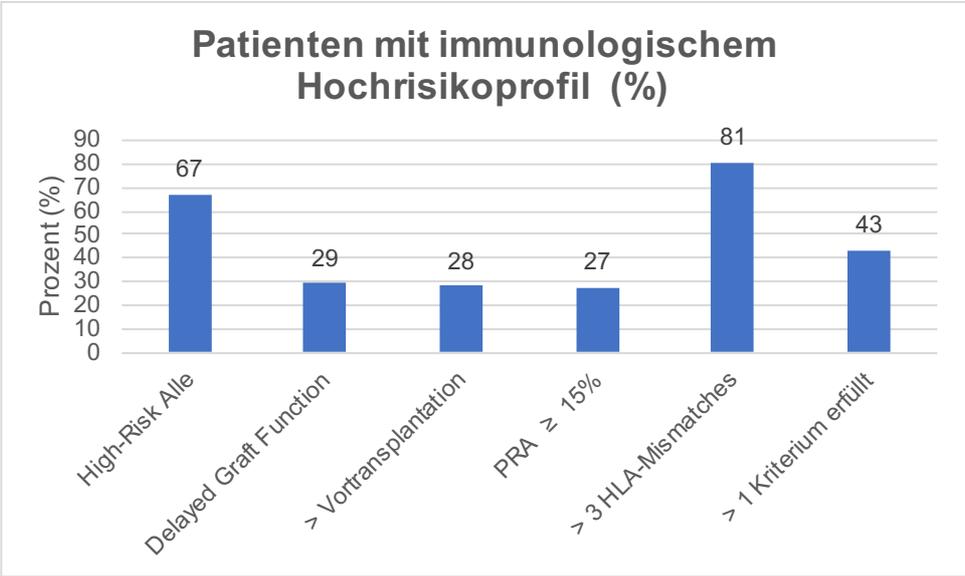


Abbildung 10: Anteil an Patienten im immunologischem Hochrisikoprofil. Prozentuale Verteilung der Einzelkriterien und Darstellung des Gesamtanteils, jeweils im Vergleich zur Gesamtkohorte (analog (Oellerich et al., 2019))

3.2 Frühphase nach Transplantation

Alle Patienten im Kollektiv erhielten nach einer Induktionstherapie mit Prednisolonpulsen sowie Basiliximab oder Anti-Thymozyten-Globulin eine immunsuppressive Erhaltungstherapie mit Tacrolimus, Mycophenolsäure und Prednisolon. Die Induktionstherapie wurde entsprechend immunologischem Risikoprofil ausgewählt: Basiliximab bei Standardrisiko, Anti Thymozyten-Globulin (im Studienkollektiv wurde das Präparat Thymoglobulin® verwendet) bei höherem Risiko. Bei sehr hohem immunologischem Risikoprofil (in der Regel bei höchstgradig vorimmunisierten Patienten, die im „Acceptable Mismatch Program“ alloziert wurden) wurde ggf. noch eine Plasmaseparation präoperativ durchgeführt. Bei Patienten, die im Rahmen einer Lebendnierenspende ABO-Blutgruppenungleich transplantiert wurden, wurde zur präoperativen Desensibilisierung 4 Wochen vor Transplantationsdatum eine B-Zell-Depletion mit Rituximab (375mg/m²KÖF) und entsprechend Höhe des ABO-Antikörpertiters eine oder mehrere prä- und postoperative Sitzungen der Plasmaseparation mit Plasmapherese (gegen Humanalbumin und/oder FFP (Fresh Frozen Plasma)) oder Immunadsorption durchgeführt. Bei der Immunadsorption wurde in den meisten Fällen eine unselektive Adsorbersäule verwendet (Globaffin®). In seltenen Fällen (unzureichende Senkung der Antikörpertiter) wurde auch ein spezifischer Adsorber für Blutgruppenantigene verwendet (Glykorex®).

3.2.1 Immunsuppressive Therapie

Tabelle 11: verwendetes immunsuppressives Regime zur Induktionstherapie

Induktionstherapie		
Medikament	Indikation	Dosierung
Prednisolon	Standardinduktion	250mg i.v. unmittelbar präOP und 6 Stunden PostOP 50mg i.v. am 1. postOP Tag
Basiliximab	Standardinduktion	20mg i.v. unmittelbar präOP 20mg i.v. am 4. postOP-Tag
Thymoglobulin®	Induktion bei immunologischen (statt Basiliximab) hohem Risiko	1,0-1,5mg/kg KG an 2-9 Tagen, Beginn am OP-Tag Individuelle Gesamtdosisfestsetzung entsprechend Suppression CD3-positiver Leukozyten und Blutbildveränderungen; Zielgesamtdosis in der Regel 4,5 bis maximal 6mb/kg/KG
Rituximab	AB0-Desensibilisierung bei Blutgruppenunverträglicher Transplantation	375mg/m ² KÖF 4 Wochen vor Transplantation

Tabelle 12: verwendetes immunsuppressives Regime zur Erhaltungstherapie

Erhaltungstherapie		
Medikament	Indikation	Dosierung
Prednisolon	Standarderhaltung	0,5mg/kg KG vom 2. Bis 13. postOP Tag 20mg absolut 14.-27. postOP Tag 15mg absolut 28.- 41. postOP Tag 12,5mg absolut 42.-55. postOP Tag 10mg absolut 56.-69. postOP Tag 7,5mg absolut 70.-83. postOP Tag 5mg absolut dauerhaft ab 84. postOP Tag
Tacrolimus	Standarderhaltung	Individuelle Steuerung nach Talspiegel (<i>kursiv: HLA- bzw. ABO-inkompatibel transplantierte Patienten</i>): <ul style="list-style-type: none"> • 8-10µg/l in der ersten Woche postoperativ (10-12µg/l) • 6-8µg/l 2. Woche bis Monat 3 nach Transplantation (8-10µg/l) • 4-6µg/l ab Monat 4 nach Transplantation (6-8µg/l) • 3-5µg/l ab Monat 13 (5-7µg/l) • alternative Steuerung je nach Verlauf und immunologischem Risiko
Mycophenolsäure	Standarderhaltung	In der Regel Myfortic® verwendet <ul style="list-style-type: none"> • 2x720mg bis 3. Monat postOP; alternativ Cellcept® 2x1000mg • Dosisreduktion individuell entsprechend immunologischem Risiko und Nebenwirkungen

Im untersuchten Kollektiv erhielten 139 Patienten (73,5%) den IL2-Antagonisten Basiliximab zur Induktionstherapie, 27 Patienten (14,3%) erhielten Anti-Thymozyten-Globulin. Im Rahmen einer ABO- oder HLA-inkompatiblen Transplantation wurde

zusätzlich Rituximab verabreicht. Insgesamt 21 Patienten (11,1%) erhielten Rituximab und Basiliximab, 2 Patienten (1,1%) erhielten Rituximab und Thymoglobulin.

Die Patientengruppe, die zusätzlich Rituximab erhielt, wurde nicht automatisch als immunologisches Hochrisikoprofil gewertet. Auch die Entscheidung, welches Medikament zur Induktion verwendet wurde, richtete sich im Studienkollektiv nicht streng nach der o.g. Kriterienkatalog des immunologischen Hochrisikoprofils, sondern lag im Ermessen des jeweils verantwortlichen Arztes.

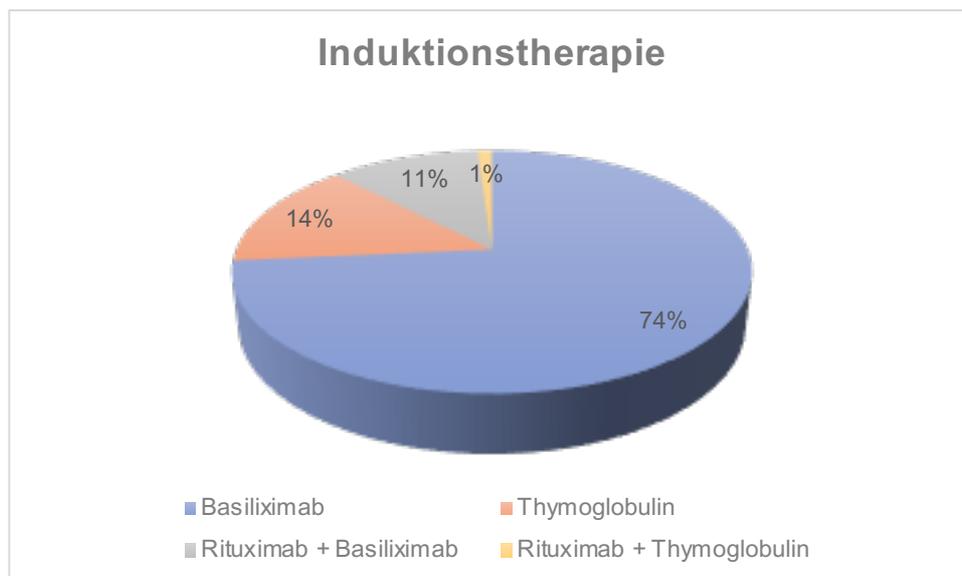


Abbildung 11: Verteilung der Induktionstherapie im Studienkollektiv (analog (Oellerich et al., 2019))

3.2.2 Ischämiezeiten

Die anfallenden Zeiten, während das zu transplantierende Organ nicht perfundiert ist, werden als Ischämiezeiten dokumentiert.

Hierbei ist die „Kalte Ischämiezeit“ (KIZ) definiert als Zeitintervall zwischen Perfusionsstopp im Spender (Abklemmen der Spenderarterie) bis zum Zeitpunkt der Reperfusion des Organs im Empfänger.

Die „Warme Ischämiezeit“ (WIZ) bezeichnet die Zeit, während das Organ nicht perfundiert ist und auch nicht gekühlt ist. Es gibt zwei Warme Ischämiezeiten. Die Erste Warme Ischämiezeit ist die Zeit vom Abklemmen des Organs im Spenderkreislauf bis zum Einbringen in die gekühlte Konservierungslösung. Die Zweite Warme Ischämiezeit bezeichnet die Zeit von der Entnahme aus der gekühlten Konservierungslösung bis zum Wiederanschluß an den Empfängerkreislauf. Die im Studienkollektiv erfasste WIZ bezeichnet immer die „Zweite Warme Ischämiezeit“.

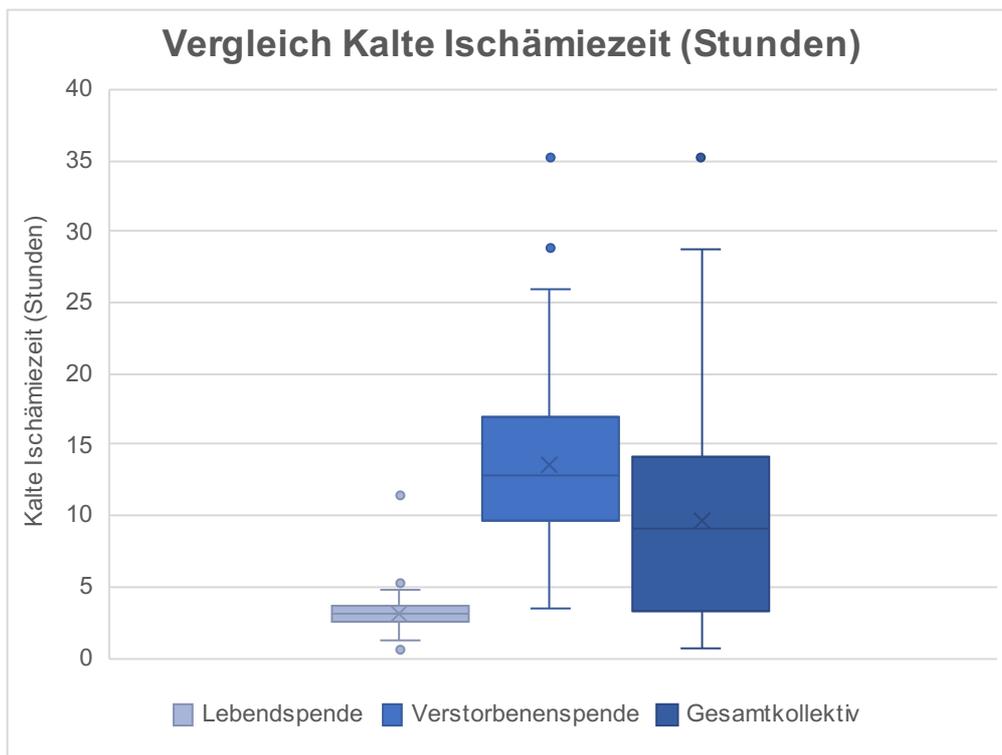


Abbildung 12: Darstellung der Kalten Ischämiezeiten bei Lebendspenden, Verstorbenspenden und im Gesamtkollektiv.

Die Box-Plots zeigen innerhalb der Boxen den Interquartilrange und den Median an, die Klammern zeigen bei fehlenden Ausreisserwerten den Minimal- bzw. Maximalwert an. Ausreisserwerte wurden definiert als außerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstands. Bei Vorhandensein von Ausreisserwerten zeigen die Klammern den ersten Wert innerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstand an.

Tabelle 13: Vergleich Kalte Ischämiezeit im Studienkollektiv.

Jeweils Angabe von Minimalwert, Maximalwert, Median sowie Quartilen

		Lebendspende	Verstorbenspende	Gesamtkollektiv
KIZ (h)	Min	39 min	3 h 48 min	39 min
	Q1	2 h 38 min	9 h 42 min	3 h 23 min
	Median	3 h 08 min	12 h 55 min	9 h 11 min
	Q3	3 h 35 min	16 h 50 min	14 h 12 min
	Max	11 h 23 min	35 h 13 min	35 h 13 min

Die mediane KIZ im Studienkollektiv war 9 Stunden und 11 Minuten (minimal 39 Minuten, Interquartilrange 3 Stunden 23 Minuten – 14 Stunden 12 Minuten, maximal 35 Stunden 12 Minuten). Die mediane WIZ war 47 Minuten (minimal 21 Minuten, Interquartilrange 37 Minuten – 60 Minuten, maximal 127 Minuten).

Bei den 71 Transplantationen im Rahmen einer Lebendspende war die mediane KIZ bei 3 Stunden 08 Minuten (minimal 39 Minuten, Interquartilrange 2 Stunden 38 Minuten – 3 Stunden 35 Minuten, maximal 11 Stunden 23 Minuten), die mediane WIZ bei 37

Minuten (minimal 23 Minuten, Interquartilrange 32 Minuten – 47 Minuten, maximal 73 Minuten).

Die Ischämiezeiten bei den Transplantationen im Rahmen einer postmortalen Organspende waren im Median 12 Stunden 55 Minuten für die KIZ (minimal 3 Stunden 29 Minuten, Interquartilrange 9 Stunden 42 Minuten – 16 Stunden 52 Minuten, maximal 35 Stunden 12 Minuten) und 53 Minuten für die WIZ (minimal 21 Minuten, Interquartilrange 43 Minuten – 64 Minuten, maximal 127 Minuten).

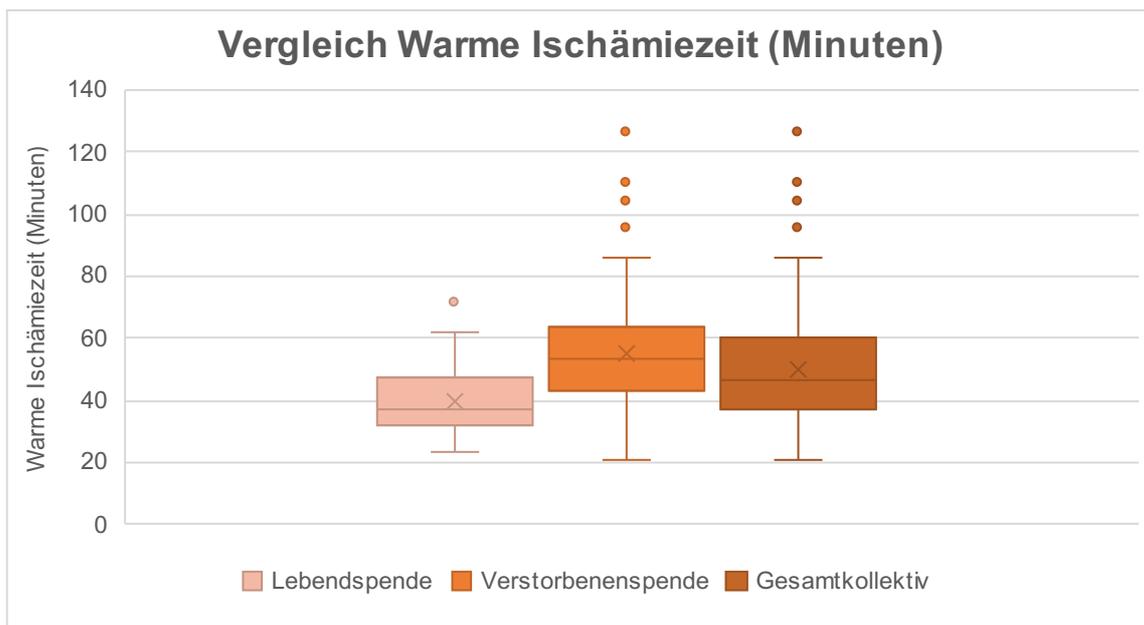


Abbildung 13: Darstellung der Warmen Ischämiezeiten bei Lebendspenden, Verstorbenenspenden und im Gesamtkollektiv.

Die Box-Plots zeigen innerhalb der Boxen den Interquartilrange und den Median an, die Klammern zeigen bei fehlenden Ausreisserwerten den Minimal- bzw. Maximalwert an. Ausreisserwerte wurden definiert als außerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstands. Bei Vorhandensein von Ausreisserwerten zeigen die Klammern den ersten Wert innerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstand an.

Tabelle 14: Vergleich Warme Ischämiezeiten im Studienkollektiv.

Jeweils Angabe von Minimalwert, Maximalwert, Median sowie Quartilen

		Lebendspende	Verstorbenenspende	Gesamtkollektiv
WIZ (min)	Min	23	21	21
	Q1	32	43	37
	Median	37	53	47
	Q3	47	64	60
	Max	73	127	127

3.3 Ereignisse im Verlauf des Beobachtungszeitraums

3.3.1 Entwicklung von Donorspezifischen Antikörpern (DSAs)

Das im Beobachtungszeitraum nach Nierentransplantation durchgeführte HLA-Antikörperscreening (ELISA und/oder Luminex) erbrachte bei 11 der 189 Patienten (5,82%) die Detektion von gegen das zum Studieneintritt transplantierte Organ gerichteten HLA-Antikörpern („Donor-spezifische Antikörper“ (DSA)).

Das Auftreten von DSAs war unabhängig vom Auftreten einer Transplantatnierenfunktionsverschlechterung.

3.3.2 Verschlechterung der Transplantatnierenfunktion

Im Beobachtungszeitraum wurden 431 Ereignisse einer akuten Verschlechterung der Transplantatnierenfunktion dokumentiert. Bei 161 Patienten (85,2%) im Studienkollektiv trat im Verlauf mindestens einmal eine Verschlechterung der Transplantatnierenfunktion auf. Diese wurde definiert als Anstieg des Serumkreatinins um mehr als 0,3mg/dl und/oder Auftreten einer signifikanten Proteinurie. Letztere wurde definiert als Anstieg auf mindestens das Doppelte im Vergleich zum Vorwert.

3.3.2.1 Transplantatnierenbiopsien

Daten aus diesem Abschnitt wurden bereits vorab publiziert ((Oellerich et al., 2019).

Die Indikation zur Durchführung einer Transplantatnierenbiopsie wurde im Allgemeinen gestellt, wenn es zu einem Anstieg des Serumkreatinins $> 0,3\text{mg/dl}$ oder einer Verdopplung der Proteinurie in mindestens zwei aufeinander folgenden Messungen kam im Sinne der oben beschriebenen Definition der akuten Transplantatnierenfunktionsverschlechterung.

Zusätzlich wurden bei ausgewählten Patienten mit sehr hohem immunologischen Risikoprofil wie beispielsweise Vorliegen von DSA (de novo aufgetreten oder präexistent) oder bei vorhergehender Transplantation mit Organverlust durch antikörper-vermittelte Rejektion Protokollbiopsien durchgeführt.

Bei wenigen Patienten wurden zudem Kontrollbiopsien nach Rejektionstherapie durchgeführt. Indikationen hierfür waren insbesondere schwere Rejektionen, wo das Therapieansprechen ohne erneute Biopsie schwierig abzuschätzen war. Die Entscheidung zur Durchführung einer Kontrollbiopsie wurde jeweils vom verantwortlichen Arzt getroffen.

Die histopathologische Beurteilung erfolgte im Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg oder am Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Heidelberg, jeweils ohne Kenntnis der gcfDNA-Werte zum Zeitpunkt der Biopsie und wurde entsprechend BANFF-Klassifikation ausgewertet.

Entsprechend der oben genannten Kriterien wurden im Beobachtungszeitraum insgesamt 375 Transplantatnierenbiopsien durchgeführt. Diese waren auf 111 unterschiedliche Patienten verteilt, das heißt bei 58,73% der Patienten wurde mindestens eine Transplantatnierenbiopsie durchgeführt.

Die Biopsien wurden entsprechend histopathologischem Befund eingeteilt.

Bei 129 Biopsien (42,4%) (bei 50 Patienten) gelang die kategorisierte Zuordnung zu einer definierten Gruppe:

12 der Biopsien (3,20%) (bei 7 Patienten) waren sogenannte negative Biopsien, das heißt ohne Rejektionszeichen oder anderen Organschaden.

In insgesamt 56 Biopsien (14,93%) konnten Abstoßungsreaktionen nachgewiesen werden. Hiervon zeigten 34 Biopsien T-Zellvermittelte Borderline-Rejektionen („Borderline-TCMR), (9,01% aller Biopsien, 60,7% aller nachgewiesenen Rejektionen). 22 Biopsien (5,87% aller Biopsien, 39,3% aller nachgewiesenen Rejektionen) ergaben B-Zell- oder T-Zell-induzierte Rejektionen.

Bei einem großen Teil der Biopsien (216 Biopsien, entsprechend 57,6% aller Biopsien) konnte keine eindeutige Zuordnung erfolgen. Hierunter waren Biopsien im Rahmen von Rejektionen unter Therapie, oder an infektiologischen Gewebeveränderungen wie beispielsweise BK-Nephropathien oder dem Nachweis von Mikroabszessen im Transplantat.

Die Rejektionen wurden entsprechend histopathologischem Befund nach der BANFF-Klassifikation bewertet.

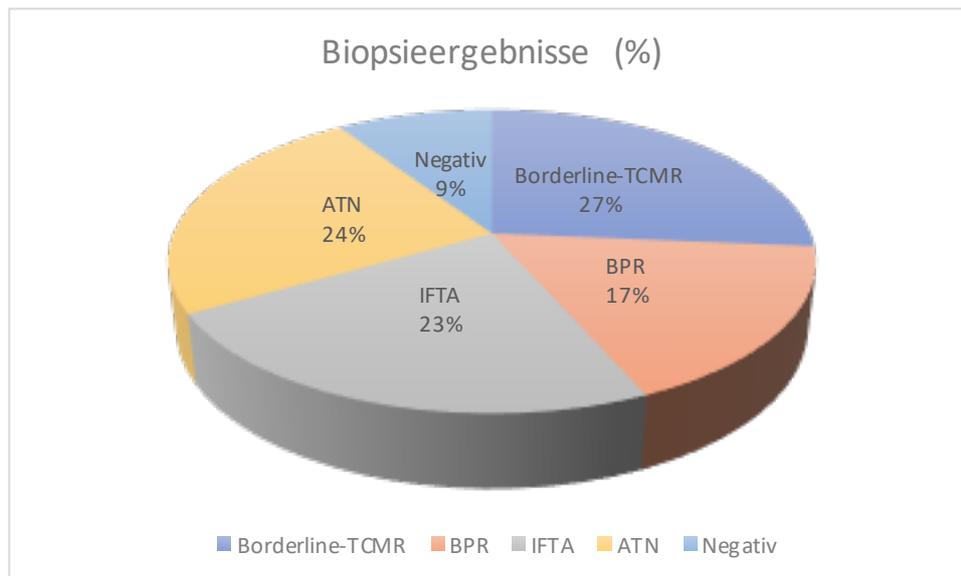


Abbildung 14: Prozentuale Verteilung der Transplantatnierenbiopsien entsprechend histopathologischer Untersuchung in den eindeutig zuordenbaren Gewebeveränderungen (analog (Oellerich et al., 2019))

Aufgrund der verhältnismäßig kleinen Kohorte wurden alle nachgewiesenen Rejektionen gemeinsam als „Biopsy proven Rejection“ (BPR) betrachtet.

Bei insgesamt 30 Biopsien (23,3%) konnte eine interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie (IFTA) nachgewiesen werden. Bei 31 Biopsien (24,0%) eine Akute Tubulusnekrose (ATN).

3.3.3 Plasmaaustausch

Während der Beobachtungsphase wurden bei 8 Patienten Plasmapheresen durchgeführt. Gründe waren eine fulminante Frührejektion (1x), präformierte HLA-Antikörper (nur präoperative Plasmapherese) sowie im Rahmen einer AB0-Desensibilisierung vor Transplantation

3.3.4 Transplantatverlust

Im Beobachtungszeitraum haben 10 von 189 Patienten (5,3%) das Transplantat verloren. Transplantatverlust war definiert als Wiederaufnahme eines alternativen Nierenersatzverfahrens (in der untersuchten Kohorte: ausschließlich Hämodialyse). Ursachen für den Transplantatverlust waren: Chronisch aktive Rejektion (5), fulminante humorale Rejektion (1), fulminanter Transplantatnierenarterieninfarkt (3), akutes protraumiertes Transplantatversagen im Rahmen eines septischen Multiorganversagens (1).

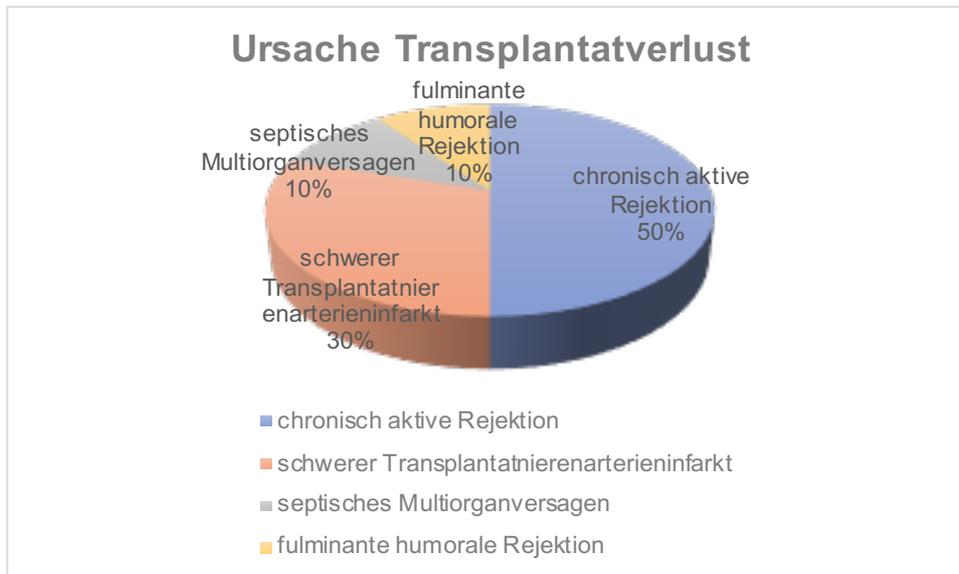


Abbildung 15: Ursachen für Transplantatverlust im Studienkollektiv

3.3.5 Infektiologische Komplikationen

Infektiologische Komplikationen im Allgemeinen traten im Studienverlauf bei 119 von 189 ausgewerteten Patienten auf (63,0%). Es wurden im Beobachtungszeitraum insgesamt 313 infektiologische Ereignisse dokumentiert. Bei insgesamt 1522 Dokumentationspunkten entspricht dies 20,56%. Es wurden verschiedenste bakterielle Infekte wie Pneumonien, Harnwegsinfektionen oder abdominelle Infekte erfasst, wie auch zahlreiche virale Infekte, hierunter insbesondere Polyomavirämien und Cytomegalievirämien.

3.3.5.1 Virusinfektionen

Neben sporadisch auftretenden viralen Infekten, beispielsweise durch Noroviren oder rhinotrope Viren, werden aufgrund der intensiven immunsuppressiven Therapie insbesondere in der Frühphase nach Nierentransplantation regelmäßige Screeninguntersuchungen auf Virämien mit CMV oder BKV durchgeführt. In der hier untersuchten Kohorte fanden sich bei 36 der 189 Patienten (19,0%) mindestens eine Episode einer BKVirämie. Es wurden bei diesen Patienten insgesamt 87 Ereignisse einer BKVirämie erfasst, wobei als Ereignis der Nachweis von Viruslast zum jeweiligen Visitenzeitpunkt gewertet wurde.

Mindestens eine Episode einer Cytomegalievirämie wurde bei 18 der 189 Patienten (9,5%) dokumentiert, es fanden sich kumulativ 26 Ereignisse bei diesen Patienten. Da

das Cytomegalievirus – im Gegensatz zum BK-Virus – in der Regel keine Nephropathie induziert, sondern wie jegliche Infektion ein prärenales Nierenversagen, wurden die CMV-Infektion im Weiteren im Rahmen der Allgemeinen Infektionen weiter ausgewertet und nicht gesondert betrachtet.

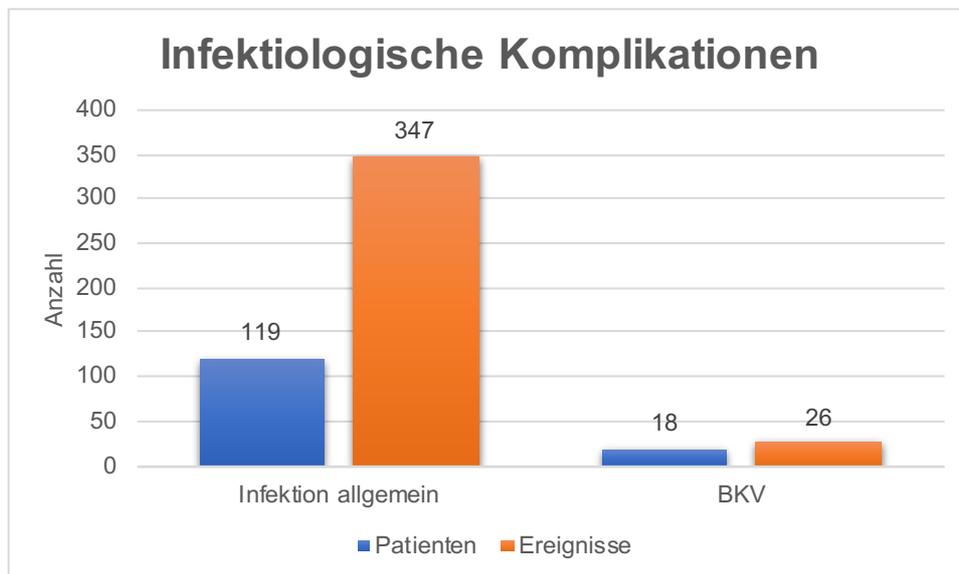


Abbildung 16: Gegenüberstellung allgemeiner infektiologischer Komplikationen und BKVirämien im Beobachtungszeitraum

3.4 Zellfreie donorspezifische DNA (gcfDNA)

Bei allen Patienten war es möglich, die donorspezifische zellfreie DNA in den Laborproben zu messen.

Für die Auswertung der erhobenen Daten wurden die absoluten Messwerte an gcfDNA (copies/mL Plasma = cp/ml) verwendet und entsprechend der vorab definierten Stabilitätskriterien eingeordnet.

3.4.1 Freisetzungskinetik von gcfDNA nach Nierentransplantation (stabile Phase)

Daten aus diesem Abschnitt wurden bereits vorab publiziert ((Oellerich et al., 2019).

Es wurden bei allen Patienten in der stabilen Phase, die während der festgelegten Visiten gemessenen gcfDNA-Werte erhoben. Hier zeigte sich bei allen Patienten eine Zeitabhängigkeit mit in der Frühphase hohen GcfDNA-Werte, die sich im Verlauf auf einen Basiswert einpendelte.

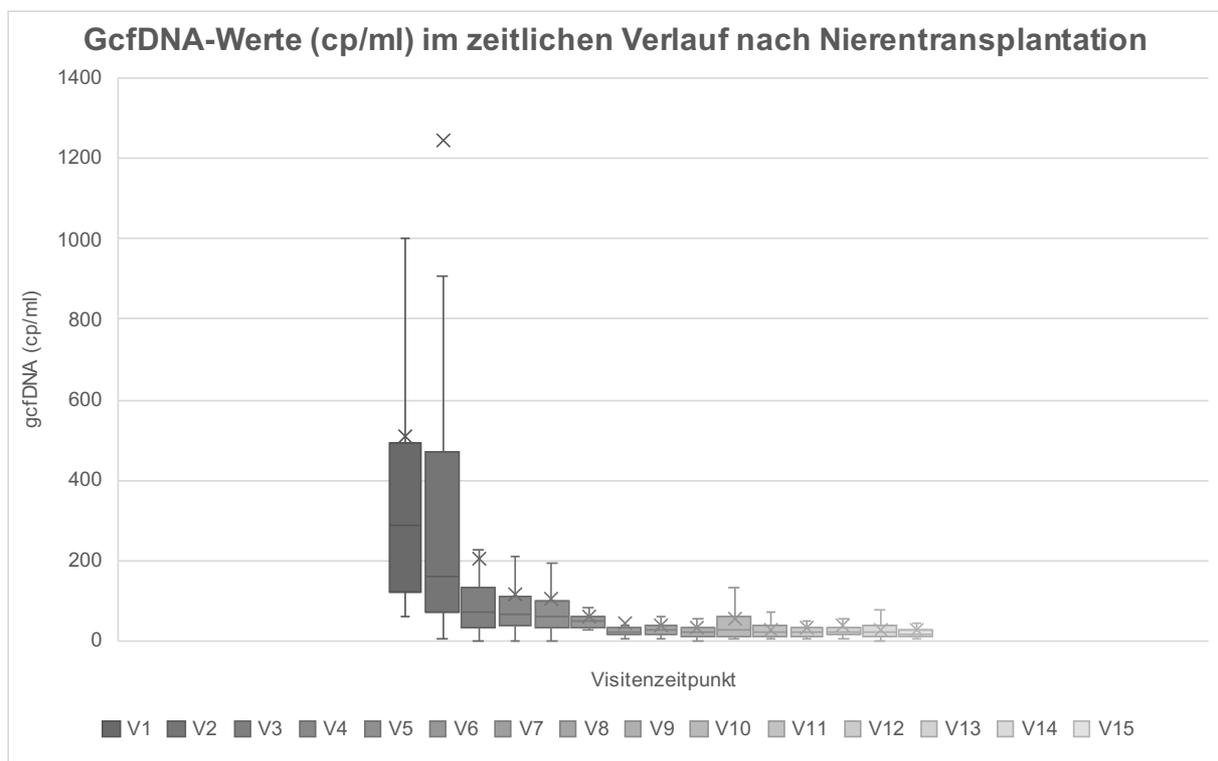


Abbildung 17: Kinetik der gcfDNA über ein Jahr nach Nierentransplantation in der stabilen Phase. GcfDNA wird als absoluter Wert angegeben (cp/ml).

Die Box-Plots zeigen innerhalb der Boxen den Interquartilsrange und den Median an, die Klammern zeigen bei fehlenden Ausreisserwerten den Minimal- bzw. Maximalwert an. Ausreisserwerte wurden definiert als außerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstands. Bei Vorhandensein von Ausreisserwerten zeigen die Klammern den ersten Wert innerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstand an. Zur Optimierung der Darstellung wurden Ausreisserwerte in der Abbildung ausgeblendet. Abbildung analog (Oellerich et al., 2019).

Tabelle 15: Darstellung der gcfDNA im zeitlichen Verlauf nach Nierentransplantation in der stabilen Phase. Angabe der gcfDNA als absolute Werte (cp/ml) sowie für jeden Zeitpunkt (V1-V15) nach Nierentransplantation die Anzahl an vorhandenen Proben im Kollektiv. Dargestellt wird für jeden Zeitpunkt der Minimal- und Maximalwert, die Interquartilwerte sowie der Median. Daten analog (Oellerich et al., 2019).

Zeitpunkt	n	gcfDNA (cp/ml)				
		Min	Q1	Median	Q3	Max
V1	35	62,86	119,95	289,50	490,48	2840,38
V2	52	2,24	72,24	159,82	467,41	46532,15
V3	64	0,87	31,02	72,16	133,57	4685,46
V4	64	1,76	38,71	65,41	108,34	1709,61
V5	57	1,96	33,21	59,69	101,14	1669,84
V6	17	24,43	32,15	47,08	60,98	182,74
V7	28	3,33	16,05	21,75	33,57	238,99
V8	36	5,23	15,78	25,12	40,15	176,78
V9	39	1,82	13,06	22,07	35,00	246,90
V10	27	5,74	11,84	25,77	61,23	268,18
V11	25	4,75	11,53	18,81	36,89	105,45
V12	40	3,83	10,30	22,57	34,91	218,99
V13	36	3,92	16,60	22,08	32,92	270,43
V14	36	0,54	8,91	20,35	36,70	115,72
V15	55	2,97	8,68	15,17	25,45	215,48

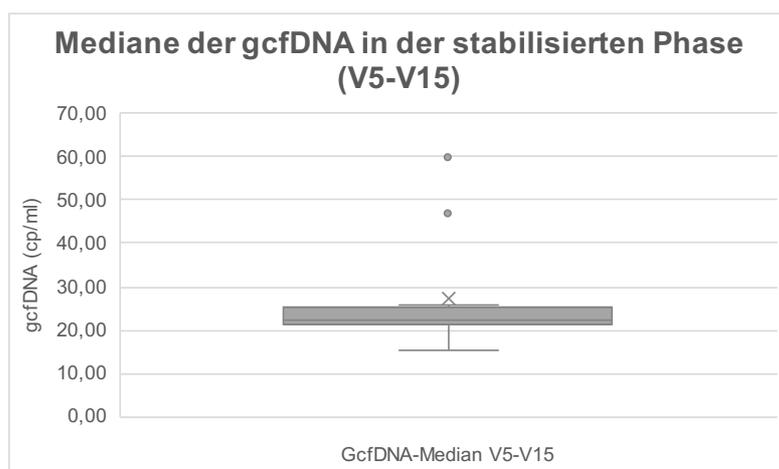


Abbildung 18: Median der gcfDNA nach Erreichen des Steady-State (Zeitraum V5-V15). Angabe der gcfDNA als absolutem Wert (cp/ml). Die Box-Plots zeigen innerhalb der Boxen den Interquartilrange und den Median an, die Klammern zeigen bei fehlenden Ausreisserwerten den Minimal- bzw. Maximalwert an. Ausreisserwerte wurden definiert als außerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstands. Bei Vorhandensein von Ausreisserwerten zeigen die Klammern den ersten Wert innerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstand an. Daten analog (Oellerich et al., 2019).

Tabelle 16: Mediane der gcfDNA nach Erreichen des Steady-State mit Angabe von minimalem und maximalen Wert, Interquartilrange und Median für die Zeitpunkten V5-V15. Angabe der gcfDNA als absolute Werte (cp/ml). Daten analog (Oellerich et al., 2019).

Freisetzung nach Stabilisierung		
GcfDNA (cp/ml)		Median V5 – V15
	Min	15,17
	Q1	21,05
	Median	22,08
	Q3	25,44
	Max	59,69

Bei den über ein Jahr stabilen Patienten zeigt sich nach initial hohen Werten für gcfDNA im Verlauf der ersten 8-12 Tage nach Transplantation die Ausbildung eines Basiswertes der gcfDNA, der im weiteren Verlauf stabil bleibt. Zum Zeitpunkt der Ausbildung des Basiswertes haben alle Patienten in der stabilen Phase eine stabilisierte Transplantatnierenfunktion und somit den initialen Reperfusionsschaden im Transplantat überwunden.

Es gab einige wenige Patienten, die trotz Erfüllung der Kriterien für die stabile Phase hohe GcfDNA-Werte hatten.

3.4.2 Frühe postoperative Phase

Vor Erreichen des stabilen Basiswertes wurden in der Kohorte unmittelbar nach Transplantation hohe GcfDNA-Werte gemessen, die bis zum Erreichen der stabilen Phase allmählich abklingen und am ehesten dem Ischämie- und Reperfusionsschaden im Rahmen der Transplantation entsprechen.

3.4.2.1 Form der Organspende

Es wurde analysiert, ob in der absoluten Frühphase nach Transplantation (Zeitpunkt der Transplantation bis Tag 5 nach Transplantation) Unterschiede in der Freisetzung von GcfDNA in Abhängigkeit von der Form der Nierenspende erhoben werden können. Hierfür wurde die Freisetzung von GcfDNA bei Lebendnierentransplantierten mit den Werten bei Patienten, die ihr Organ im Rahmen einer postmortalen Organspende erhielten, verglichen.

3.4.2.1.1 Lebendspende

Bei den 71 Patienten, die das Nierentransplantat im Rahmen einer Lebendspende erhielten, wurde während der ersten 3 Beobachtungszeitpunkte (bis Tag 5 nach Op) ein medianer Wert von 134,74cp/ml GcfDNA gemessen (minimal 0,87cp/ml, maximal 46532,15cp/ml, Interquartilrange 66,24cp/ml - 385,23cp/ml). Wie auch in der Gesamtkohorte wurden mit größerem Abstand zur Transplantation geringere Werte gemessen.

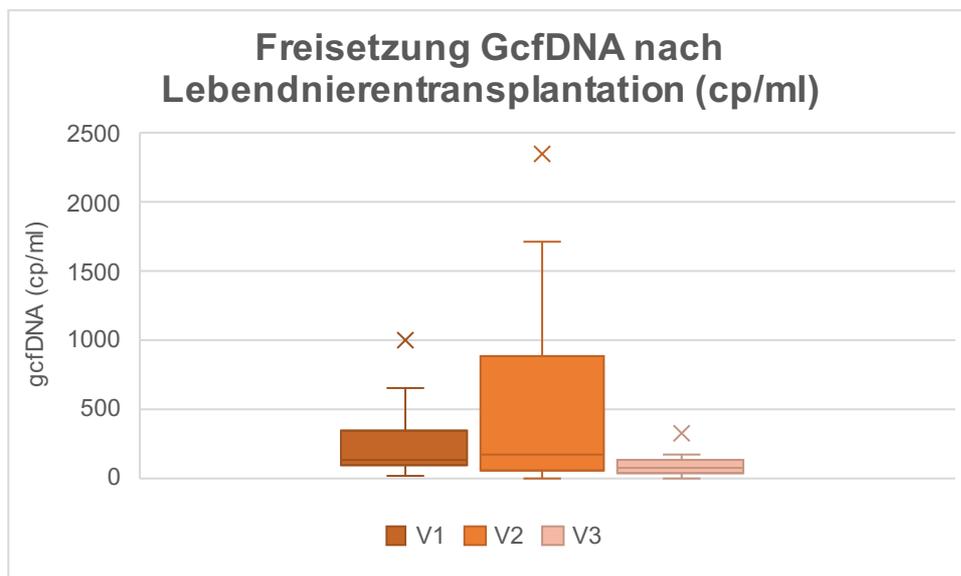


Abbildung 19: GcfDNA als absoluter Wert bei Lebendnierentransplantationen. Die Darstellung erfolgt aufgeschlüsselt für die definierten Visitenzeitpunkte V1 - V3 bis maximal 5. postoperativen Tag. Die Box-Plots zeigen innerhalb der Boxen den Interquartilrange und den Median an, die Klammern zeigen bei fehlenden Ausreisserwerten den Minimal- bzw. Maximalwert an. Ausreisserwerte wurden definiert als außerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstands. Bei Vorhandensein von Ausreisserwerten zeigen die Klammern den ersten Wert innerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstand an. Zur Optimierung der Darstellung wurden Ausreisserwerte in der Abbildung ausgeblendet.

Tabelle 17: GcfDNA als absoluter Wert (cp/ml) bei Lebendnierentransplantationen. Darstellung von Minimal- und Maximalwerten, Interquartilwerten und den Medianen zu den Visitenzeiträumen V1 – V3 bis maximal 5. postoperativen Tag.

Lebendspende				
		V1	V2	V3
GcfDNA (cp/ml)	Min	22,78	2,24	0,87
	Q1	91,29	63,13	37,52
	Median	145,44	183,42	80,60
	Q3	355,74	889,79	136,30
	Max	22732,03	46532,15	4685,46

3.4.2.1.2 Organspende von Verstorbenen

Bei den 118 Patienten, die das Organ im Rahmen einer postmortalen Organspende erhielten, wurde während der ersten 3 Beobachtungszeitpunkte (bis Tag 5 nach Op) ein medianer Wert von 215,98cp/ml gcfDNA gemessen (minimal 7,54cp/ml, maximal 21910,59cp/ml, Interquartilrange 83,34cp/ml - 570,72cp/ml). Auch hier fanden sich niedrigere Werte bei größerem Zeitabstand zum Transplantationszeitpunkt.

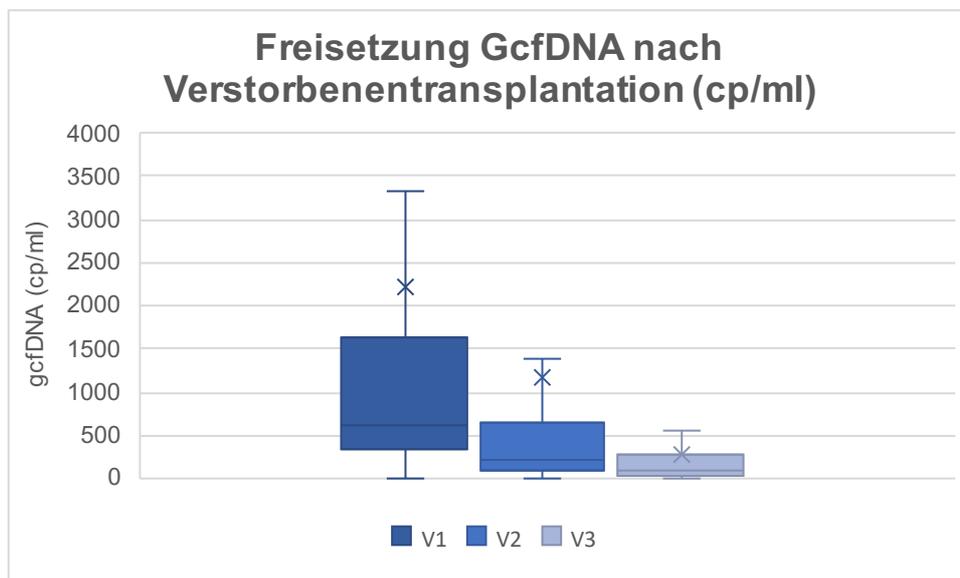


Abbildung 20: GcfDNA als absoluter Wert bei Verstorbenen transplantationen. Die Darstellung erfolgt aufgeschlüsselt für die definierten Visitenzeitpunkte V1 - V3 bis maximal 5. postoperativen Tag. Die Box-Plots zeigen innerhalb der Boxen den Interquartilrange und den Median an, die Klammern zeigen bei fehlenden Ausreisserwerten den Minimal- bzw. Maximalwert an. Ausreisserwerte wurden definiert als außerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstands. Bei Vorhandensein von Ausreisserwerten zeigen die Klammern den ersten Wert innerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstand an. Zur Optimierung der Darstellung wurden Ausreisserwerte in der Abbildung ausgeblendet.

Tabelle 18: GcfDNA als absoluter Wert (cp/ml) bei Verstorbenen transplantationen. Darstellung von Minimal- und Maximalwerten, Interquartilwerten und den Medianen zu den Visitenzeiträumen V1 – V3 bis maximal 5. postoperativen Tag

Verstorbenenenspende				
		V1	V2	V3
GcfDNA (cp/ml)	Min	7,54	14,31	10,33
	Q1	327,28	92,78	43,14
	Median	627,12	227,42	101,92
	Q3	1631,58	640,68	291,18
	Max	21910,59	16324,48	2439,43

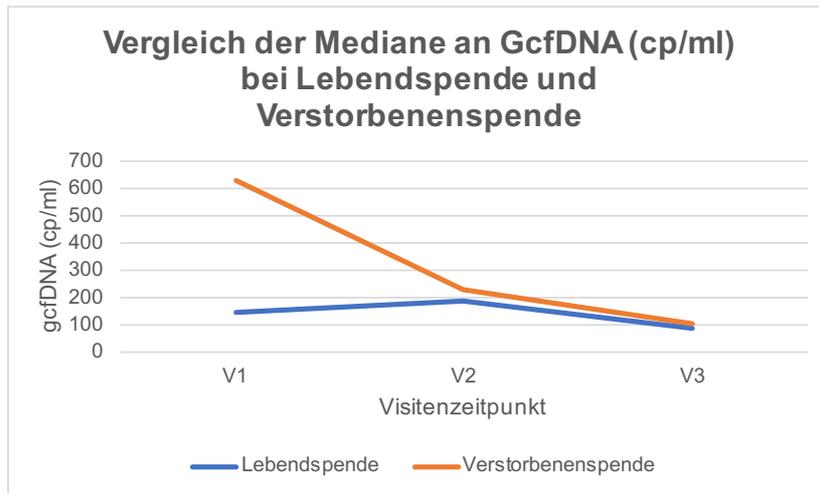


Abbildung 21: Vergleich der Mediane an gcfDNA bei Lebendspende und Verstorbenspende. Angabe der gcfDNA als absolute Werte (cp/ml). Darstellung der jeweiligen Werte zu den Zeitpunkten V1, V2, V3 bis einschließlich 5. Postoperativem Tag.

Im Vergleich beider Patientengruppen zeigt sich eine höhere Freisetzung von GcfDNA in der Gruppe der Patienten, die ein Organ von einem Verstorbenen erhielten. Dieser Unterschied war bei Betrachtung des Gesamtzeitraums zwischen Transplantation und 5. postoperativem Tag statistisch signifikant ($p=0,03131$ im Wilcoxon-Rangsummen-Test).

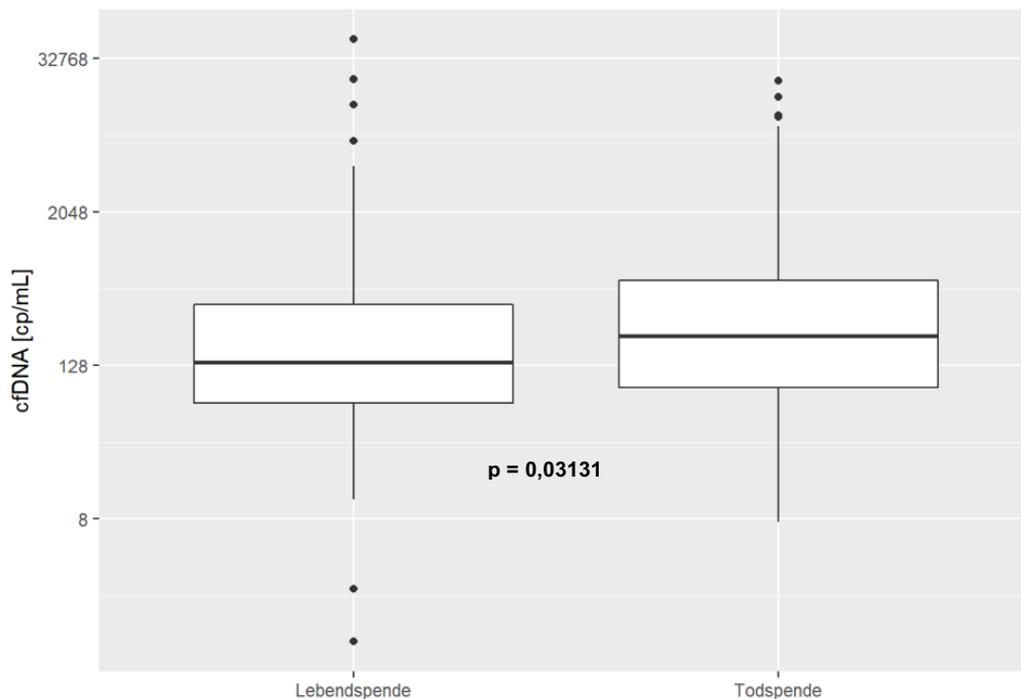


Abbildung 22: Vergleich der Freisetzung von gcfDNA als absolutem Wert (cp/ml) bei Patienten nach Lebendnierentransplantation und Verstorbennierentransplantation bei Betrachtung der absoluten Frühphase nach Transplantation (bis einschließlich Tag 5 postoperativ). Die Box-Plots zeigen innerhalb der Boxen den Interquartilrange und den Median an, die Klammern zeigen 2,5%- und 97,5% Quantile. Es zeigen sich signifikant niedrigere gcfDNA-Werte bei Lebendspenden ($p = 0,03131$ im Wilcoxon-Rangsummen-Test).

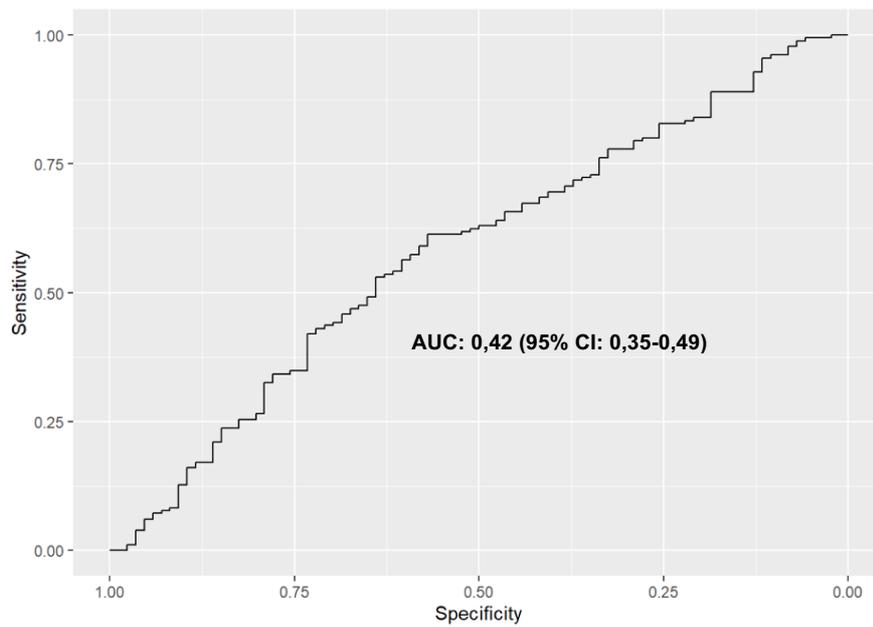


Abbildung 23: ROC-Kurve für den Vergleich der Freisetzung von gcfDNA als absoluten Wert (cp/ml) bei Patienten nach Lebendnierentransplantation und Verstorbenenierentransplantation bei Betrachtung der absoluten Frühphase nach Transplantation (bis einschließlich Tag 5 postoperativ). Mit einer AUC von 0,42 sind Sensitivität und Spezifität für das Ereignis niedrig.

3.4.2.1.3 Lebendspende und Blutgruppengleichheit

Innerhalb der 71 Transplantationen durch Lebendspende wurden 47 (66,20%) Blutgruppengleich (AB0-kompatibel) und 24 Patienten (33,80%) Blutgruppenungleich (AB0-inkompatibel) transplantiert.

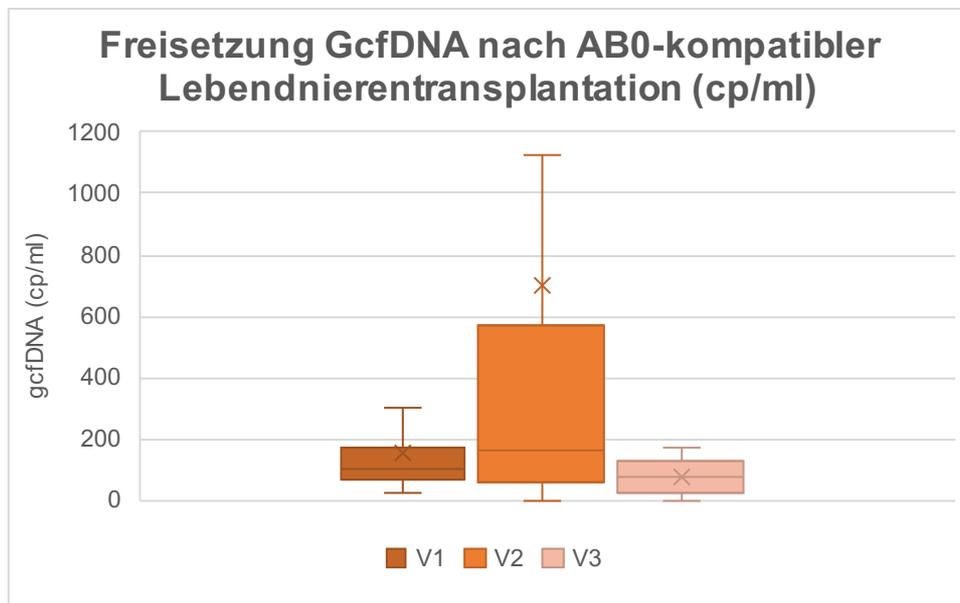


Abbildung 24: GcfDNA als absoluter Wert bei AB0-kompatiblen Lebendnierentransplantationen. Die Darstellung erfolgt aufgeschlüsselt für die definierten Visitenzeitpunkte V1 - V3 bis maximal 5. postoperativen Tag. Die Box-Plots zeigen innerhalb der Boxen den Interquartilrange und den Median an, die Klammern zeigen bei fehlenden Ausreisserwerten den Minimal- bzw. Maximalwert an. Ausreisserwerte wurden definiert als außerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstands. Bei Vorhandensein von Ausreisserwerten zeigen die Klammern den ersten Wert innerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstand an. Zur Optimierung der Darstellung wurden Ausreisserwerte in der Abbildung ausgeblendet.

Tabelle 19: GcfDNA als absoluter Wert (cp/ml) bei AB0-kompatibler Lebendtransplantationen. Darstellung von Minimal- und Maximalwerten, Interquartilwerten und den Medianen zu den Visitenzeiträumen V1 – V3 bis maximal 5.postoperativen Tag

AB0-Kompatible Lebendnierentransplantation				
		V1	V2	V3
GcfDNA (cp/ml)	Min	22,78	2,24	0,87
	Q1	73,77	63,89	23,11
	Median	103,31	164,03	80,60
	Q3	176,24	566,88	134,43
	Max	467,11	7430,74	170,01

Bei den 47 Patienten, die das Organ im Rahmen einer Blutgruppengleichen Lebendnierentransplantation erhielten, wurde während der ersten 3 Beobachtungszeitpunkte (bis Tag 5 nach Op) ein medianer Wert von 111,02cp/ml GcfDNA gemessen (minimal 0,87cp/ml, Interquartilrange 64,00cp/ml – 286,07cp/ml, maximal 7430,74cp/ml), während bei den 24 Patienten, die AB0-inkompatibel transplantiert wurden im gleichen Zeitraum ein medianer Wert von 178,12cp/ml GcfDNA gemessen wurde (minimal 13,80cp/ml, Interquartilrange 69,30cp/ml – 633,20cp/ml, maximal 46532,15cp/ml).

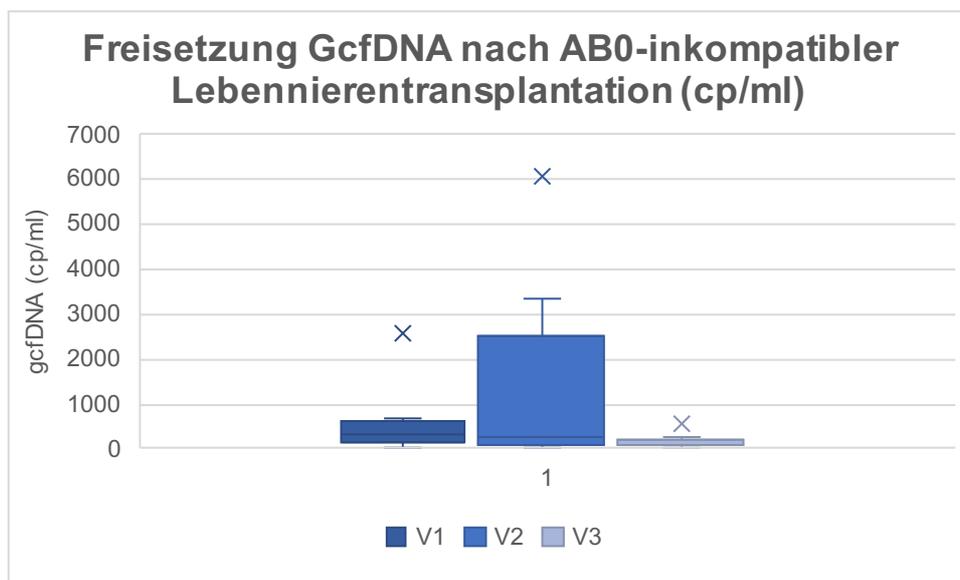


Abbildung 25: GcfDNA als absoluter Wert bei AB0-inkompatiblen Lebennierentransplantationen. Die Darstellung erfolgt aufgeschlüsselt für die definierten Visitenzeitpunkte V1 - V3 bis maximal 5. postoperativen Tag. Die Box-Plots zeigen innerhalb der Boxen den Interquartilrange und den Median an, die Klammern zeigen bei fehlenden Ausreisserwerten den Minimal- bzw. Maximalwert an. Ausreisserwerte wurden definiert als außerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstands. Bei Vorhandensein von Ausreisserwerten zeigen die Klammern den ersten Wert innerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstand an. Zur Optimierung der Darstellung wurden Ausreisserwerte in der Abbildung ausgeblendet.

Tabelle 20: GcfDNA als absoluter Wert (cp/ml) bei AB0-kompatibler Lebendtransplantationen. Darstellung von Minimal- und Maximalwerten, Interquartilwerten und den Medianen zu den Visitenzeiträumen V1 – V3 bis maximal 5.postoperativen Tag

AB0-inkompatible Lebendnierentransplantation				
		V1	V2	V3
GcfDNA (cp/ml)	Min	51,88	13,80	29,73
	Q1	159,64	97,96	64,05
	Median	327,13	233,74	85,67
	Q3	616,49	2519,60	183,30
	Max	22732,03	46532,15	4685,46

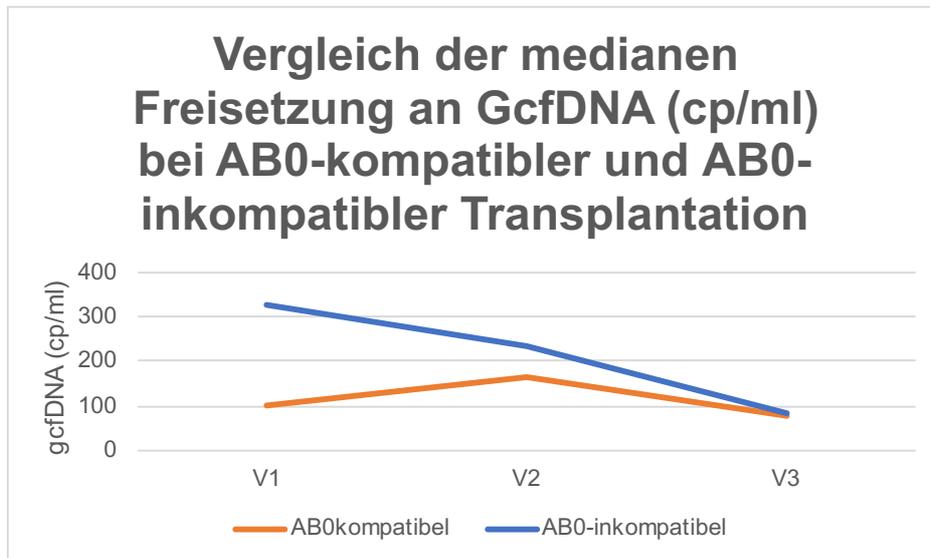


Abbildung 26: Vergleich der Mediane an gcfDNA bei AB0kompatibler und AB0inkompatibler Lebendspende. Angabe der gcfDNA als absolute Werte (cp/ml). Darstellung der jeweiligen Werte zu den Zeitpunkten V1, V2, V3 bis einschließlich 5. postoperativem Tag.

Im Vergleich beider Patientengruppen zeigt sich eine höhere Freisetzung von gcfDNA in der Gruppe der Patienten, die Blutgruppenungleich transplantiert wurden. Dieser Unterschied war bei Betrachtung des Gesamtzeitraums zwischen Transplantation und 5. postoperativem Tag statistisch jedoch nicht signifikant ($p=0,1537$ im Wilcoxon-Rangsummen-Test).

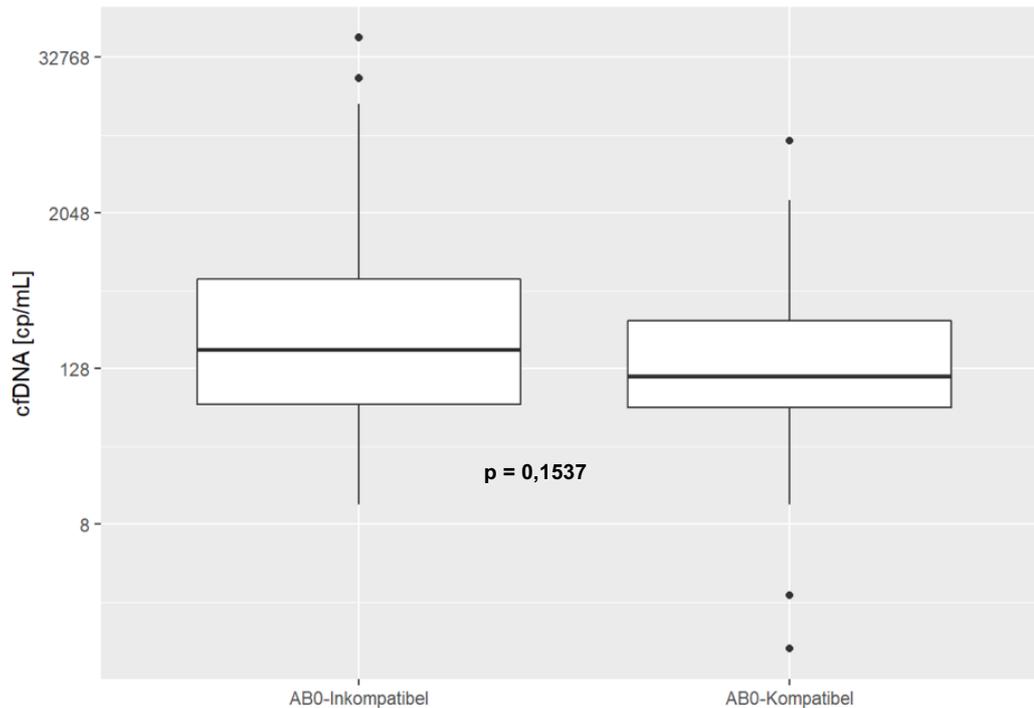


Abbildung 27: Vergleich der Freisetzung von GcfDNA als absolutem Wert (cp/ml) bei Patienten nach Lebendnierentransplantation bezüglich blutgruppengleicher (AB0-kompatibler) und blutgruppenungleicher (AB0-inkompatibler) Organspende. Betrachtung der absoluten Frühphase nach Transplantation (bis einschließlich Tag 5 postoperativ).

Die Box-Plots zeigen innerhalb der Boxen den Interquartilrange und den Median an, die Klammern zeigen 2,5%- und 97,5% Quantile

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,1537$ im Wilcoxon-Rangsummen-Test).

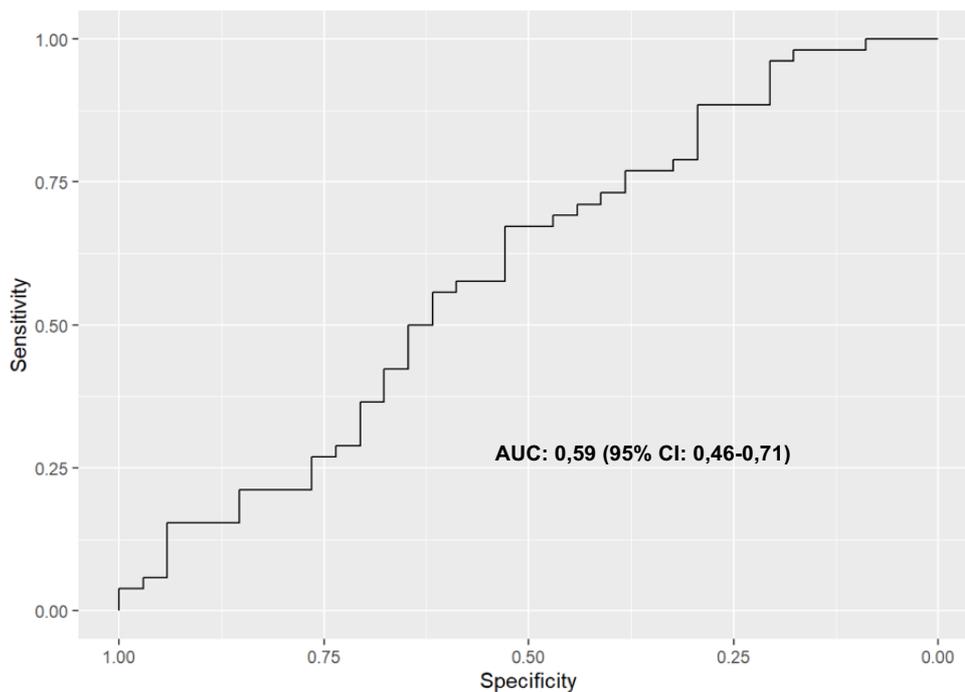


Abbildung 28: ROC-Kurve für den Vergleich der Freisetzung von GcfDNA als absolutem Wert (cp/ml) bei Patienten nach Lebendnierentransplantation bezüglich blutgruppengleicher (AB0-kompatibler) und blutgruppenungleicher (AB0-inkompatibler) Organspende. Betrachtung der absoluten Frühphase nach Transplantation (bis einschließlich Tag 5 postoperativ).

3.4.2.2 Immunologisches Risiko

Entsprechend des definierten Kriterienkatalogs für ein immunologisches Hochrisikoprofil wurden die Patienten im Studienkollektiv unterteilt.

Alle Patienten, die kein Kriterium für ein immunologisches Hochrisikoprofil erfüllten, wurden dem immunologischen Normalrisiko zugeordnet.

In der Immunologischen Hochrisikogruppe befanden sich 127 Patienten (67,20%), in der Niedrigrisikogruppe 62 Patienten (32,80%).

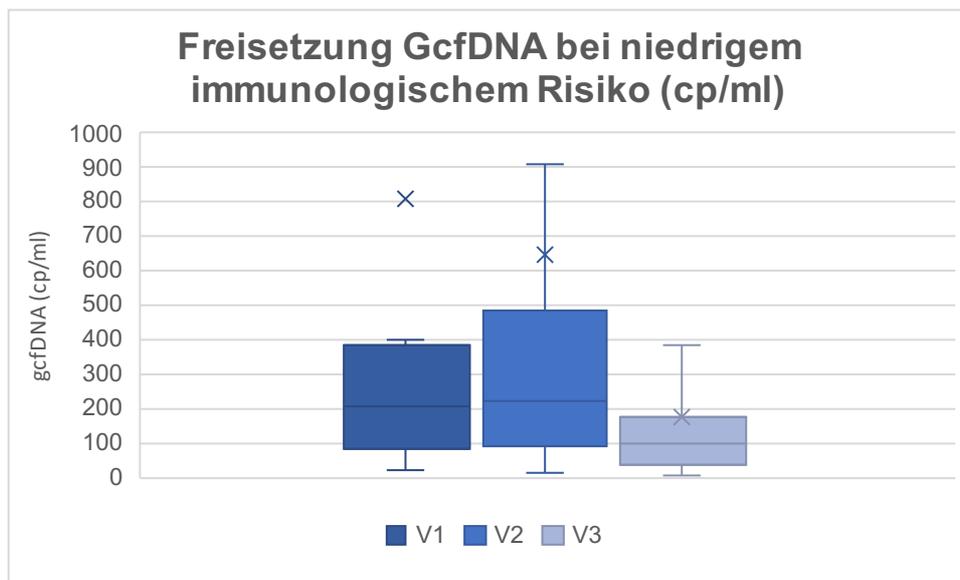


Abbildung 29: gcfDNA im Kollektiv mit niedrigem immunologischem Risiko. Ausgabe der gcfDNA als absolute Werte (cp/ml), aufgeschlüsselt auf die definierten Visitenzeitpunkte V1-V3 (bis einschließlich Tag 5 postoperativ). Die Box-Plots zeigen innerhalb der Boxen den Interquartilrange und den Median an, die Klammern zeigen bei fehlenden Ausreisserwerten den Minimal- bzw. Maximalwert an. Ausreisserwerte wurden definiert als außerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstands. Bei Vorhandensein von Ausreisserwerten zeigen die Klammern den ersten Wert innerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstand an. Zur Optimierung der Darstellung wurden Ausreisserwerte in der Abbildung ausgeblendet.

Tabelle 21: gcfDNA bei niedrigem immunologischem Risiko. Darstellung der Visitenzeitpunkte V1 - V3 (bis maximal 5. postoperativer Tag), Minimal- und Maximalwerte sowie Median und Interquartilwerte.

Niedriges immunologisches Risiko				
GcfDNA (cp/ml)		V1	V2	V3
	Min	22,78	14,31	11,34
	Q1	87,39	92,90	41,31
	Median	206,06	226,35	98,26
	Q3	387,73	486,44	179,43
	Max	8555,71	7430,74	966,31

Bei den Patienten mit niedrigem immunologischem Risiko wurde während der ersten 3 Beobachtungszeitpunkte (bis Tag 5 nach OP) im Median ein Wert von 156,59cp/ml GcfDNA gemessen (minimal 11,34cp/ml, Interquartilrange 64,98cp/ml – 389,32cp/ml, maximal 8555,71cp/ml), während bei den Patienten, die nach o.g. Definition der Gruppe mit hohem immunologischem Risiko zugeordnet wurden im gleichen Zeitraum ein medianer Wert von 173,83cp/ml GcfDNA gemessen wurde (minimal 0,87cp/ml, Interquartilrange 74,41cp/ml – 557,45cp/ml, maximal 46532,15cp/ml).

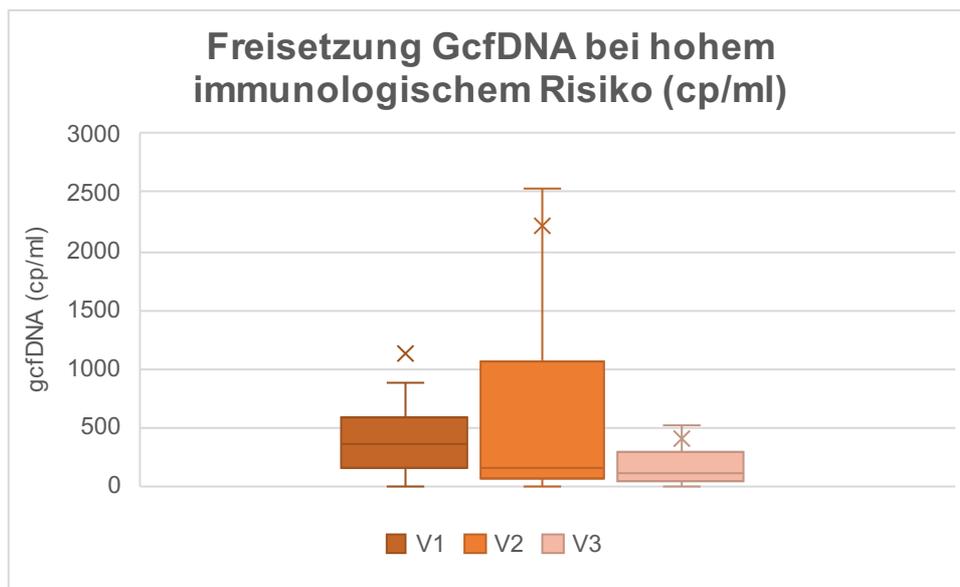


Abbildung 30: gcfDNA im Kollektiv mit hohem immunologischem Risiko.

Ausgabe der gcfDNA als absolute Werte (cp/ml), aufgeschlüsselt auf die definierten Visitenzeitpunkte V1-V3 (bis einschließlich Tag 5 postoperativ).

Die Box-Plots zeigen innerhalb der Boxen den Interquartilrange und den Median an, die Klammern zeigen bei fehlenden Ausreisserwerten den Minimal- bzw. Maximalwert an. Ausreisserwerte wurden definiert als außerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstands. Bei Vorhandensein von Ausreisserwerten zeigen die Klammern den ersten Wert innerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstand an. Zur Optimierung der Darstellung wurden Ausreisserwerte in der Abbildung ausgeblendet.

Tabelle 22: gcfDNA bei niedrigem immunologischem Risiko. Darstellung der Visitenzeitpunkte V1 - V3 (bis maximal 5. postoperativer Tag), Minimal- und Maximalwerte sowie Median und Interquartilwerte

Hohes immunologisches Risiko				
GcfDNA (cp/ml)		V1	V2	V3
	Min	7,54	2,24	0,87
	Q1	171,97	80,81	47,43
	Median	507,39	218,70	104,72
	Q3	832,42	1305,91	284,75
	Max	22732,03	46532,15	4685,46

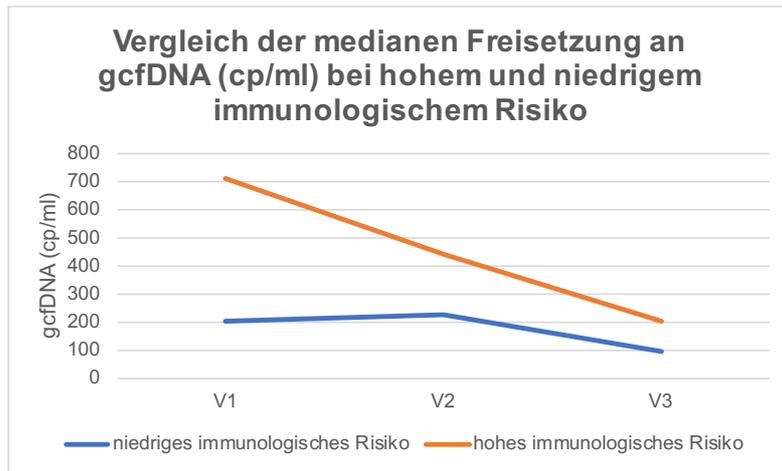


Abbildung 31: Vergleich der Mediane an gcfDNA bei hohem und niedrigem immunologischem Risiko. Angabe der gcfDNA als absolute Werte (cp/ml). Darstellung der jeweiligen Werte zu den Zeitpunkten V1, V2, V3 bis einschließlich 5. postoperativem Tag.

Im Vergleich des immunologischen Risikos in der Kohorte zeigt sich eine stärkere Freisetzung von gcfDNA in der Gruppe mit hohem immunologischem Risiko. Dieser Unterschied war bei Betrachtung des Gesamtzeitraums zwischen Transplantation und 5. postoperativem Tag statistisch nicht signifikant ($p=0,24$ im Wilcoxon-Rangsummen-Test).

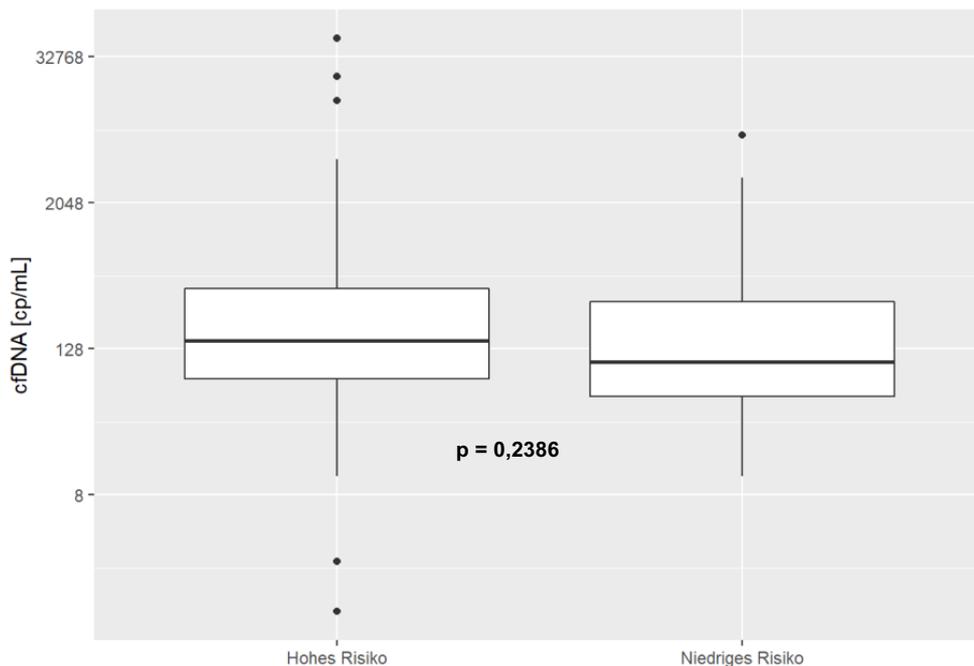


Abbildung 32: Vergleich der Freisetzung von gcfDNA als absolutem Wert (cp/ml) bei Patienten mit hohem und niedrigem immunologischem Risiko. Betrachtung der absoluten Frühphase nach Transplantation (bis einschließlich Tag 5 postoperativ).

Die Box-Plots zeigen innerhalb der Boxen den Interquartilrange und den Median an, die Klammern zeigen 2,5%- und 97,5% Quantile
Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,2386$ im Wilcoxon-Rangsummen-Test).

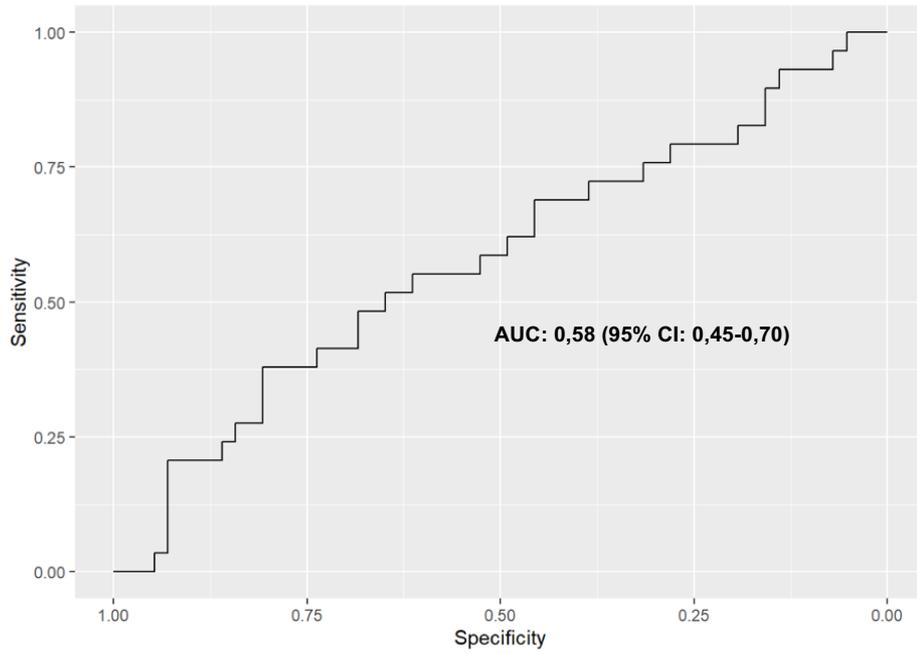


Abbildung 33: ROC-Kurve für den Vergleich der Freisetzung von gcfDNA als absolutem Wert (cp/ml) bei Patienten hohem und niedrigem immunologischem Risiko. Betrachtung der absoluten Frühphase nach Transplantation (bis einschließlich Tag 5 postoperativ).

3.4.3 Einfluss von Akutereignissen nach Stabilisierung der Transplantatnierenfunktion

Zur Evaluation von Ereignissen, die entsprechend bekanntem pathophysiologischem Mechanismus einen Gewebeschaden im Transplantat verursachen können, wurden verschiedene Ereignisse im Vergleich zur stabilen Phase (Wochenstabilität wie oben definiert) hinsichtlich von

Unterschieden in der Freisetzung von gcfDNA betrachtet.

Um die Bias durch den unmittelbar nach Transplantation auftretenden Reperfusion-Ischämie-Schaden zu vermeiden wurde folgend der Zeitraum ab dem 5. postoperativen Tag bis Monat 12 (+/-1Monat) nach Transplantation betrachtet.

3.4.3.1 Akute Verschlechterung der Transplantatnierenfunktion

Eine akute Verschlechterung der Transplantatnierenfunktion wurde definiert als Anstieg des Serumkreatinins um $> 0,3\text{mg/dl}$ seit dem letzten Visitenzeitraum und oder Auftreten einer signifikanten Zunahme der Proteinurie, was als mindestens die Verdopplung der Proteinurie seit der letzten Visite definiert wurde.

Im Beobachtungszeitraum ab dem 5. Tag nach Transplantation bis 12 Monaten nach Transplantation trat bei 153 Patienten (80,96%) mindestens zu einem Beobachtungszeitpunkt eine akute Verschlechterung der Transplantatnierenfunktion auf. Innerhalb aller ausgewerteten Stichproben traten insgesamt 379 Ereignisse auf (bei 1545 dokumentierten Beobachtungszeitpunkten entspricht dies 24,58% aller Beobachtungstichproben).

In der stabilen Phase zeigte sich während des oben genannten Zeitraums eine mediane Freisetzung von gcfDNA von $24,52\text{cp/ml}$ (minimal $0,11\text{cp/ml}$, Interquartilrange $10,91\text{cp/ml} - 59,46\text{cp/ml}$, maximal $386,46\text{cp/ml}$), während bei Visiten mit akuter Verschlechterung der Transplantatnierenfunktion höhere Werte an GcfDNA gefunden wurden (minimal $0,44\text{cp/ml}$, Median $29,99\text{cp/ml}$, Interquartilrange $16,27\text{cp/ml} - 67,59\text{cp/ml}$, maximal $2439,43\text{cp/ml}$). Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p=6,095e^{-05}$ im Wilcoxon-Rangsummen-Test).

Tabelle 23: gcfDNA in der stabilen Phase und bei akuter Verschlechterung der Transplantatnierenfunktion. Ausgabe der gcfDNA als absolute Werte (cp/ml), Angabe von Minimal- und Maximalwerten, Medianen sowie Interquartilwerten.

		Stabile Phase	Akute Funktionsverschlechterung
GcfDNA (cp/ml)	Min	0,11	0,44
	Q1	10,91	16,27
	Median	24,88	29,99
	Q3	59,46	67,59
	Max	386,46	2439,43

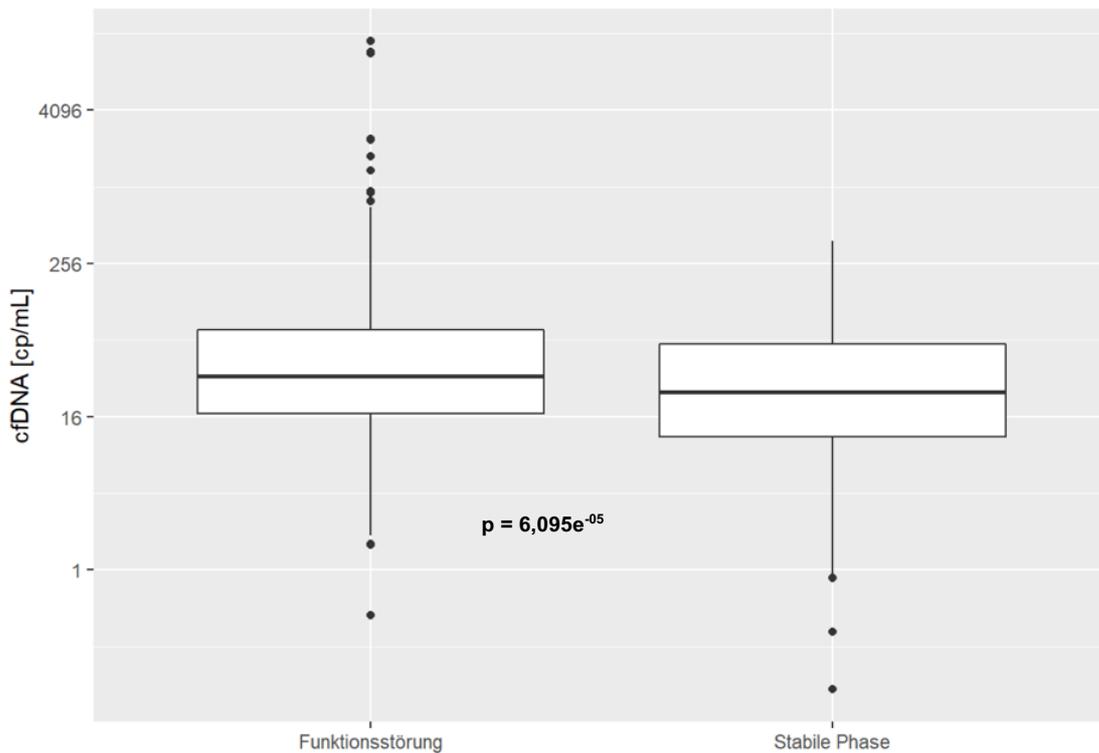


Abbildung 34: Vergleich der Freisetzung von gcfDNA bei akuter Verschlechterung der Transplantatnierenfunktion und in der stabilen Phase. Angabe der gcfDNA als absoluten Wert (cp/ml). Betrachtung des Zeitraums von 5 Tagen bis 12 Monate (+/- 1 Monat) entsprechen V4 – V15 nach Transplantation.

Die Box-Plots zeigen innerhalb der Boxen den Interquartilrange und den Median an, die Klammern zeigen 2,5%- und 97,5% Quantile

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p = 6,095e^{-05}$ im Wilcoxon-Rangsummen-Test).

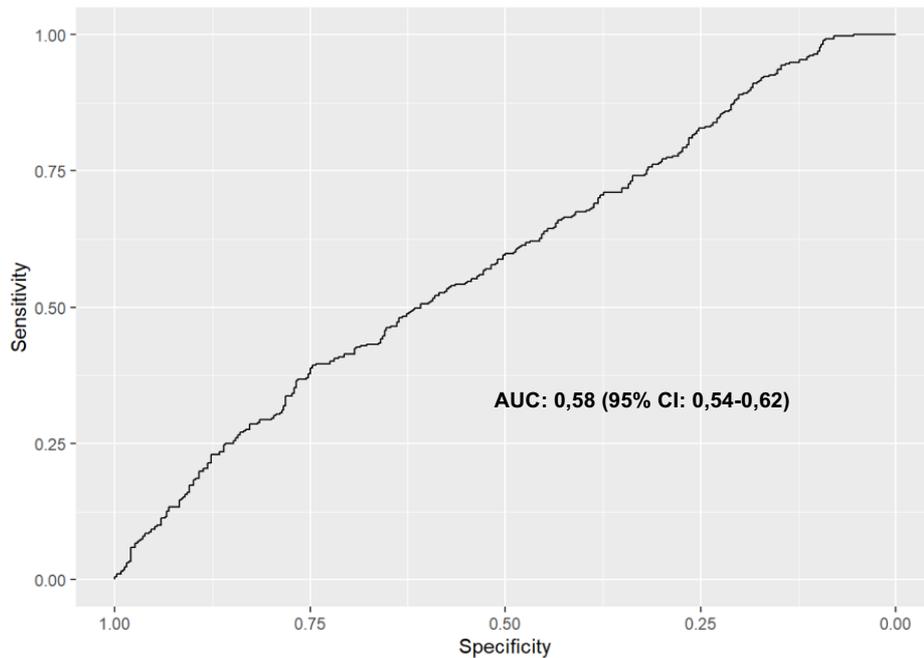


Abbildung 35: ROC-Kurve für den Vergleich der Freisetzung von gcfDNA als absolutem Wert (cp/ml) bei akuter Verschlechterung der Transplantatnierenfunktion und in der stabilen Phase für den Zeitraum ab 5 Tage nach Transplantation bis 12 Monate (+/- 1 Monat) nach Transplantation (entsprechend V4 – V15)

3.4.3.2 Verhalten von GcfDNA entsprechend histopathologischen Merkmalen bei Transplantatnierenbiopsien

Daten aus diesem Abschnitt wurden bereits vorab publiziert ((Oellerich et al., 2019).

Zur weiteren Abklärung einer akuten Verschlechterung der Transplantatnierenfunktion wird bei fehlender eindeutiger Ursache oder fehlender Reversibilität die Indikation zur Durchführung einer Transplantatnierenbiopsie gestellt.

Im Beobachtungszeitraum wurden in der Kohorte 375 Transplantatnierenbiopsien bei 111 Patienten durchgeführt.

Von diesen Biopsien ließen sich insgesamt 129 (42,4%) entsprechend klinisch-pathologischen Kriterien kategorisieren. Alle anderen Biopsieergebnisse waren unspezifisch und wurden somit in der Statistik zur Betrachtung des Verhaltens von gcfDNA nicht verwendet.

Zur Evaluation der klinischen Bedeutung der gcfDNA-Werte in der jeweiligen Biopsiekategorie wurde als Referenz die stabile Phase verwendet.

Bei 12 Biopsien (7 unterschiedliche Patienten) entsprechend 9,30% aller kategorisierten Biopsien war der histopathologische Befund unauffällig. Die hier erhobenen GcfDNA-Werte wurden als **„Biopsie negativ“** eingeteilt. Hier zeigte sich

im Median eine GcfDNA von 26,22cp/ml (minimal 2,49cp/ml, Interquartilrange 13,77cp/ml – 39,64cp/ml, maximal 98,61cp/ml).

38 Biopsien (29,46% aller kategorisierten Biopsien) bei 25 verschiedenen Patienten wurden im Sinne einer T-Zell-vermittelten Borderline-Rejektion befundet und als **„Borderline-TCMR“** eingestuft. Hier ergab sich im Median eine GcfDNA von 63,52cp/ml (minimal 11,32cp/ml, Interquartilrange 37,19cp/ml – 111,97cp/ml, maximal 664,20cp/ml).

Unter der Kategorie **„Biopsie Proven Rejection“ (BPR)** wurden 22 Proben (15 Patienten) eingeordnet (17,05%). Hierunter wurden akute T-Zell-vermittelte Rejektionen (bei 4 Patienten), akute Antikörper-vermittelte Rejektionen (bei 6 Patienten), gemischte akute T-Zell-vermittelte und akute Antikörper-vermittelte Rejektion (4 Patienten) und die chronische Antikörper-vermittelte Rejektion (1 Patient) zusammengefasst.

Biopsien, die entsprechend BANFF-Klassifikation die Kriterien der Interstitiellen Fibrose und Tubulusatrophie (mind. 25% der Gewebeprobe) und keine Rejektionszeichen zeigten wurden als **„IF/TA“** gruppiert. Dies waren 30 Proben (24 Patienten), entsprechend 23,26% aller kategorisierten Biopsien.

Tabelle 24: gcfDNA in der stabilen Phase und bei Transplantatnierenbiopsien. Ausgabe als absoluter Wert (cp/ml) und Sortierung entsprechend Biopsieergebnis. Verwendet wurden nur eindeutig kategorisierbare Biopsien mit simultan erfasstem gcfDNA-Wert. Darstellung von Minimal- und Maximalwert, Medianen und Interquartilwerten. Ausschließlich Verwendung des Beobachtungszeitraums ab dem 5. Postoperativen Tag bis 12 Monate nach Transplantation (V4 – V15). Daten analog (Oellerich et al., 2019).

		Stabile Phase	Biopsie neg.	Borderline-TCMR	BPR	IF/TA	ATN
GcfDNA (cp/ml)	Min	0,11	2,49	11,32	24,50	5,23	10,33
	Q1	10,91	13,77	37,19	47,27	24,58	43,00
	Median	24,88	26,22	63,52	82,37	75,46	64,67
	Q3	59,46	39,64	111,97	141,02	250,90	133,44
	Max	386,46	98,61	664,20	1767,19	2439,43	583,19

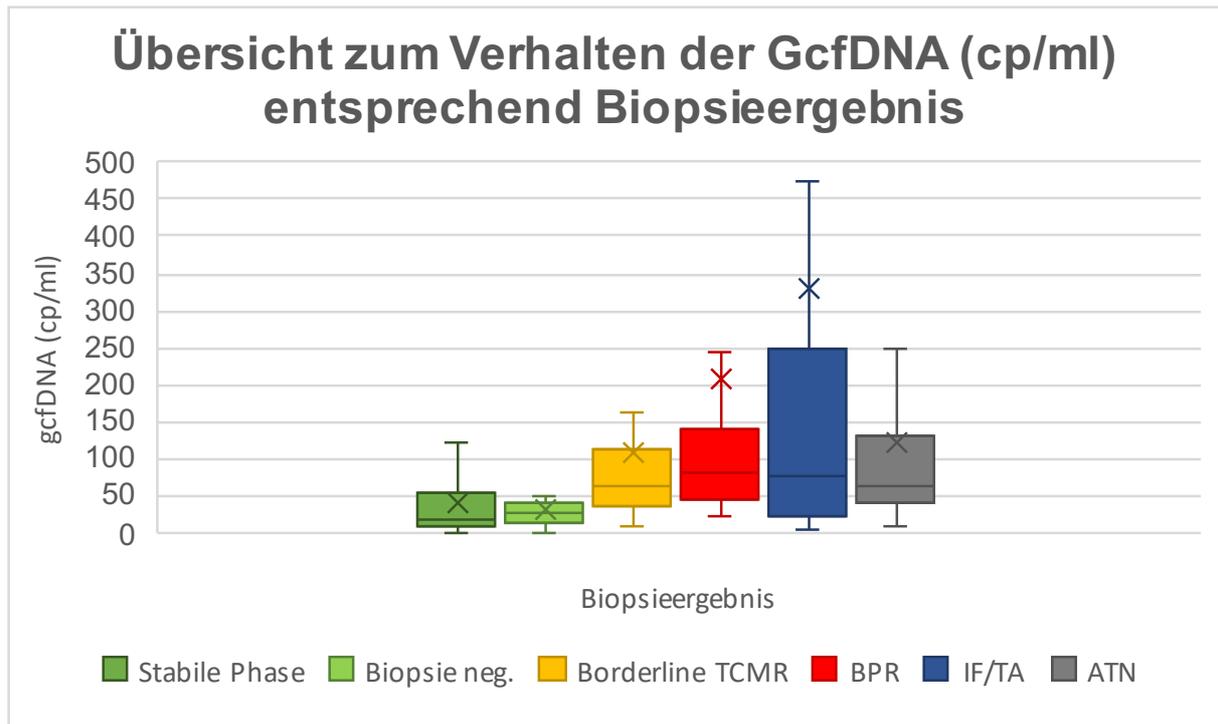


Abbildung 36: Vergleich der Freisetzung von gcfDNA entsprechend Biopsiekategorie. Ausgabe als absoluter Wert (cp/ml). Als Referenz wird das Verhalten von gcfDNA in der stabilen Phase angegeben. Betrachtung des Zeitraums ab 5 Tagen (+/-3) bis 12 Monate (+/-1) nach Transplantation (V4 – V15). Die Box-Plots zeigen innerhalb der Boxen den Interquartilrange und den Median an, die Klammern zeigen bei fehlenden Ausreisserwerten den Minimal- bzw. Maximalwert an. Ausreisserwerte wurden definiert als außerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstands. Bei Vorhandensein von Ausreisserwerten zeigen die Klammern den ersten Wert innerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstand an. Zur Optimierung der Darstellung wurden Ausreisserwerte in der Abbildung ausgeblendet. Abbildung analog (Oellerich et al., 2019).

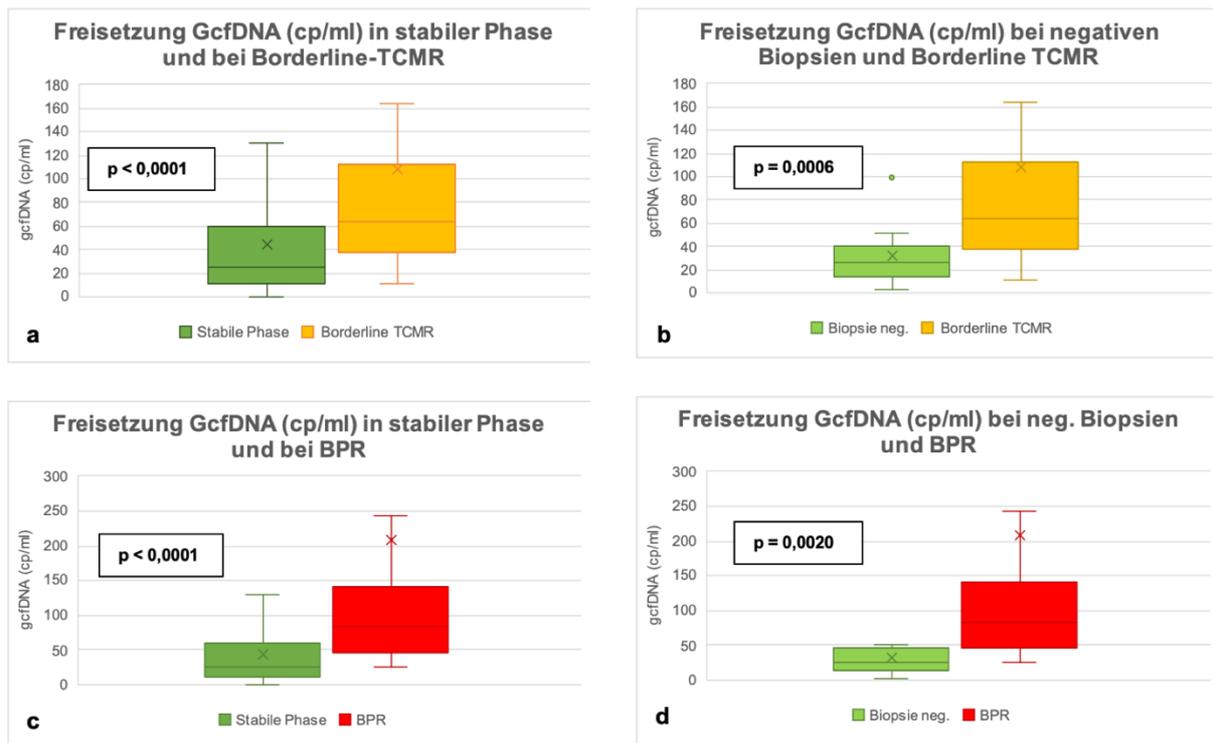


Abbildung 37: Vergleich der Freisetzung von gcfDNA in der stabilen Phase mit bioptisch nachgewiesenen Rejektionen (Borderline TCMR (a) und BPR (c)) sowie Werte bei negativen Biopsien mit bioptisch nachgewiesenen Rejektionen (Borderline TCMR (b) und BPR (d)). Ausgabe gcfDNA als absoluter Wert (cp/ml). Die Box-Plots zeigen innerhalb der Boxen den Interquartilsrange und den Median an, die Klammern zeigen bei fehlenden Ausreisserwerten den Minimal- bzw. Maximalwert an. Ausreisserwerte wurden definiert als außerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstands. Bei Vorhandensein von Ausreisserwerten zeigen die Klammern den ersten Wert innerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstands. Zur Optimierung der Darstellung wurden Ausreisserwerte in der Abbildung ausgeblendet. Abbildung analog (Oellerich et al., 2019).

Im Vergleich der gcfDNA-Werte der stabilen Phase mit bioptisch nachgewiesenen Rejektionen zeigt sich sowohl für die Borderline-TCMR ($p < 0,0001$) als auch für die BPR ($p < 0,0001$) ein statistisch hochsignifikanter Unterschied im Wilcoxon-Rangsummen-Test. Auch der Vergleich der gcfDNA-Werte bei negativen Biopsien mit bioptisch nachgewiesenen Rejektionen war statistisch signifikant ($p = 0,0006$ bei Borderline TCMR; $p = 0,0020$ bei BPR jeweils im Wilcoxon-Rangsummen-Test).

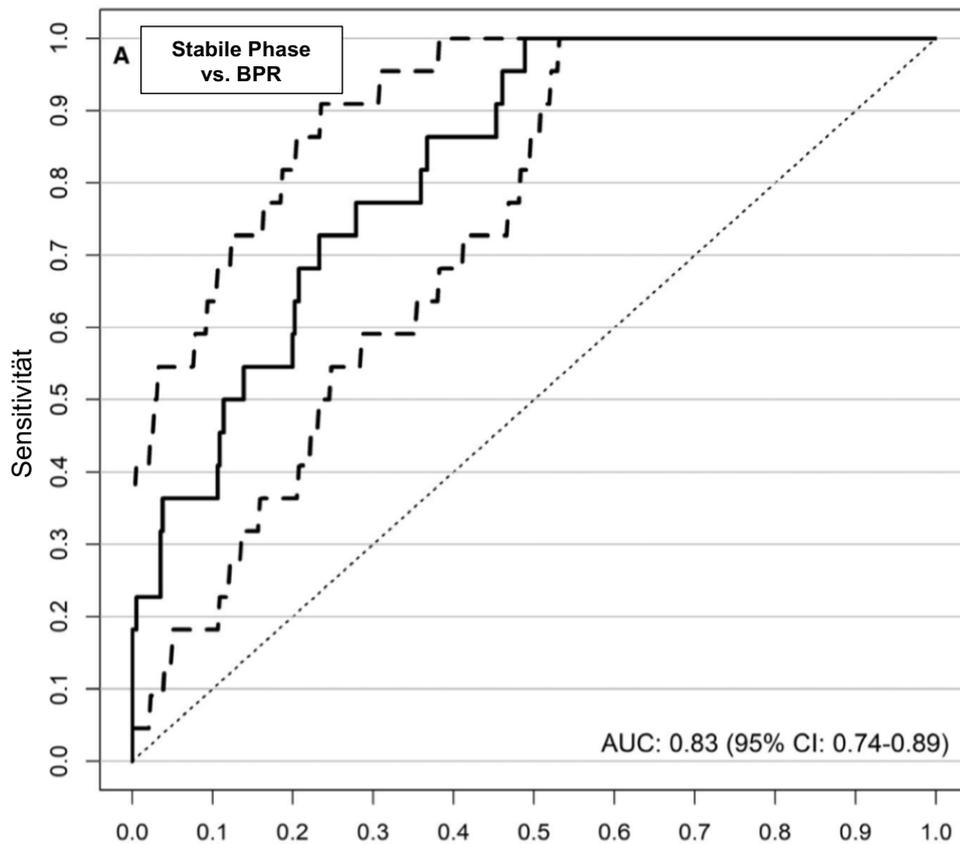


Abbildung 38: ROC-Kurve für den Vergleich der Freisetzung von gcfDNA als absolutem Wert (cp/ml) bei BPR und in der stabilen Phase für den Zeitraum ab 5 Tage nach Transplantation bis 12 Monate (+/- 1 Monat) nach Transplantation (entsprechend V4 – V15). Vorab publiziert: (Oellerich et al., 2019)

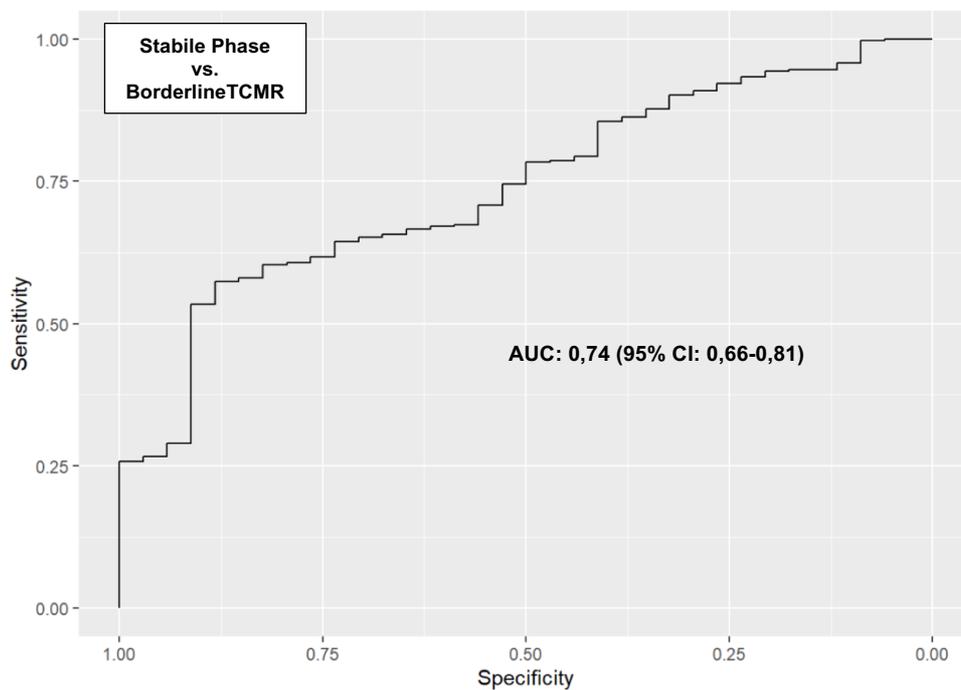


Abbildung 39: ROC-Kurve für den Vergleich der Freisetzung von gcfDNA als absolutem Wert (cp/ml) bei Borderline-TCMR und in der stabilen Phase für den Zeitraum ab 5 Tage nach Transplantation bis 12 Monate (+/- 1 Monat) nach Transplantation (entsprechend V4 – V15). Daten analog (Oellerich et al., 2019).

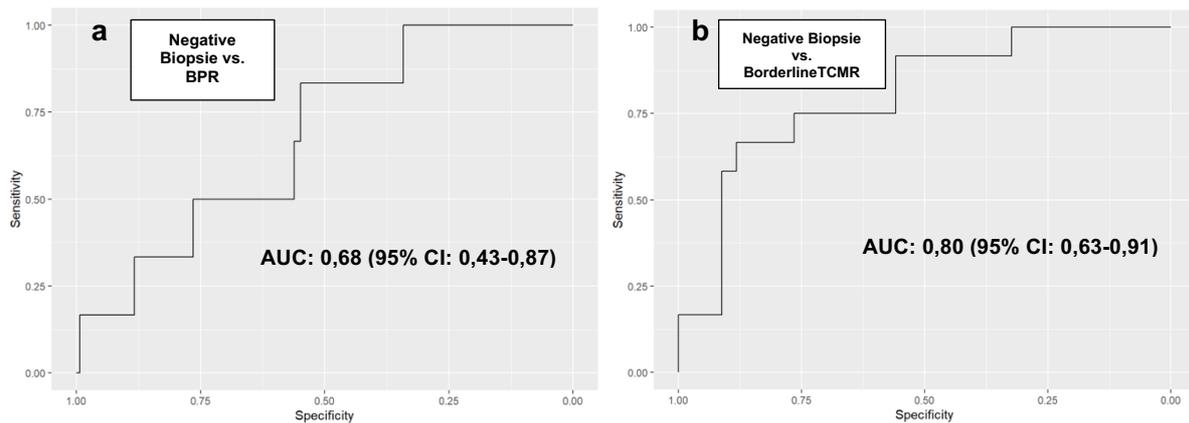


Abbildung 40: ROC-Kurven für den Vergleich der Freisetzung von gcfDNA als absolutem Wert (cp/ml) bei negativen Biopsien und BPR (a) bzw. negativen Biopsien und Borderline-TCMR (b) für den Zeitraum ab 5 Tage nach Transplantation bis 12 Monate (+/- 1 Monat) nach Transplantation (entsprechend V4 – V15). Daten analog (Oellerich et al., 2019).

In der Gegenüberstellung der gcfDNA-Werte der stabilen Phase mit Werten bei bioptisch nachgewiesener IF/TA ergibt sich ebenso ein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,0202$) wie auch im Vergleich der stabilen Phase mit den Werten bei nachgewiesener ATN ($p = 0,0001$) – jeweils erhoben mit dem Wilcoxon-Rangsummentest.

Werden statt der Werte der stabilen Phase die gcfDNA-Werte bei negativen Biopsien mit den beiden Gruppen IFTA bzw. ATN verglichen, so ergibt sich ebenfalls ein statistisch signifikanter Unterschied (Biopsie neg. vs. IFTA $p = 0,0080$; Biopsie neg. vs. ATN $p = 0,0020$, jeweils durch Wilcoxon-Rangsummentest).

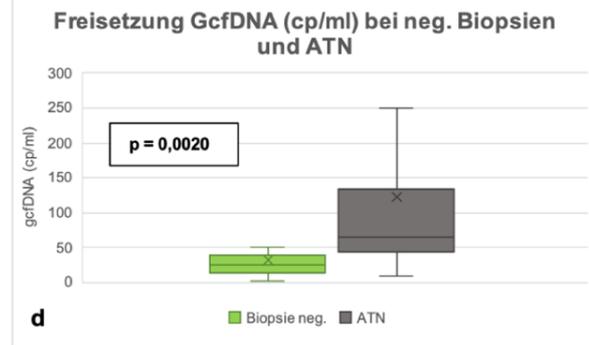
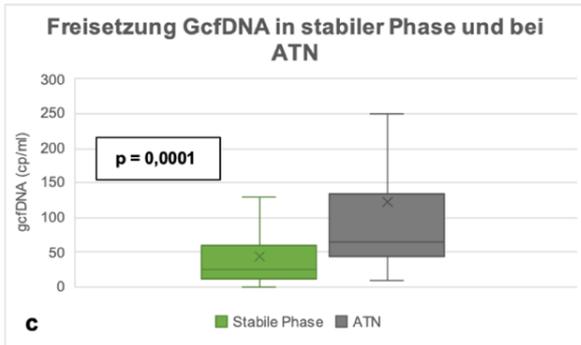
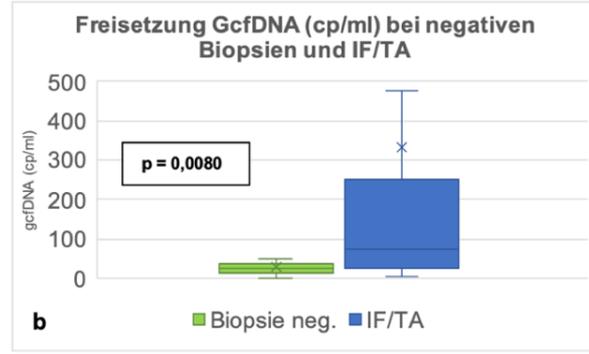
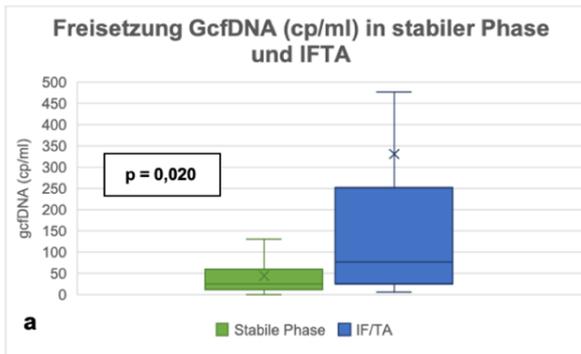


Abbildung 41: Vergleich der Freisetzung von gcfDNA in der stabilen Phase mit bioptisch nachgewiesenen Interstitieller Fibrose und Tubulusatrophie (IFTA (a)) bzw. Akuter Tubulusnekrose (ATN (c)) sowie bei negativen Biopsien und IFTA (b) und negativen Biopsien und ATN (d). Ausgabe gcfDNA als absoluter Wert (cp/ml). Die Box-Plots zeigen innerhalb der Boxen den Interquartilrange und den Median an, die Klammern zeigen bei fehlenden Ausreisserwerten den Minimal- bzw. Maximalwert an. Ausreisserwerte wurden definiert als außerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstands. Bei Vorhandensein von Ausreisserwerten zeigen die Klammern den ersten Wert innerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstands an. Zur Optimierung der Darstellung wurden Ausreisserwerte in der Abbildung ausgeblendet. Abbildung analog (Oellerich et al., 2019).

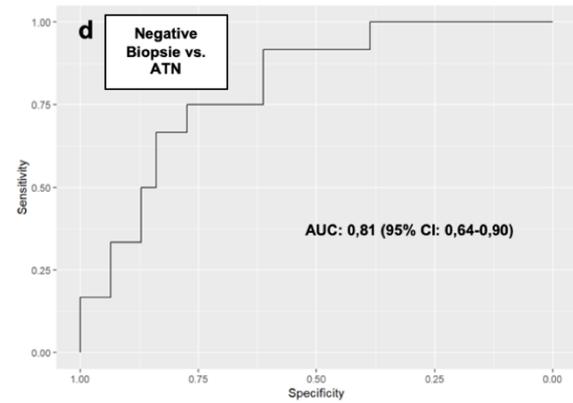
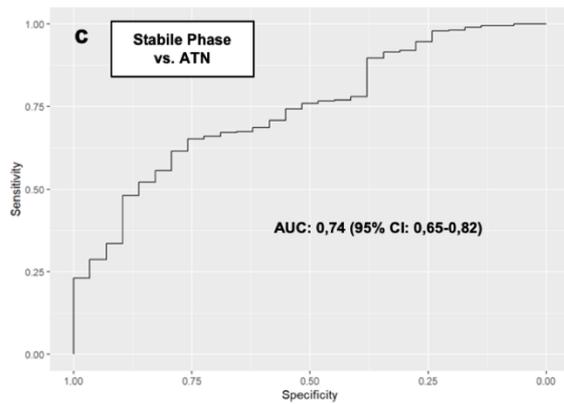
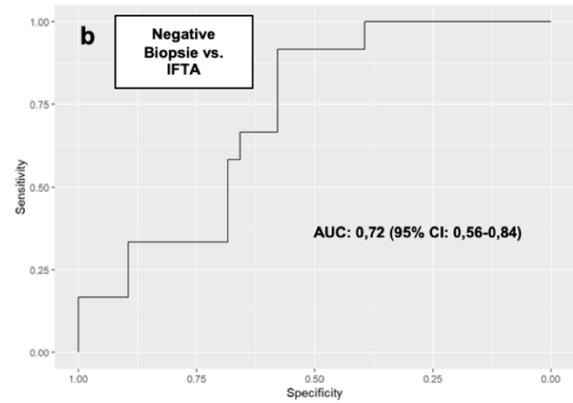
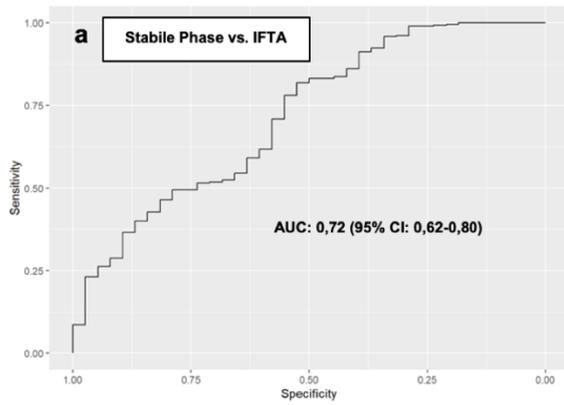


Abbildung 42: ROC-Kurven für den Vergleich der Freisetzung von gcfDNA als absolutem Wert (cp/ml) in der stabilen Phase und IFTA (a), bei negativen Biopsien und IFTA (b), in der stabilen Phase und ATN (c) sowie bei negativen Biopsien und ATN (d). Jeweils für den Zeitraum ab 5 Tage nach Transplantation bis 12 Monate (+/- 1 Monat) nach Transplantation (entsprechend V4 – V15). Daten analog (Oellerich et al., 2019).

Im Vergleich der gcfDNA-Werte zwischen stabiler Phase und negativen Biopsien ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,3246$; Wilcoxon-Rangsummentest).

Ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied zeigt sich im Vergleich der beiden Rejektionsgruppen (Borderline TCMR vs. BPR; $p = 0,1567$; Wilcoxon-Rangsummentest).

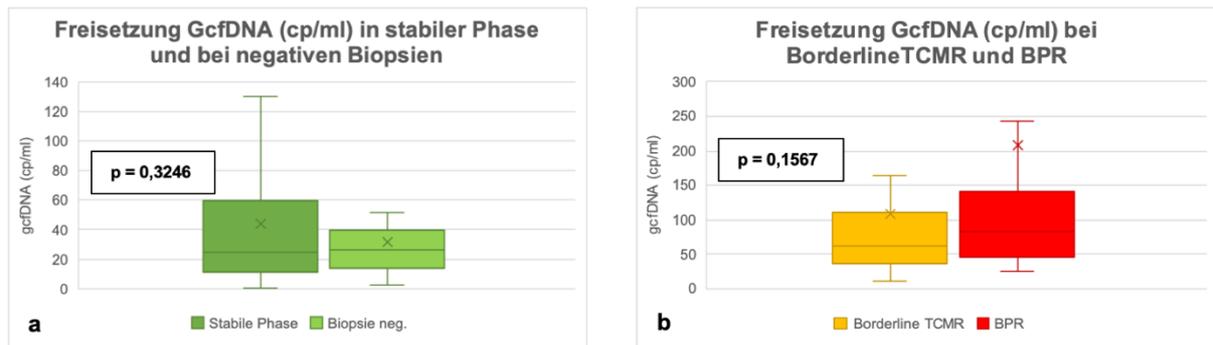


Abbildung 43: Vergleich der Freisetzung von gcfDNA in der stabilen Phase mit negativen Biopsien (a) sowie Vergleich der beiden Rejektionskategorien (Borderline TCMR und BPR (b)). Ausgabe gcfDNA als absoluter Wert (cp/ml).

Die Box-Plots zeigen innerhalb der Boxen den Interquartilsrange und den Median an, die Klammern zeigen bei fehlenden Ausreisserwerten den Minimal- bzw. Maximalwert an. Ausreisserwerte wurden definiert als außerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstands. Bei Vorhandensein von Ausreisserwerten zeigen die Klammern den ersten Wert innerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstand an. Zur Optimierung der Darstellung wurden Ausreisserwerte in der Abbildung ausgeblendet. Abbildung analog (Oellerich et al., 2019).

Im Vergleich der gcfDNA-Werte bei Borderline TCMR mit den Werten bei IF/TA ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,0875$). Bei den gcfDNA-Werten im Rahmen von BPR zeigte sich im Vergleich mit den Werten bei IF/TA ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0008$, Wilcoxon-Rangsummentest).

Die gcfDNA-Werte bei beiden Rejektionsgruppen zeigten im Vergleich zu den Werten bei ATN jeweils keinen statistisch signifikanten Unterschied (Borderline TCMR vs ATN $p = 0,3190$; BPR vs ATN $p = 0,5203$; alles im Wilcoxon-Rangsummentest).

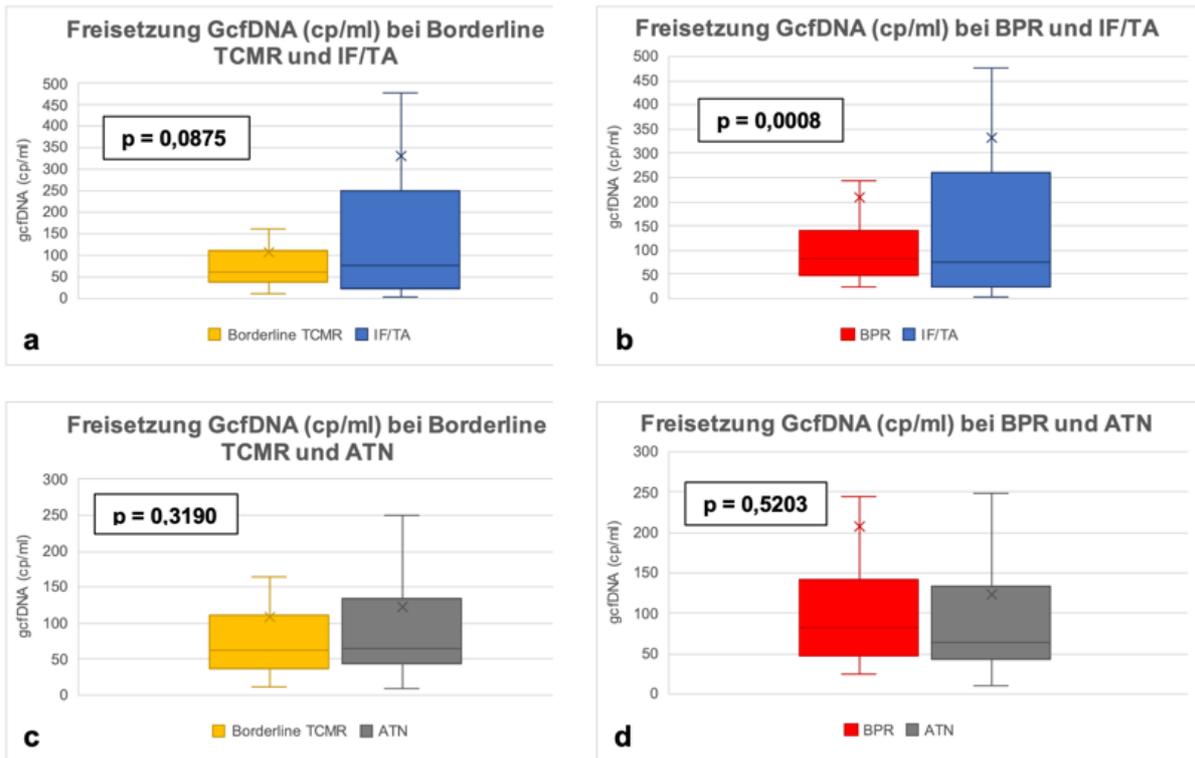


Abbildung 44: Vergleich der Freisetzung von gcfDNA bei Borderline-TCMR und IFTA (a) bzw. ATN (c) sowie BPR und IFTA (b) bzw. ATN (d). Ausgabe gcfDNA als absoluter Wert (cp/ml). Die Box-Plots zeigen innerhalb der Boxen den Interquartilsrange und den Median an, die Klammern zeigen bei fehlenden Ausreisserwerten den Minimal- bzw. Maximalwert an. Ausreisserwerte wurden definiert als außerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstands. Bei Vorhandensein von Ausreisserwerten zeigen die Klammern den ersten Wert innerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstand an. Zur Optimierung der Darstellung wurden Ausreisserwerte in der Abbildung ausgeblendet. Abbildung analog (Oellerich et al., 2019).

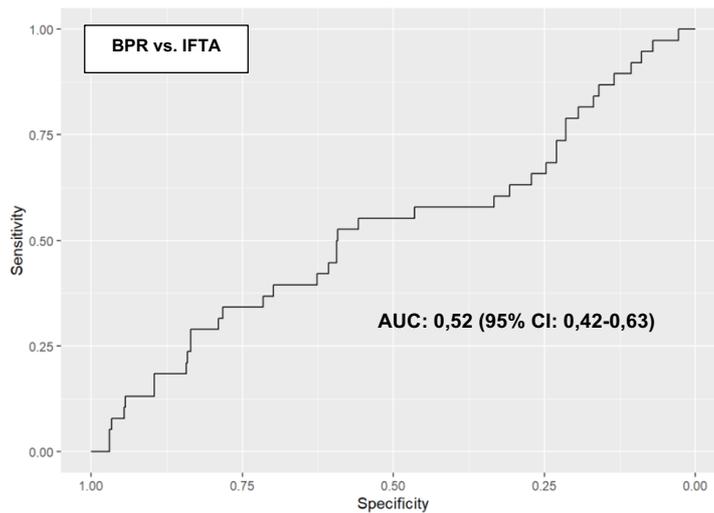


Abbildung 45: ROC-Kurve für den Vergleich der Freisetzung von gcfDNA als absolutem Wert (cp/ml) bei BPR und IFTA für den Zeitraum ab 5 Tage nach Transplantation bis 12 Monate (+/- 1 Monat) nach Transplantation (entsprechend V4 – V15). Daten analog (Oellerich et al., 2019).

3.4.3.3 Infektionen

Neben Rejektionen können Infektionen als Ursache einer akuten Verschlechterung der Transplantatnierenfunktion auftreten.

Infektiologische Komplikationen im Allgemeinen traten im Studienverlauf bei 119 von 189 ausgewerteten Patienten auf (62,96%). Es wurden im Beobachtungszeitraum insgesamt 313 infektiologische Ereignisse dokumentiert.

Neben häufig auftretenden Harnwegsinfektionen und auch BK-Virämien war der Infektfokus oft nicht eindeutig lokalisierbar. Atemwegsinfekte und Darminfekte waren nach den Harnwegsinfektionen die häufigsten bakteriellen Infektquellen. Vereinzelt fanden sich Cytomegalievirämien oder HSV-/VZV-Infekte. Selten traten Haut- und Wundinfektie oder abdominelle Infekte außerhalb der Harnwege auf.

Im Vergleich zur Stablen Phase zeigten sich im Median höhere Werte für gcfDNA beim Auftreten von Infektionen: 30,61cp/ml im Vergleich zu 24,88cp/ml in der stabilen Phase.

Bei Infektionen, die innerhalb der Beobachtungszeitpunkte V4 – V15 (5. postoperativer Tag bis 12 Monate nach Transplantation) auftraten war der minimal gemessene gcfDNA-Wert bei 0,89cp/ml, maximal bei 1006,53cp/ml (Interquartilrange 16,25cp/ml – 62,97cp/ml). Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p=0,0007476$ im Wilcoxon-Rangsummen-Test).

Tabelle 25: gcfDNA in der stabilen Phase und bei akuter Infektion. Betrachtung aller Werte ab dem 5. Postoperativen Tag bis 12 Monate (+/- 1 Monat) nach Transplantation. Darstellung von Minimal- und Maximalwert, Median und Interquartilwerten.

		Stabile Phase	Infektion
GcfDNA (cp/ml)	Min	0,11	0,89
	Q1	10,91	16,25
	Median	24,88	30,61
	Q3	59,46	62,97
	Max	386,46	1006,53

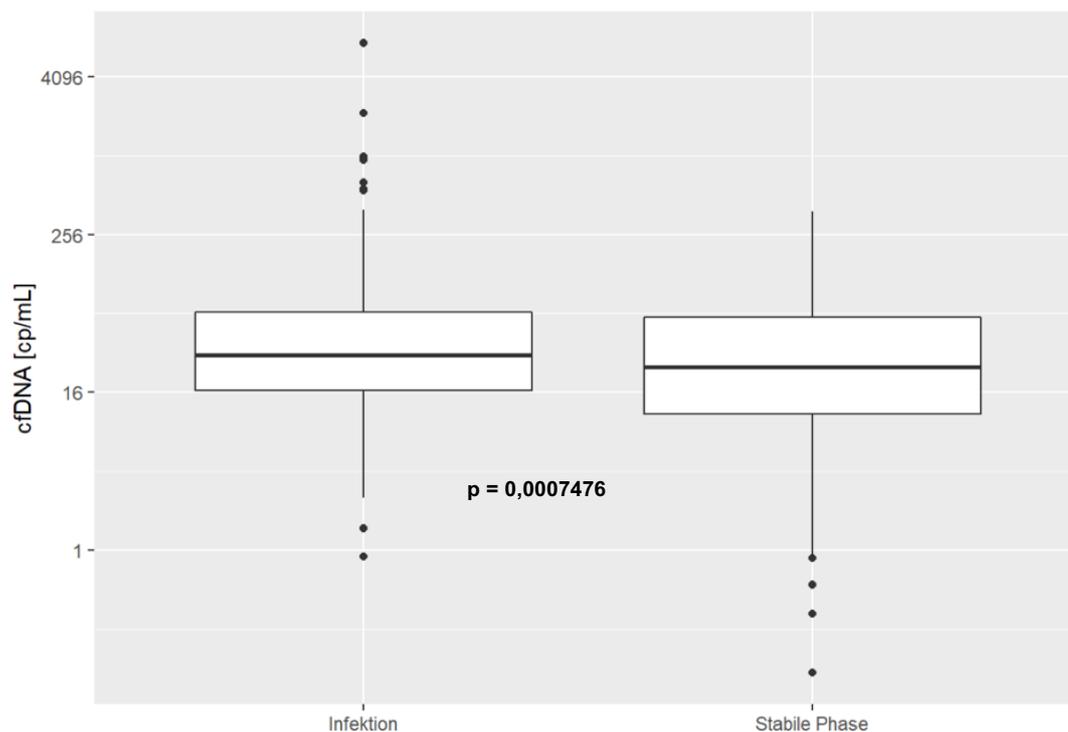


Abbildung 46: Vergleich der Freisetzung von gcfDNA bei Infektionen und in der stabilen Phase. Angabe der gcfDNA als absoluten Wert (cp/ml). Betrachtung des Zeitraums von 5 Tagen bis 12 Monate (+/- 1 Monat) entsprechend V4 – V15 nach Transplantation. Die Box-Plots zeigen innerhalb der Boxen den Interquartilrange und den Median an, die Klammern zeigen 2,5%- und 97,5% Quantile. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,0007476$ im Wilcoxon-Rangsummen-Test).

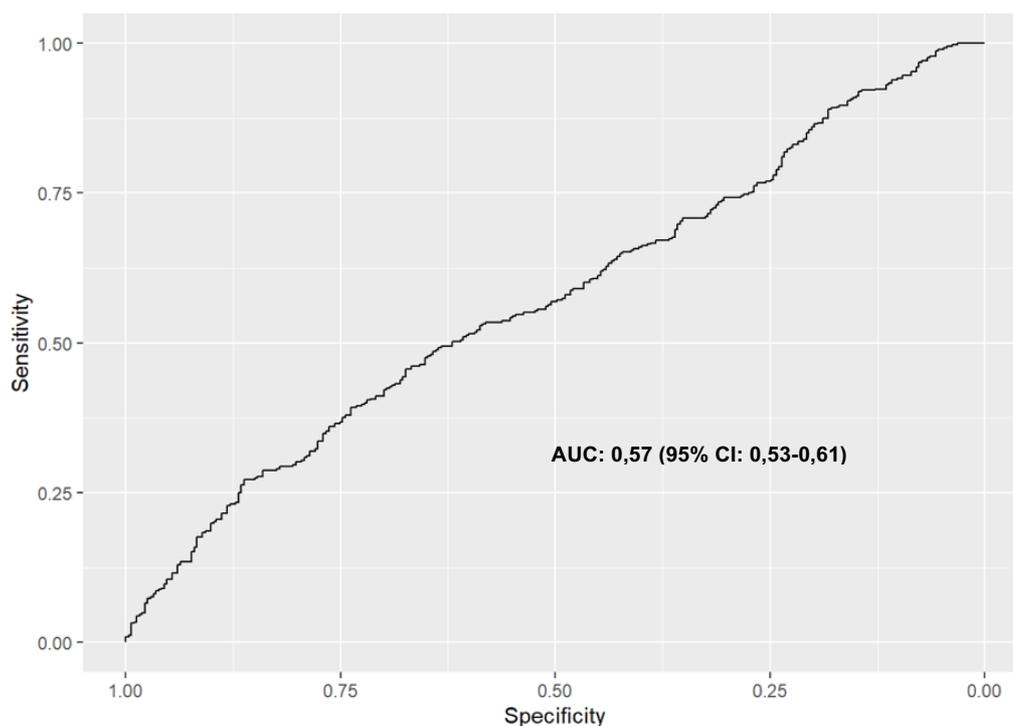


Abbildung 47: ROC-Kurve für den Vergleich der Freisetzung von gcfDNA als absolutem Wert (cp/ml) bei Infektionen und in der stabilen Phase für dem Zeitraum ab 5 Tage nach Transplantation bis 12 Monate (+/- 1 Monat) nach Transplantation (entsprechend V4 – V15)

3.4.3.3.1 Polyomavirämie

In der hier untersuchten Kohorte fanden sich bei 36 der 189 Patienten (19,05%) mindestens eine Episode einer BKVirämie. Es wurden bei diesen Patienten insgesamt 87 Ereignisse einer BKVirämie erfasst.

Tabelle 26: gcfDNA in der stabilen Phase und bei akuter Infektion. Betrachtung aller Werte ab dem 5. Postoperativen Tag bis 12 Monate (+/- 1 Monat) nach Transplantation. Darstellung von Minimal- und Maximalwert, Median und Interquartilwerten

		Stabile Phase	BK-Virämie
GcfDNA (cp/ml)	Min	0,11	0,89
	Q1	10,91	13,04
	Median	24,88	24,53
	Q3	59,46	43,60
	Max	386,46	641,52

Im Vergleich zur stabilen Phase zeigten sich keine höheren gcfDNA-Werte in der Gruppe mit BK-Virämie (Median 24,53cp/ml, minimal 0,89cp/ml, Interquartilrange 13,04cp/ml – 43,60cp/ml, maximal 641,52cp/ml). Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den gemessenen GcfDNA-Werten zwischen Stabiler Phase und BK-Virämie ($p = 0,6344$ im Wilcoxon-Rangsummen-Test).

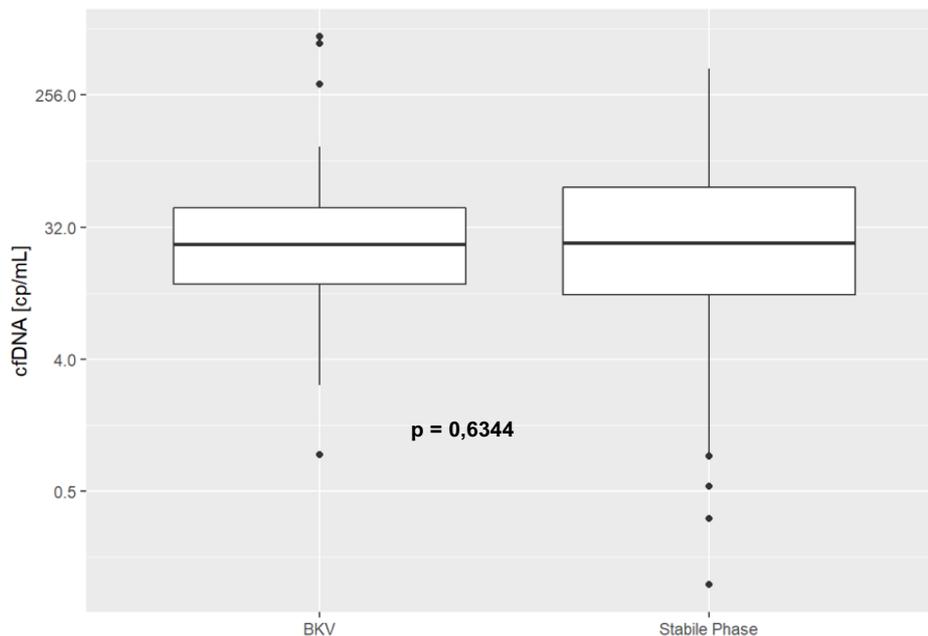


Abbildung 48: Vergleich der Freisetzung von gcfDNA bei Polyomavirämie und in der stabilen Phase. Angabe der gcfDNA als absoluten Wert (cp/ml). Betrachtung des Zeitraums von 5 Tagen bis 12 Monate (+/- 1 Monat) entsprechend V4 – V15 nach Transplantation.

Die Box-Plots zeigen innerhalb der Boxen den Interquartilrange und den Median an, die Klammern zeigen 2,5%- und 97,5% Quantile

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,6344$ im Wilcoxon-Rangsummen-Test).

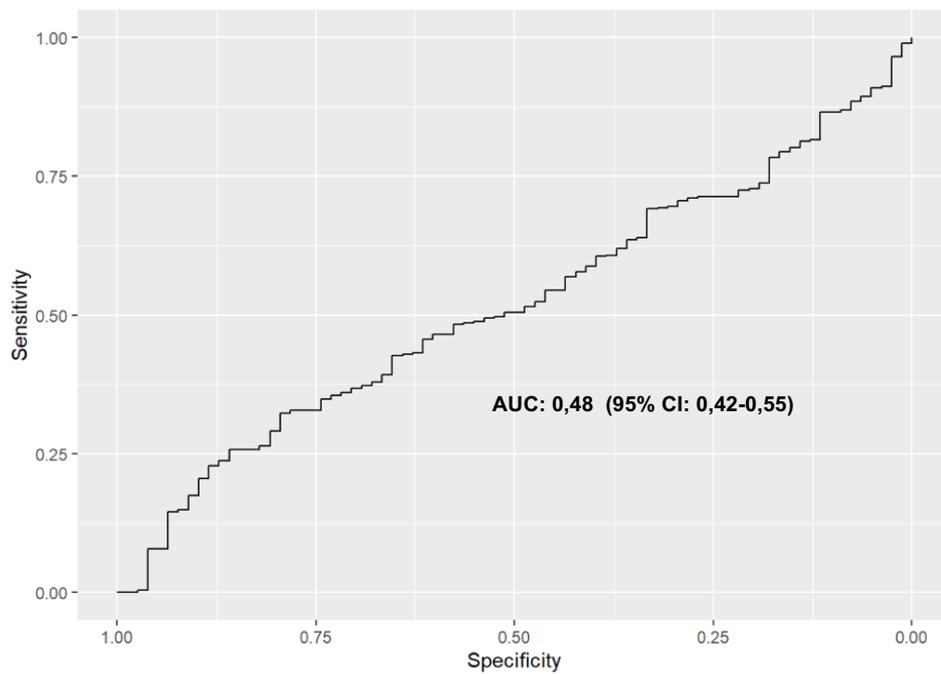


Abbildung 49: ROC-Kurve für den Vergleich der Freisetzung von gcfDNA als absolutem Wert (cp/ml) bei Polyomavirämie und in der stabilen Phase für dem Zeitraum ab 5 Tage nach Transplantation bis 12 Monate (+/- 1 Monat) nach Transplantation (entsprechend V4 – V15).

4 Diskussion

4.1 Kinetik der gcfDNA

4.1.1 Allgemeine Kinetik

Zur Beurteilung der allgemeinen Freisetzungskinetik wurden die hier erhobenen Daten selektiert, indem Akutereignisse wie Rejektionen, Infektionen, ein verlängertes akutes Nierenversagen nach Transplantation ausgeschlossen wurden. Außerdem wurde ein Mindestabstand zu Steroidboli von 7 Tagen eingehalten, da die Detektion der gcfDNA durch die hochdosierte Steroidgabe beeinflusst wird (Grskovic et al., 2016). Ebenso wurden Proben nach Plasmapherese ausgeschlossen aufgrund der potentiellen Elimination von gcfDNA durch den Plasmaaustausch.

In den so erhobenen Werten zeigte sich bei allen Patienten eine Zeitabhängigkeit mit in der Frühphase sehr hohen gcfDNA-Werten beginnend mit im Median 289,50cp/ml am ersten postoperativen Tag. Hiernach kontinuierlicher Abfall der Werte bis sich etwa 8-12 Tage nach Transplantation die Ausbildung eines Basiswerts zeigte, der im Verlauf des Beobachtungszeitraums in etwa stabil blieb. Hier zeigten sich im Median gcfDNA-Werte von 22,08cp/ml.

Eine ähnliche Kinetik konnte in einer belgischen Studie dokumentiert werden. Es wurden mittels Next Generation Sequencing (NGS) 42 stabile Nierentransplantatempfänger untersucht. Die gcfDNA-Werte wurden als Fraktionen der gesamten zellfreien DNA im Plasma gemessen. Es zeigten sich am ersten postoperativen Tag im Median Werte von 10,2% mit exponentiellem Abfall auf im Median 0,46% am 10. Postoperativen Tag (Gielis et al., 2018).

Eine chinesische Studie verglich die Kinetik der gcfDNA unmittelbar nach Transplantation bei Organempfängern nach Lebendspende und Spende nach Herztod des Spenders. Es wurden 7 Empfänger nach Lebendspende und 14 nach Organspende mit Herztod des Empfängers untersucht. Auch hier wurde die gcfDNA mit NGS gemessen und als Fraktion des gesamten zellfreien DNA im Plasma angegeben. Die mittlere gcfDNA-Fraktion drei Stunden postoperativ war bei 20,69%, nach 16 Stunden nur noch 5,22%, am Folgetag bei 1,98% und am 7. postoperativen Tag bei 0,85%. Über den gesamten Zeitraum war die gcfDNA bei Organspende durch Verstorbene signifikant höher als bei Lebendspenden: im ersten erfassten Wert 45% vs. 10%, am 7. Postoperativen Tag 1,11% vs. 0,59%. Von den 14 Transplantation durch Verstorbenenenspende kam es bei 6 Organen zu einer verzögerten

Funktionsaufnahme. Hier ergab sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den gcfDNA-Werten bei Verstorbenenenspenden mit sofortiger Transplantatfunktionsaufnahme, allerdings waren die initialen gcfDNA-Werte in der Gruppe mit verzögerter Funktionsaufnahme höher und die Werte fielen langsamer als bei sofortiger Organfunktionsaufnahme nach Verstorbenenenspende (Shen et al., 2019).

4.1.2 Form der Organspende

Die hier erhobenen Daten wurden für die unmittelbare Frühphase nach Transplantation wie auch in der chinesischen Studie hinsichtlich Unterschieden entsprechend Form der Organspende untersucht. Hierbei wurden die ersten 5 Tage nach Transplantation betrachtet. Bei den 118 Patienten, die die Niere im Rahmen einer Verstorbenenenspende erhielten, konnte ein medianer Wert der gcfDNA von 215,98cp/ml erhoben werden (Tag 1 627,12cp/ml, Tag 3 227,42cp/ml, Tag 5 101,92cp/ml). Bei den 71 Patienten nach Lebendnierenspende war der mediane Wert der gcfDNA mit 134,74cp/ml deutlich niedriger (Tag 1 145,44cp/ml, Tag 3 183,42cp/ml, Tag 5 80,60cp/ml). Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p=0,03131$ im Wilcoxon-Rangsummentest).

Die Patienten nach Lebendspende wurden nochmals hinsichtlich der Blutgruppengleichheit betrachtet. 47 Patienten erhielten das Organ von einem Blutgruppengleichen Spender, wo der mediane gcfDNA-Wert der ersten fünf postoperativen Tage bei 111,02cp/ml (Tag 1 103,31cp/ml, Tag 3 164,03cp/ml, Tag 5 80 cp/ml) war. 24 Patienten erhielten das Organ von einem Blutgruppenungleichen Spender, hier war der mediane gcfDNA-Wert der ersten fünf postoperativen Tage höher als bei den AB0-kompatiblen Transplantationen, nämlich bei 178,12cp/ml (Tag 1 327,13cp/ml, Tag 3 233,74cp/ml, Tag 5 85,67cp/ml). Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Vergleichbare Daten hierzu in der Literatur waren zum Zeitpunkt der Arbeit nicht verfügbar.

Betrachtet man die Ischämiezeiten nach Transplantation, so zeigen sich bei den Lebendnierenspenden sowohl in der kalten Ischämiezeit (Median 3 Stunden 8 Minuten bei Lebendspende vs. 12 Stunden 55 Minuten bei Verstorbenenenspende) als auch in der (zweiten) warmen Ischämiezeit (Median 37 Minuten bei Lebendspenden vs. 53 Minuten bei Verstorbenenenspenden) deutlich niedrigere Ischämiezeiten. Gründe hierfür sind bei der kalten Ischämiezeit insbesondere der Wegfall des Organtransports vom

Entnahmezentrum zum transplantierenden Zentrum und auch die optimierte Zeitplanung zwischen Organentnahme und Transplantation bei den Lebendspenden. Die Unterschiede in der warmen Ischämiezeit sind deutlich geringer, aber tatsächlich immer noch vorhanden. Sie erklären sich a.e. im Kontext der genaueren Planbarkeit der Operation, insbesondere bei anatomischen Besonderheiten, und auch der potentiell besseren Gefäßverhältnisse der Empfänger aufgrund der in der Regel kürzeren Dauer der Dialysepflichtigkeit zum Zeitpunkt der Organtransplantation.

4.1.3 Immunologisches Risiko

Die Freisetzungskinetik der gcfDNA in der Kohorte wurde entsprechend eines festgelegten Kriterienkatalogs zur Bestimmung des immunologischen Risikos nach Transplantation (verzögerte Transplantatnierenfunktionsaufnahme, vorherige Transplantation, PRA >15% und > 3 HLA-Mismatches (van Gelder et al., 2010)) betrachtet. Die Gruppe mit hohem immunologischem Risiko musste mindestens eines der Kriterien erfüllen. Dies waren in der Kohorte 127 Patienten. Hier fand sich in den ersten 5 postoperativen Tagen ein medianer gcfDNA-Wert von 173,83cp/ml (Tag 1 507,39cp/ml, Tag 3 218,70cp/ml, Tag 5 104,72cp/ml). Bei den 62 Patienten mit niedrigem immunologischem Risiko fanden sich etwas niedrigere Werte (Gesamtmedian 156,59cp/ml; Tag 1 206,06cp/ml, Tag 3 226,35cp/ml, Tag 5 98,26cp/ml). Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p = 0,2386$ im Wilcoxon-Rangsummentest).

Zur Betrachtung des gesamten Immunologischen Risikos hinsichtlich der gcfDNA-Kinetik wurden bisher keine Studien veröffentlicht. In der Studie von Shen et. al wurde allerdings eine Untergruppe mit verzögerter Transplantatnierenfunktionsaufnahme als einem der hier definierten Punkte für ein erhöhtes immunologisches Risiko betrachtet. Bei sehr kleiner Fallzahl (7 Patienten) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu den Patienten mit sofortiger Funktionsaufnahme, jedoch wie in den hier diskutierten Daten bei Patienten mit hohem immunologischen Risiko, auch ein Trend zu höheren gcfDNA-Werten mit verzögerter Kinetik in der Gruppe mit verzögerter Funktionsaufnahme.

4.1.4 Wertung der gcfDNA-Kinetik

Geht man von der Grundannahme aus, dass es zwischen der Konzentration freier Nukleinsäuren und Gewebeschädigung einen unmittelbaren Zusammenhang gibt

(Vishnu Swarup, 2007), so können die in dieser Studie, wie auch die von Gielis et.al. und Shen et. al erhobenen Daten der gcfDNA-Kinetik nach Nierentransplantation als Korrelat des Ischämie-Reperfusionsschadens gewertet werden.

Hierzu passen die höheren gcfDNA-Werte nach Verstorbenenentransplantation in unserer Kohorte und bei Shen et.al., die insbesondere verursacht durch die längeren Ischämiezeiten, einen größeren Ischämie-Reperfusionsschaden zeigen.

Auch der – zwar statistisch nicht signifikante – Unterschied mit Trend zu höheren gcfDNA-Werten bei ABO-inkompatiblen Lebendtransplantationen kann in diese Richtung gewertet werden, insbesondere unter der Arbeitshypothese einer höheren inflammatorischen Aktivität durch die Blutgruppenungleichheit.

Patienten mit hohem immunologischem Risiko haben ein höheres Risiko für das Auftreten einer akuten Rejektion (Pratschke et al., 2016). Somit kann der Trend zu höheren gcfDNA-Werten in der frühen Freisetzungskinetik in dieser Studie wie auch bei Shen et al als mögliches Korrelat für eine höhere Immunologische Aktivität gewertet werden und damit auch als möglichen Hinweis einer unzureichenden Immunsuppression. Allerdings kann dies aufgrund der jeweils geringen Fallzahlen und bisher nur wenig publizierten Daten noch nicht endgültig bewertet werden.

4.2 Einflussgrößen auf die Freisetzung von gcfDNA

Nach der ersten Stabilisierungsphase im Sinne eines „Wash-Out“ der a.e. durch den Ischämie-Reperfusionsschaden bedingten hohen gcfDNA wurden im zeitlichen Verlauf erneute Anstiege der gcfDNA-Werte beobachtet, insbesondere bei akuter Zellschädigung des Transplantats unterschiedlichster Ursache (Bloom et al., 2017, Whitlam et al., 2019, Oellerich et al., 2019).

Vereinzelt finden sich erhöhte gcfDNA-Werte bei histopathologisch unauffälligen Transplantaten. Die Ursache ist unklar. Möglicherweise liegen hier individuelle Patientenseitige Variationen vor (Bromberg et al., 2019)

4.2.1 Akute Schädigung im Transplantat allgemein

In der Vergangenheit gab es viele Studien, die die Bedeutung der gcfDNA als möglichem noninvasivem Biomarker im Serum oder Urin zur Evaluation von Rejektionen nach Organtransplantation im Sinne einer „liquid biopsy“ untersucht haben. Allein zur Untersuchung der gcfDNA im Plasma wurden mehr als 47 Studien publiziert (Knight et al., 2019, Filippone and Farber, 2020). Bei Leber-, Herz- und Nierentransplantierten Patienten zeigten sich erhöhte gcfDNA-Werte in Situationen von nachgewiesenem Transplantatschaden, wie z.B. akuter und chronischer Abstoßungen oder auch Infektionen (Knight et al., 2019, Sigdel et al., 2018, Snyder et al., 2011, Beck et al., 2013b, Sigdel et al., 2013, Beck et al., 2015). Nach erfolgreicher Therapie des Transplantatschadens kehrte die gcfDNA-Werte wieder auf Baseline-Niveau zurück (De Vlaminck et al., 2014, Snyder et al., 2011).

Zur Untersuchung, inwiefern eine akute Verschlechterung der Transplantatnierenfunktion Einfluss auf eine erhöhte Freisetzung von gcfDNA im Plasma hat, wurden in der hier untersuchten Kohorte Patienten mit nachgewiesener akuter Verschlechterung der Transplantatnierenfunktion betrachtet und mit Daten in der stabilen Phase wie im Rahmen der allgemeinen gcfDNA-Kinetik-Erhebung definiert, verglichen. Als Ereignis der akuten Transplantatnierenfunktionsverschlechterung wurde definiert der Anstieg des Serumkreatinins um $>0,3\text{mg/dl}$ seit dem letzten Visitenzeitraum und/oder signifikante Zunahme der Proteinurie (mindestens Verdopplung seit der letzten Visite). Es konnten im gesamten Beobachtungszeitraum insgesamt 379 solcher Ereignisse bei 153 unterschiedlichen Patienten erfasst werden. Es zeigten sich im Vergleich zur stabilen

Gruppe ohne Akutereignisse deutlich höhere gcfDNA-Werte (Median 29,99cp/ml vs. 24,88cp/ml; Interquartilrange 16,27cp/ml – 67,59cp/ml vs. 10,91cp/ml vs. 59,46cp/ml). Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p = 6,095e^{-05}$ im Wilcoxon-Rangsummentest).

Bereits 1999 wurde gcfDNA in Bezug zu einer akuten Rejektion betrachtet. Mittels qPCR wurde bei geschlechtsungleichen Empfänger-Spender-Paaren nach Nierentransplantation mittels Bestimmung von sog. Genomäquivalenten gcfDNA im Urin gemessen (Fraktion zur gesamten zellfreien ZNA). Es zeigten sich im Mittel 8,7% gcfDNA (0-58,5%). Bei einem Organempfänger mit akuter Rejektion konnten deutlich höhere Werte gemessen werden, die sich nach Therapie der Rejektion schnell zu einem Baselinewert normalisierten (Zhang et al., 1999).

Eine andere Arbeitsgruppe konnte ähnliche Ergebnisse erzielen. Bei drei weiblichen Empfängerinnen von männlichen Nierenspendern konnten im Rahmen einer akuten Rejektion ein deutlicher Anstieg der gcfDNA-Werte im Urin nachgewiesen werden, welche sich nach Behandlung der Abstoßung wieder auf den Baselinewert normalisierte. Allerdings waren die erhöhten gcfDNA-Werte nicht spezifisch für Rejektionen, da auch bei Infektionen erhöhte gcfDNA-Werte nachgewiesen wurden (Zhong et al., 2001).

Ähnliche Ergebnisse erzielte eine weitere Arbeitsgruppe, die bei 21 weiblichen pädiatrischen Empfängerinnen, die Nierentransplantate eines männlichen Empfängers erhielten, insgesamt 63 Urinproben untersuchten. Hiervon war bei 41 Proben die Transplantatnierenfunktion stabil, während bei 22 Proben eine Transplantatnierenfunktionsverschlechterung unterschiedlicher Ursache vorlag (8 akute Rejektionen, 4 BK-Virusnephropathien, 10 chronische Transplantatschäden). Die gemessenen gcfDNA-Werte im Urin zeigten insgesamt eine deutliche Schwankungsbreite (Mittelwert 2,67% +/- 3,69%) bei stabilen Patienten, die sich im Vergleich zu Patienten mit chronischer Transplantatschädigung nicht signifikant unterschieden ((Mittelwert 2,42% +/- 2,4%). Bei Patienten mit akuter Transplantatschädigung zeigten sich signifikant höhere Werte, ohne dass sich signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe mit akuter Abstoßung (Mittelwert 20,5% +/- 13,9%) und BK-Nephropathie (Mittelwert 20,3% +/-15,7%) ergaben (Sigdel et al., 2013).

Um die Rolle der gcfDNA bei akuter Verschlechterung der Transplantatnierenfunktion besser zu untersuchen, wurde in den hier erhobenen Daten die Freisetzung an gcfDNA entsprechend unterschiedlicher klinischer Ereignisse betrachtet.

4.2.2 Histopathologische Aspekte

Anhand klinischer Kriterien wurde in der untersuchten Kohorte die Indikation zur Durchführung einer Transplantatnierenbiopsie gestellt. Entsprechend histopathologischem Befund wurde die gcfDNA-Freisetzung im Vergleich zur vorab definierten stabilen Phase betrachtet. Aufgrund der geringen Fallzahl wurden Biopsien in nur zwei Kategorien betrachtet: T-Zell-vermittelte Borderline-Rejektionen (Borderline-TCMR) oder bioptisch nachgewiesene Rejektionen (BPR; hierin enthalten war jegliche Form der Rejektion entsprechend BANFF-Klassifikation außer den Borderline-Rejektionen).

In beiden Gruppen zeigte sich eine signifikant höhere Freisetzung an gcfDNA als in der stabilen Phase (stabile Phase gcfDNA-Median: 24,88cp/ml, Borderline-TCMR gcfDNA-Median: 63,52cp/ml, BPR-Median: 82,37cp/ml; $p < 0,0001$ sowohl bei Borderline-TCMR als auch bei BPR, jeweils durch Wilcoxon-Rangsummentest ermittelt).

Bei Nachweis einer akuten Tubulusnekrose (ATN) als histopathologischem Korrelat des akuten Nierenversagen zeigte sich ebenso eine signifikant höhere Freisetzung an gcfDNA (Median 64,67cp/ml, $p = 0,020$ im Wilcoxon-Rangsummentest) im Vergleich zur stabilen Phase (Median 24,88cp/ml) wie auch bei Nachweis einer interstitiellen Fibrose und Tubulusatrophie (IFTA; Median 75,46cp/ml; $p = 0,0001$ im Wilcoxon-Rangsummentest).

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich, wenn die unterschiedlichen Histologiegruppen mit der „Biopsie-negativen“ Gruppe (GcfDNA-Median 26,22cp/ml), wo sich keinerlei histopathologische Veränderungen im Transplantat gezeigt hatten, verglichen wurden ($p = 0,0006$ bei Borderline-TCMR; $p = 0,0020$ bei BPR; $p = 0,080$ bei IFTA, $p = 0,0020$ bei ATN; jeweils durch Wilcoxon-Rangsummentest ermittelt).

Zudem zeigte die Biopsie-negative Gruppe im Vergleich zur stabilen Phase keinen signifikanten Unterschied in der Freisetzung der gcfDNA ($p = 0,3246$).

Auch wenn die Biopsie-negative Gruppe mit nur 12 Proben eine geringe Fallzahl hat, so kann in der Zusammenschau das ähnliche Verhalten der histopathologischen Akutereignisse zu sowohl der stabilen Phase als auch der Biopsie-negativen Gruppe

im Sinne einer guten Korrelation der in der Studie definierten Stabilitätskriterien zu einer tatsächlichen Transplantatgesundheit gewertet werden.

Eine signifikante Unterscheidung der beiden Rejektionsgruppen untereinander wie auch der einzelnen Rejektionsuntergruppen im Vergleich zur ATN (als Korrelat des „Nicht-Rejektionsbedingten-Transplantatversagens) gelang nicht. Auch im Vergleich der Rejektionsgruppen zu IFTA als Bild des chronischen Transplantatschadens konnte kein klarer Unterschied nachgewiesen werden. Zwar zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der BPR und IFTA ($p = 0,0008$ im Wilcoxon-Rangsummentest) bei fehlender Signifikanz im Vergleich von Borderline-TCMR und IFTA. Allerdings zeigt die ROC-Kurve (Vergleich BPR und IFTA) eine schlechte Unterscheidbarkeit der beiden Merkmale (AUC 0,52). Dies liegt insbesondere daran, dass bei vielen Transplantaten mit akuten Rejektionszeichen auch eine signifikante IFTA vorliegt. Eine Untergruppe mit alleinigem Vorhandensein von IFTA ohne Rejektionszeichen wurde in der Auswertung nicht erhoben, so dass sich in beiden Gruppen eine gemeinsame Teilmenge bildet, die die ROC-Kurve in Richtung 0,5 verzerrt. Dies erklärt auch die hohe Streuung der gcfDNA-Werte in der Gruppe der IFTA. Hier wäre eine differenziertere Auswertung der IFTA-Gruppe mit alleiniger Betrachtung der Rejektions- und ATN-freien Biopsate interessant.

Auch in anderen Studien gelang keine eindeutige Unterscheidung in der Art des akuten Schadens am Transplantat durch die gcfDNA-Werte.

Mittels qPCR und Ausgabe von GEs („genome equivalents“) bei geschlechtsunterschiedlichen Paaren von Transplantatempfänger und Spender arbeiteten Garcia Moreira et. al. Es wurden gcfDNA im Plasma von 100 Nierentransplantatempfängern untersucht. Die 31 Proben von klinisch stabilen Patienten hatten mittlere gcfDNA-Werte von 1280 GEs/ml Plasma. Sowohl die 18 Patienten mit akuter Rejektion (gcfDNA-Median 55300 GEs/ml Plasma) als auch die Patienten mit systemischen Infekten (Median 40400 GEs/ml Plasma) zeigten deutlich erhöhte gcfDNA-Werte ohne signifikanten Unterschied zwischen den Werten bei akuter Rejektion und Infektion. Beide Ereignisse ergaben allerdings signifikant höhere gcfDNA-Werte als bei nachgewiesener akuter Tubulusnekrose, Calcineurininhibitortoxizität oder Harnwegsinfektionen. Unter simultaner Bestimmung von Procalcitonin im Serum zum Ausschluss einer Sepsis konnte für die Proben mit normwertigem Procalcitonin eine Spezifität von 98% zur Detektion von Rejektionen ab einem Cut-off von 12000GEs/ml erzielt werden (Garcia Moreira et al., 2009).

Die DART-Studie („Circulation Donor-Derived Cell-Free DNA in Blood for Diagnosing Acute Rejection in Kidney Transplant Recipients“ (Bloom et al., 2017)), eine multicenter prospektive Beobachtungsstudie, untersuchte mittels Verwendung eines kommerziell erhältlichen NGS-Assays (Allosure, CarDx, Inc., Brisbane, CA) 107 Transplantatnierenbiopsien bei 102 unterschiedlichen Patienten mit simultaner Bestimmung der gcfDNA im Serum. In den 107 Biopsien konnten 27 akute Rejektionen nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich um 11 akute T-Zell-vermittelte Rejektion, 6 aktive Antikörper-vermittelte Rejektionen und 10 chronische Antikörpervermittelte Rejektionen. In der Gruppe mit akuter Rejektion fand sich eine im median signifikant höhere gcfDNA-Fraktion als in der Gruppe ohne Rejektion (1,6% vs. 0,3%). Dieser Unterschied war signifikant ($p < 0,001$, AUC 0,74). Bei genauerer Betrachtung der unterschiedlichen Rejektionstypen zeigten sich bei akuten Antikörpervermittelten Rejektionen im Median noch höhere Werte (2,9%), bei höhergradiger T-Zell-vermittelte Rejektion auch noch deutlich erhöhte gcfDNA-Werte (1,2%), wohingegen die leichteren T-Zell-vermittelten Rejektionen im Sinne einer BANFF-Borderline-Rejektion gcfDNA-Werte im Bereich der Nicht-Abstoßungsproben zeigten (0,2%). Unter Verwendung von 1% gcfDNA als Cut-off ergab sich eine Sensitivität von 59% und eine Spezifität von 85% hinsichtlich der Detektion jeglicher Rejektion (Positiver Prädiktiver Wert 61%, Negativer Prädiktiver Wert 85%). Bei isolierter Betrachtung der Antikörper-vermittelten Rejektionen ergab sich eine bessere Genauigkeit (AUC 0,84, Sensitivität 81%, Spezifität 83%, Positiver Prädiktiver Wert 44%, Negativer Prädiktiver Wert 96%).

Eine retrospektive Untersuchung von 63 Nierentransplantierten Patienten mit einem hohen Anteil an nachgewiesenen Donorspezifischen Antikörpern (DSA; 43% aller untersuchten Patienten), die eine Indikationsbiopsie erhielten, konnte bei 34 Patienten (54%) eine akute Rejektion nachweisen. In 10 Fällen war diese T-Zell-vermittelt, in 24 Fällen Antikörpervermittelt, inklusive 2 Biopsien mit T-Zell- und Antikörpervermittelter Rejektion. Es ergaben sich mediane gcfDNA-Fraktionen von 1,35% bei Antikörpervermittelten Rejektionen, 0,27% bei isolierter T-Zell-vermittelter Rejektion und 0,38% ohne Nachweis einer Rejektion. Die Daten in dieser Studie zeigten bei 8 von 29 Patienten ohne Abstoßung gcfDNA-Fraktionen über 1% und 7 der 10 nachgewiesenen T-Zell-vermittelten Rejektionen zeigten gcfDNA-Fraktionen unter 0,35%. Auch konnte im Vergleich sowohl der gcfDNA-Level bei den DSA-positiven/Akute Antikörper-vermittelte Rejektion (17) mit den DSA-positiven/fehlender

Antikörpervermittelte Rejektion Fällen (9) als auch mit den DSA-negativen/akuter Antikörpervermittelter Rejektion (7) kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (Huang et al., 2019). Die AUC für die Detektion jeglicher akuter Rejektion war 0,74; der optimale Cut-off für die gcfDNA 0,74% (Sensitivität 79,4%, Spezifität 72,4%, Positiver Prädiktiver Wert 77%, Negativer Prädiktiver Wert von 75%). Wie auch in der DART-Studie war die AUC für die akute Antikörpervermittelte Rejektion mit 0,84 besser als bei jeglicher akuter Rejektion (Sensitivität 100%, Negativer Prädiktiver Wert 100% bei 0,74% Cut-Off).

Ebenfalls mittels NGS (verwendeter Assay: Prospera, Natera, Inc., San Carlos CA), wurden retrospektiv 193 nierentransplantierte Patienten untersucht, bei denen insgesamt 217 Transplantatbiopsien durchgeführt wurden (103 Indikationsbiopsien, 114 Protokollbiopsien). Es fanden sich insgesamt 38 akute Rejektionen (13 aus Protokollbiopsien), 72 BANFF-Borderline-Rejektionen (33 aus Protokollbiopsien), 25 andere Transplantatfunktionsstörungen und 82 stabile Transplantate. In der Gruppe mit akuten Rejektionen (alle Typen) zeigte sich eine mediane gcfDNA von 2,3%. Diese war signifikant höher ($p < 0,0001$) als bei BANFF-Borderline-Rejektionen (mediane gcfDNA von 0,58%;), anderen Transplantatfunktionsstörungen (mediane gcfDNA 0,67%) oder stabilen Transplantaten (mediane gcfDNA 0,40%). Die AUC für akute Rejektionen war 0,87. Bei einem 1% Cut-off ergab sich eine Sensitivität von 89%, eine Spezifität von 73%. Nach Analyse der Subgruppe, wo lediglich Protokollbiopsien durchgeführt wurden war die Sensitivität 92%, die Spezifität 78% und die AUC 0,89. In dieser Studie zeigte sich keine Unterschiede zwischen akuter Antikörper-vermittelter Rejektionen, akuten T-Zell-vermittelten Rejektionen und gemischt T-Zell- und Antikörpervermittelten Rejektionen. 27% aller stabilen Biopsien und 40% aller Biopsien mit anderer Transplantatfunktionsstörungen hatten gcfDNA-Werte oberhalb des Cut-offs von 1%, ebenso wie 28% aller nachgewiesenen BANFF-Borderline-Rejektionen und 87% aller akuten Rejektionen. Unterschiede hinsichtlich der Form der Organspende (Lebendspende vs. Verstorbemenspende) konnten nicht erhoben werden (Sigdel et al., 2018).

In einer prospektiven Beobachtungsstudie wurden 18 DSA-positive Patienten mit nachgewiesener Antikörpervermittelter Rejektion (11 akute Antikörpervermittelte Rejektionen, 7 chronische Antikörpervermittelte Rejektionen) mit 15 Patienten ohne antikörpervermittelte Rejektion (7 DSA-positiv, 8 DSA-negativ) hinsichtlich der gcfDNA-Werte verglichen. Es wurde ein NGS-Assay verwendet. In der Gruppe mit

Rejektionen war die mediane gcfDNA-Fraktion bei 2,4%, in der stabilen Gruppe bei 0,65% ($p < 0,001$), wobei sich bei Vergleich der Gruppe mit Rejektionen mit der DSA-positiven/Rejektions-negativen Gruppe (mediane gcfDNA 1,09%) kein signifikanter Unterschied ergab ($p = 0,074$). Die AUC für Antikörper-vermittelte Rejektion war 0,9, bereinigt für DSA-positive Patienten bei 0,74. Unter Verwendung eines Cut-Off von 1% war die Sensitivität bei 89%, die Spezifität bei 74%, der Positive Prädiktive Wert bei 74%, der Negative Prädiktive Wert bei 88% (Zhang et al., 2020).

4.2.3 Infektiologische Ereignisse

Neben Rejektionen sind Infektionen häufige Ursache für eine Verschlechterung der Transplantatnierenfunktion (Fishman, 2007).

In der hier untersuchten Kohorte wurde bei über 60% der Patienten mindestens ein infektiologisches Ereignis dokumentiert. Im Vergleich zur stabilen Phase (gcfDNA-Median 24,88cp/ml) wurden bei Vorhandensein von jeglicher Infektion signifikant höhere gcfDNA-Werte dokumentiert (Median 30,61cp/ml; $p = 0,0007476$ im Wilcoxon-Rangsummentest). Eine Unterscheidung hinsichtlich der Art der Infektion (bakteriell, viral, Harnwegsinfektion, BK-Virämie) ist hierbei nicht erfolgt.

Eine nach Nierentransplantation besonders gefürchtete infektiologische Komplikation ist die Polyomavirämie, die meist asymptomatisch verläuft, aber im Rahmen einer Polyomanephropathie das Transplantat relevant schädigen kann (Bressollette-Bodin et al., 2005). Bei knapp 20% der untersuchten Patienten fand sich mindestens eine Episode mit Polyomavirämie. Im Vergleich zur stabilen Phase (gcfDNA-Median 24,88cp/ml) fand sich hier kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der gcfDNA-Freisetzung (gcfDNA-Median bei BK-Virämie 24,53cp/ml; $p = 0,6344$ im Wilcoxon-Rangsummentest).

Auch in bereits publizierten Studien wurden teilweise infektiologische Ereignisse betrachtet, wie zum Beispiel in den bereits erwähnten Studien von Garcia Moreira et.al., Sigdel et.al., Zhong et.al..

Weitere Daten diesbezüglich finden sich in der prospektiven Beobachtungsstudie von Gielis et.al.. Es wurden mittels NGS 107 Patienten untersucht. Es wurden 792 Laborproben gesammelt. Hierbei fanden sich bei 13% der Proben gcfDNA-Werte oberhalb des vorab festgelegten Cut-offs von 0,88%. Im Beobachtungszeitraum wurden bei 43 Patienten Protokollbiopsien durchgeführt mit jeweils simultaner Messung der gcfDNA im Plasma. Signifikant erhöhte gcfDNA-Werte zeigten eine akute

Rejektion, Pyelonephritis oder Akute Tubulusnekrose an. Allerdings waren 82% aller erhöhten gcfDNA-Level nicht mit einem dieser drei Ereignisse erklärbar. Nur 9 der 24 Patienten mit nachgewiesener akuter Rejektion hatte erhöhte gcfDNA-Level. Einzig bei gemischten Antikörper- und T-Zell-vermittelten Rejektionen zeigten sich jeweils deutlich über dem cut-off erhöhte Werte (4 Ereignisse, median gcfDNA 6,97%; 1,435%-32,44%). Die medianen gcfDNA-Fraktionen bei BANFF IIA T-Zell-vermittelten Rejektionen (4 Ereignisse, mediane gcfDNA 0,42%; 0,29%-1,19%), unbehandelter BANFF-Borderline-Rejektion (9 Ereignisse, mediane gcfDNA 0,55%, 0,27%-1,54%) und behandelter BANFF-Borderline-Rejektion (mediane gcfDNA 0,48%, 0,46%-0,56%) zeigten jedoch keine relevant erhöhten gcfDNA-Werte. Die AUC für den Nachweis von akuten Rejektionen war 0,64 (nicht besser als das Serumkreatinin) mit einer Sensitivität von 38% und einer Spezifität von 85% (Gielis et al., 2019).

Eine Studie, die 28 Patienten nach Nierentransplantation mittels ddPCR untersuchte konnte keinen signifikanten Unterschied in den gcfDNA-Leveln von stabilen Patienten, Patienten mit akuter Rejektion, akuter Tubulusnekrose oder anderen Transplantatläsionen feststellen (Lee et al., 2017).

4.2.4 Wertung akute Freisetzung von gcfDNA

Die Rolle der gcfDNA zur Einordnung von Akutereignissen nach Nierentransplantation ist noch nicht eindeutig geklärt.

In der hier untersuchten Kohorte gab es eine Korrelation von erhöhten gcfDNA-Werten mit akuter Schädigung im Transplantat. Eine Differenzierung anhand unterschiedlich erhöhter gcfDNA-Level hinsichtlich immunologischer Ursachen wie Rejektionen oder anderer Gründe für eine Funktionsverschlechterung des Transplantats wie Infektionen gelang jedoch nicht. Somit ergibt sich als klinischer Nutzen die bessere Indikationsstellung zur Transplantatnierenbiopsie: gcfDNA-Werte im Bereich der stabilen Phase machen keine Biopsie notwendig, wohingegen Werte über dem Cut-Off die Indikation zur Durchführung einer Biopsie verstärken können.

In den meisten der veröffentlichten Studien – allen voran die DART-Studie (Bloom et al., 2017) und die Studie von Sigdel (Sigdel et al., 2018) – zeigt sich ein ähnliches Verhalten des Biomarkers. Ein Anstieg der gcfDNA über das Basislevel zeigt eine akute Schädigung im Transplantat an. Insbesondere durch die Sigdel-Studie, kann die Arbeitshypothese der gcfDNA als Maß der Transplantatgesundheit mit Ausschluß von Rejektionen bei negativen Testergebnissen untermauert werden.

Neben vielen hierfür positiven Studien gab es aber auch die Untersuchungen von Gielis (Gielis et al., 2019) und Lee (Lee et al., 2017), wo sich kein Benefit des Routine-Monitorings für gcfDNA zur Entdeckung subklinischer akuter Rejektionen zeigte (Gielis) bzw. keine signifikanten Unterschiede in den gcfDNA-Leveln von stabilen Patienten, Patienten mit akuter Rejektion, akuter Tubulusnekrose oder anderen Transplantatläsionen feststellen ließen (Lee).

Hinsichtlich des Monitorings der Transplantatgesundheit wurde kürzlich eine Studie publiziert mit einem interessanten Untersuchungsansatz publiziert (Stites et al., 2020). Mittels NGS (Allosure-Assay) wurde eine Kohorte mit insgesamt 79 Patienten untersucht, bei denen entweder eine akute T-Zell-vermittelte Rejektion BANFF Typ IA (52 Patienten) oder eine T-Zell-vermittelte Rejektion BANFF Borderline (27 Patienten) mittels Indikations- oder Protokollbiopsie nachgewiesen wurde. Vor Durchführung der Biopsie hatten alle Patienten im Median eine gcfDNA-Fraktion von 0,19% (kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen). In der Kohorte wurden Cut-Offs von 0,5%, 0,75% und 1,0% hinsichtlich der Unterscheidbarkeit der beiden Gruppen entsprechend der Präbiopsie-gcfDNA-Werte untersucht. Die beste Differenzierung gelang mit dem Cut-Off von 0,5%. Es fanden sich 42 Fälle, die eine gcfDNA-Fraktion von größer oder gleich 0,5% hatten und 37 Fälle mit einer gcfDNA-Fraktion unter 0,5%. In der Gruppe mit gcfDNA-Werten oberhalb des Cutoffs zeigte sich ein höherer eGFR-Verlust ((8,5% vs. 0%; $p=0,004$), es entwickelten sich deutlich mehr DSAs (40% vs. 3%; $p<0,0001$) und es traten häufiger akute Rejektionen auf (21% vs. 0%; $p=0,003$).

Insgesamt ergibt sich durch die Messung der gcfDNA die Möglichkeit eines nicht-invasiven Monitorings der Transplantatgesundheit mit möglicherweise früherzeitiger Erkennung von akuten Schäden im Transplantat. Insbesondere durch die Korrelation von gcfDNA-Werten im Baseline-Bereich mit dem Fehlen von akutem Transplantatschaden in den meisten der diskutierten Studien ergibt sich die Möglichkeit schnell und nicht-invasiv einen akuten Schaden im Transplantat auszuschließen. Dies zeigt sich in der hohen Sensitivität (97%) und dem hohen negativen prädiktiven Wert (92%) der gcfDNA zur Detektion von akuten Rejektionen bei gepoolten Daten publizierter Studien bei nierentransplantierten Patienten (Dauber et al., 2020b, Sigdel et al., 2018, Whitlam et al., 2019, Gielis et al., 2020, Huang et al., 2019, Bloom et al., 2017, Oellerich et al., 2019). Die Spezifität (76%) war ebenso wie

der positive prädiktive Wert (42%) unspezifisch bei einer durchschnittlichen AUC von 0,81.

Die Wertigkeit von erhöhten gcfDNA-Leveln kann aktuell noch endgültig eingeordnet werden. Sie zeigen in den meisten vorhandenen Studien einen akuten Schaden am Transplantat an, der jedoch nicht genauer differenziert werden kann. Somit ist der von vielen Studiengruppen angedachte Wert der gcfDNA als „Liquid Biopsy“ bisher nicht erfüllt. Durch die fehlende Unterscheidung der Art des Transplantatschadens ergeben sich möglicherweise aus erhöhten gcfDNA-Leveln unnötige Biopsien mit allen hieraus resultierenden Kosten und Risiken. Auf der anderen Seite liegt mit der gcfDNA ein alltagstauglicher Biomarker vor, der auf nichtinvasivem Weg wichtige Informationen zur Transplantatgesundheit vermitteln kann, insbesondere hinsichtlich subklinischer Transplantatschäden und erhöhter inflammatorischer Aktivität als möglichem Indikator für eine Unterimmunsuppression.

Durch die Stites-Studie ergeben sich zudem Hinweise, dass nicht nur ein akuter Anstieg im Vergleich zum Baseline-Wert der gcfDNA, sondern auch das individuelle Niveau des eigentlichen Baseline-gcfDNA-Level wichtig für das Monitoring der Transplantatnierenfunktion ist.

4.3 Meßmethode zur Quantifizierung von gcfDNA

Es gibt unterschiedliche Methoden zur Bestimmung der gcfDNA, mit denen die ursprünglich sehr aufwendigen diagnostischen Ansätze, die eine Vorabbestimmung von Spender- und Empfänger genom oder aber Geschlechtsunterschiede zwischen Spender und Empfänger voraussetzten, deutlich alltagstauglicher werden (Snyder et al., 2011, Lo et al., 1998).

Gemeinsamer Schnittpunkt aller verfügbarer Methoden ist die Verwendung von Polymerase-Kettenreaktionen (Polymerase Chain Reaction = PCR). Hierbei kommen real-time quantitative PCR (qPCR), droplet digital PCR (ddPCR) oder massives Parallel Sequencing (MPS). Letzteres wird auch als Next-Generation Sequencing (NGS) bezeichnet.

4.3.1 Next-Generation Sequencing

Next-Generation Sequencing (NGS) kann über unterschiedliche Methoden der klonalen Amplifikation die parallele Sequenzierung von Millionen kleiner DNA-Fragmente etablieren. Somit kann hierüber das gesamte Spektrum von Genomvariationen durch die schnelle Gewinnung von großen Datenmengen dargestellt werden. Limitationen der Methode sind die aktuell noch aufwendige Analyse und die hohe Anforderung an die Interpretation der großen Datenmengen. Außerdem können Trinukleotid-Repeats oft nicht zuverlässig erfasst werden (Rosenau, 2019).

Die in Studien zur Evaluation der gcfDNA verwendeten NGS-Assays enthalten spezialisierte Panelanalysen, die über MAF (minor allelic frequency), polymerase error rate, Heterozygotie, Linkage Dysäquilibrium (= nicht-zufällsmäßige Assoziation von Allelen an verschiedenen Orten des Genoms in einer Population (Grady et al., 2011)) und Fixationsindex, SNPs identifizieren können, die die Identifikation Unterscheidung von Spender- und Empfänger-DNA ermöglichen (Dengu, 2020).

4.3.2 Droplet-digital PCR

Bei der droplet-digital PCR werden – ähnlich wie beim NGS – durch etablierte Modelle zur Berechnung von Ausschlußwahrscheinlichkeiten geeignete SNPs zur Unterscheidung zwischen Spender- und Empfänger genom vorselektiert.

Die Amplifikation der im Rahmen der SNP-Vergleiche festgelegten Ziel-DNA findet nach Separation von DNA-Molekülen in Tröpfchen, die in einer Wasser-Öl-Emulsion gebildet werden, statt. Die vervielfältigten DNA-Fragmente werden am Ende der Amplifikation mittels Fluoreszenz sichtbar gemacht. So kann die Menge an DNA, die vom Spenderorgan in die Blutbahn des Empfängers freigesetzt wird, berechnet werden und als Biomarker für Organintaktheit verwendet werden.

Vorteile sind die verhältnismäßig kurze Untersuchungsdauer und die Kosteneffektivität (Beck et al., 2013a).

4.3.3 INDEL qPCR

Die INDEL qPCR nutzt Insertion/Deletions-Polymorphismen (= INDEL-Polymorphismen) zur Unterscheidung zwischen Spender- und Empfänger genom. Durch ein Screening mittels multiplex PCR unter Verwendung eines Panels für verschiedene INDEL-Marker, die jeweils nur bei Spender oder Empfänger vorhanden sein sollten, können geeignete Marker erhoben werden. Die Amplifikation der Ziel-DNA erfolgt dann mit qPCR. Vorteile sind die Kosteneffektivität sowie die verhältnismäßig kurze Untersuchungsdauer sowie die Einfachheit der Methode. (Dauber et al., 2020a).

4.3.4 Einordnung Messmethoden

In einem In-Vitro-gcfDNA-Ansatz haben NGS und ddPCR deutliche Vorteile in der Sensitivität bezüglich Entdeckung von Tumormutationen gegenüber der Verwendung der reinen qPCR gezeigt (Bartels et al., 2017).

Es gibt zur Zeit noch keinen standardisierten Assay für die Transplantationsmedizin, in der definierte SNPs verwendet werden. Die Anzahl der Ziel-SNPs in den im Rahmen der publizierten Studien verwendeten Assays variiert tatsächlich deutlich. Bei den NGS-Assays sind dies 266 bis zu 70000 Ziel-SNPs, bei den ddPCR-Assays zwischen 34 und 41 Ziel-SNPs (Filippone and Farber, 2020).

Innerhalb unterschiedlicher NGS-Assays scheint es keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Testeigenschaften zu geben, die Untersuchungszeit zeigte sich jedoch in einer Vergleichsstudie zwischen kommerziell erhältlichen NGS-Assays (Allosure, CareDx, Brisbane CA und Prospera, Natera Inc. San Carlos CA) heterogen (Melancon, 2020).

Bei Betrachtung der DART-Studie und der Studie von Huang et.al. zeigt sich, dass niedrige gcfDNA-Fractionen unter 1% im Allosure-Assay keine akute T-Zell-Vermittelte Rejektion ausschließen können (Filippone and Farber, 2020). Diese falsch-negativen TCMR-Ergebnisse scheinen mit der größeren Amplicon-Größe (100-130bp) des in der DART-Studie und bei Huang et. al verwendeten Assays zusammenzuhängen und der somit schlechteren Detektion von kleinen DNA-Fragmenten. Dies konnte in einer kürzlich publizierten Studie bestätigt werden (Dauber et al., 2020b). So konnten in Studien, die passendere Assays verwendeten, TCMR mit ausreichender Sensitivität erkannt werden (Sigdel et al., 2018, Oellerich et al., 2019).

In der Zusammenschau ergeben sich keine eindeutigen Hinweise für Vorteile einer der drei etablierten Meßmethoden für gcfDNA, allerdings gibt es bisher keine publizierten Daten zum direkten Vergleich der unterschiedlichen Meßmethoden. Es existiert lediglich eine Studie, die zwei Assays bei NGS vergleicht. Hier zeigten sich insbesondere zeitliche Unterschiede für den Untersuchungsablauf, was im klinischen Alltag potentiell sehr relevant ist.

Für die Sensitivität, insbesondere hinsichtlich der Detektion von kleinen gcfDNA-Fragmenten, scheint die Amplicon-Größe des verwendeten Assays eine Rolle zu spielen.

Hier sind weitere Studien dringend notwendig, insbesondere auch, um die bisher publizierten Studien, die teils diskrepante Ergebnisse zeigten, besser im Kontext der verwendeten Untersuchungsmethode einordnen zu können und damit eine besser Aussage zur klinischen Relevanz der gcfDNA treffen zu können.

4.4 Absolute und fraktionelle GcfDNA-Werte

Es ist aktuell unklar, welche Darstellung der gcfDNA-Level den besseren diagnostischen Wert hat. Neben der Angabe der fraktionellen gcfDNA-Level ist alternativ auch die Berechnung und Darstellung der absoluten gcfDNA-Level mit Anzahl der Kopien gcfDNA/ml Plasma möglich.

Vorteile der absoluten Werte sind insbesondere die Unabhängigkeit von Ereignissen, die die Gesamtlevel an zellfreier DNA im Empfänger verändern, wie zum Beispiel Sepsis, körperliche Aktivität, Inflammation oder auch Tumorerkrankungen.

Eine prospektive Studie untersuchte 55 nierentransplantierte Patienten. Hiervon hatten 22 eine nachgewiesene akute Rejektion (6 BANFF-Borderline-Rejektionen, 3 Akute T-Zell-vermittelte Rejektionen, 10 Akute Antikörpervermittelte Rejektionen, 3 chronische Antikörpervermittelte Rejektionen). Die AUC für die Detektion einer akuten Antikörpervermittelten Rejektion war 0,92 bei Verwendung von absoluten Werten und 0,85 bei Verwendung der gcfDNA-Fraktion. Für die Detektion aller Rejektion war die AUC 0,91 für die Verwendung der absoluten Werte und 0,89 für die Verwendung der gcf-DNA-Fraktion. Es wurden Grenzwerte für die Diagnostik der akuten Antikörpervermittelten Rejektion von 21 cp/ml und 0,75% (Sensitivität 90% und 80%, Spezifität 88% und 71%, Positiver Prädiktiver Wert 60% und 35%, Negativer Prädiktiver Wert 98% und 95%) vorgeschlagen. Für die Diagnostik aller akuten Rejektion wurde entsprechend ein Wert von 13 cp/ml und 0,75% vorgeschlagen (positiver Prädiktiver Wert 52% und 48%, Negativer Prädiktiver Wert 95% für beide Meßarten). Diagnosen, die falsch positive Ergebnisse oberhalb des Grenzwertes für die akute Antikörpervermittelte Rejektion zeigten, waren Diabetische Nephropathie (21 cp/ml, 2,4%), milde chronische Inflammation (47cp/ml, 2,4%), BK-Nephropathie (1,5%) und zwei Fälle von Calcineurininhibitortoxizität (0,9% und 0,9%) (Whitlam et al., 2019).

Die hier betrachtete Kohorte wurde in einer separaten Auswertung mit anderen Beobachtungszeitpunkten hinsichtlich des Einflusses der gesamten zellfreien DNA im Empfängerorganismus als potentieller Störfaktor für die Ermittlung der gcfDNA-Fraktion untersucht. Es wurden insgesamt 929 Plasmaproben von 303 klinisch stabilen nierentransplantierten Patienten 12-60 Monate nach der Transplantation ausgewertet. Zu jedem Beobachtungszeitpunkt wurden jeweils die gesamte zellfreie DNA (cp/ml), die absolute gcfDNA (cp/ml) und die fraktionelle gcfDNA (%) als Anteil an der gesamten zellfreien DNA unter Verwendung von droplet-digital PCR bestimmt. Es

zeigte sich ein signifikanter Abfall der gesamten zellfreien DNA im zeitlichen Verlauf. Hieraus ergab sich eine signifikant steigende gcfDNA-Fraktion im gleichen Zeitraum bei parallel stabilen absoluten Werten für die gcfDNA. Nach 5 Jahren zeigten sich die medianen Werte an gesamter zellfreier DNA bei nierentransplantierten Patienten signifikant höher als bei gesunden Kontrollen und auch bei signifikant höher als bei anders erkrankten Patienten (Schütz et al., 2020). Der zeitabhängige Abfall der gesamten zellfreien DNA im Verlauf nach Nierentransplantation zeigte damit eine falsch hohe gcfDNA-Fraktion an.

Zur Vermeidung von falsch-positiven gcfDNA-Werten scheint somit die Verwendung der absoluten gcfDNA-Level – wie in der hier untersuchten Kohorte bereits angewendet – sinnvoller.

In der Zusammenschau kann aufgrund der aktuellen Studienlage mit zum einen der besseren Performance in der Detektion von Rejektionen bei Whitlam et.al. und zum anderen der Vermeidung von falsch-positiven Werten bei Verwendung von absoluten gcfDNA-Werten bei Schütz et.al. ein deutlicher Vorteil für die Anwendung von absoluten im Vergleich zu fraktionellen gcfDNA-Werten beim Monitoring der Nierentransplantatgesundheit postuliert werden.

4.5 Schlußfolgerung

Hinsichtlich der Beurteilung der Bedeutung der Analytik zellfreier DNA aus Nierentransplantaten in den ersten 12 Monaten nach Nierentransplantation können mit unserer Studie einige Erkenntnisse gewonnen werden.

Die gcfDNA-Kinetik unmittelbar nach Transplantation zeigt initial hohe Werte, die sich im zeitlichen Verlauf von etwa 8 Tagen auf ein Baseline-Niveau stabilisieren. Dies korreliert gut mit dem durch das Grafting verursachten Ischämie-Reperfusionsschaden. Die höheren Werte bei Verstorbenenorganspenden im Vergleich zu Lebendspenden suggerieren einen quantitativen Zusammenhang zwischen Ischämie-Reperfusionsschaden und Menge der freigesetzten gcfDNA. Der Trend zu höheren Werten der gcfDNA bei AB0-inkompatiblen Transplantationen und Empfängern mit hohem immunologischem Risiko gibt Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen erhöhter immunologischer Aktivität bzw. erhöhter Inflammation und der Freisetzung von gcfDNA – möglicherweise als Zeichen einer unzureichenden Immunsuppression, ohne dass hier statistisch signifikante Ergebnisse erzielt werden konnten.

In der hier untersuchten Kohorte gab es eine Korrelation von erhöhten gcfDNA-Werten mit akuter Schädigung im Transplantat. Eine Differenzierung anhand unterschiedlich erhöhter gcfDNA-Level hinsichtlich immunologischer Ursachen wie Rejektionen oder anderer Gründe für eine Funktionsverschlechterung des Transplantats wie Infektionen gelang jedoch nicht. Somit ergibt sich als klinischer Nutzen die bessere Indikationsstellung zur Transplantatnierenbiopsie: gcfDNA-Werte im Bereich der stabilen Phase machen keine Biopsie notwendig, wohingegen Werte über dem Cut-Off die Indikation zur Durchführung einer Biopsie verstärken können.

Insgesamt ergibt sich durch die Messung der gcfDNA die Möglichkeit eines nicht-invasiven Monitorings der Transplantatgesundheit mit möglicherweise frühzeitigem Erkennen von akuten Schäden im Transplantat. Insbesondere durch die Korrelation von gcfDNA-Werten im Baseline-Bereich mit dem Fehlen von akutem Transplantatschaden in unserer wie auch in den meisten der diskutierten Studien ergibt sich die Möglichkeit schnell und nicht-invasiv einen akuten Schaden im Transplantat auszuschließen.

Hinsichtlich der Beurteilung von subklinischen Transplantatschäden und erhöhter inflammatorischer Aktivität als möglichem Indikator für eine Unterimmunsuppression konnten keine statistisch signifikanten Ergebnisse erhoben werden, es ergeben sich

jedoch in unserer Studie wie auch in anderen Studien Hinweise in diese Richtung, die die Durchführung weiterer Studien interessant machen.

Die in unserer Studie verwendete Messmethode der digital droplet PCR hat – soweit ohne eindeutige Vergleichsstudien erhebbar – keine relevanten Nachteile gegenüber den anderen beiden zur Messung der gcfDNA etablierten Methoden. Insbesondere in der Detektion kleinerer DNA-Fragmente, wie sie typischerweise bei subklinischen TCMR auftreten haben die in der ddPCR verwendeten Assays deutliche Vorteile gegenüber den etablierten NGS-Assays.

Hier sind weitere Studien dringend notwendig, insbesondere auch, um die bisher publizierten Studien, die teils diskrepante Ergebnisse zeigten, besser im Kontext der verwendeten Untersuchungsmethode einordnen zu können und damit eine bessere Aussage zur klinischen Relevanz der gcfDNA treffen zu können.

Die Messung der gcfDNA ist sowohl als Fraktion der gesamten zellfreien DNA, als auch als absolute Kopienzahl messbar. In den bisher verwendeten Studien wurde meist Fraktionen gemessen. Bessere Performance zur Detektion von Rejektionen und falsch-positive gcfDNA-Werte bei Anwendung der fraktionellen Werte durch sinkende gesamte zellfreie DNA im Empfänger geben deutliche Hinweise zugunsten der Verwendung der absoluten gcfDNA-Werte.

Insgesamt bleibt die gcfDNA weiterhin ein vielversprechender Biomarker zum Monitoring der Transplantatgesundheit. Auch wenn sich die Hoffnungen als Verwendung des Biomarkers im Sinne einer „Liquid Biopsy“ sowohl in unserer Studie, als auch in anderen Arbeiten, nicht bestätigt hat, so können anhand der aktuellen Datenlage wichtige zusätzliche Informationen zu den etablierten Methoden zum Monitoring der Transplantatnierenfunktion gewonnen werden.

5 Zusammenfassung

In dieser monozentrischen prospektiven Kohortenstudie wurde über einen Beobachtungszeitraum von 12 Monaten bei 189 Patienten das Verhalten von zellfreier DNA aus Nierentransplantaten untersucht. Es wurde die Kinetik unmittelbar nach Transplantation sowie der Einfluss verschiedener patientenseitiger Aspekte wie Art der Organspende und das immunologische Risiko erfasst. Außerdem wurde der Einfluss von Akutereignissen im Beobachtungszeitraum wie Verschlechterung der Transplantatnierenfunktion, Rejektionen und Infektionen auf die Level der donorspezifischen zellfreien DNA betrachtet.

In der untersuchten Kohorte erhielten 62% das Organ im Rahmen einer Verstorbenenorganspende, 32% durch Lebendspende, wovon 34% AB0-inkompatibel transplantiert wurden. Die immunsuppressive Therapie wurde bei 74% der Patienten mit dem IL2-Antagonisten Basiliximab induziert, bei 14% mit ATG. Im Rahmen der AB0-inkompatiblen Transplantationen wurde zusätzlich Rituximab appliziert. So erhielten 11% des Kollektivs Rituximab und Basiliximab und 1% der Patienten Rituximab und ATG. Die Erhaltungstherapie bestand in der Regel aus einer Tripletherapie mit Tacrolimus, Mycophenolsäure und Prednisolon.

In den Ergebnissen zeigte sich eine Ausscheidungskinetik der donorspezifischen zellfreien DNA mit kontinuierlichem Abfall nach Transplantation und Stabilisierung auf ein Basislevel um den 8. Postoperativen Tag. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Lebend- und Verstorbenennierentransplantationen mit niedrigeren Werten der gcfDNA bei Lebendtransplantationen, was eine Assoziation mit der Kinetik des Biomarkers mit dem Ischämie-Reperfusionsschaden nach Transplantation nahelegt. Eine signifikante Assoziation zwischen erhöhtem immunologischem Risiko und vermehrter Freisetzung von donorspezifischer zellfreier DNA gelang nicht.

Hinsichtlich der Akutereignisse zeigte sich ein signifikanter Anstieg der donorspezifischen zellfreien DNA bei akuter Verschlechterung der Transplantatnierenfunktion. Eine Unterscheidung hinsichtlich Ursache der Funktionsverschlechterung anhand der Level an donorspezifischer DNA gelang nicht. Als klinischer Nutzen ergibt sich eine Möglichkeit des nicht-invasiven Monitorings der Transplantatgesundheit mit frühem Erkennen von akuten Schäden mit Transplantat sowie besserer Indikationsstellung zur Durchführung einer Transplantatnierenbiopsie:

zellfreie DNA-Level über dem Cut-Off können die Dringlichkeit zur Biopsie verstärken wohingegen bei Werten unterhalb des Cut-Offs auf die Biopsie verzichtet werden kann. Die digital droplet PCR als in unserer Studie verwendete Messmethode für zellfreie DNA kann die zellfreie DNA sicher messen und scheint gegenüber den etablierten Assays bei Next Generation Sequencing Vorteile bei der Detektion von kleinen DNA-Fragmenten zu haben. Mangels Vergleichsstudien zu den vorhandenen Messverfahren kann hierüber jedoch aktuell keine endgültige Aussage erfolgen. Die hier für die Auswertung verwendete Ausgabe der donorspezifischen zellfreien DNA-Level als absolute Werte mittels Kopien pro ml Plasma zeigt sich entsprechend der aktuellen Datenlage vorteilhaft gegenüber der Verwendung des prozentualen Anteils an der gesamten zellfreien DNA, insbesondere hinsichtlich der fehlenden Bias durch Varianz an gesamter zellfreier DNA und besserer Performance bei der Abgrenzung von Rejektionen.

6 Literaturverzeichnis

Eurotransplant Reference Laboratory

Information about Virtual PRA Calculator [Online]. Available: <https://www.etr.org/InformationVPRA.aspx> [Accessed 25.10. 2020].

- ABOUNA, G. M., KUMAR, M. S., STEPHAN, R., PRIOR, J. E., LYONS, P., BULOVA, S. I. & ABDULLAH, I. H. 1993. Induction therapy with antithymocyte globulin reduces the incidence of allograft rejection and improves graft survival in cadaver renal transplantation. *Transplant Proc*, 25, 2241-2.
- ABU JAWDEH, B. G. & GOVIL, A. 2017. Acute Kidney Injury in Transplant Setting: Differential Diagnosis and Impact on Health and Health Care. *Adv Chronic Kidney Dis*, 24, 228-232.
- ALLISON, A. C. & EUGUI, E. M. 1996. Purine metabolism and immunosuppressive effects of mycophenolate mofetil (MMF). *Clin Transplant*, 10, 77-84.
- ALLISON, A. C. & EUGUI, E. M. 2000. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology*, 47, 85-118.
- ALLISON, A. C. & EUGUI, E. M. 2005. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection. *Transplantation*, 80, S181-90.
- ARYA, M., SHERGILL, I. S., WILLIAMSON, M., GOMMERSALL, L., ARYA, N. & PATEL, H. R. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn*, 5, 209-19.
- BACHLER, K., AMICO, P., HONGER, G., BIELMANN, D., HOPFER, H., MIHATSCH, M. J., STEIGER, J. & SCHAUB, S. 2010. Efficacy of induction therapy with ATG and intravenous immunoglobulins in patients with low-level donor-specific HLA-antibodies. *Am J Transplant*, 10, 1254-62.
- BARTELS, S., PERSING, S., HASEMEIER, B., SCHIPPER, E., KREIPE, H. & LEHMANN, U. 2017. Molecular Analysis of Circulating Cell-Free DNA from Lung Cancer Patients in Routine Laboratory Practice: A Cross-Platform Comparison of Three Different Molecular Methods for Mutation Detection. *J Mol Diagn*, 19, 722-732.
- BECK, J., BIERAU, S., BALZER, S., ANDAG, R., KANZOW, P., SCHMITZ, J., GAEDCKE, J., MOERER, O., SLOTTA, J. E., WALSON, P., KOLLMAR, O., OELLERICH, M. & SCHUTZ, E. 2013a. 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, 1732-41.
- BECK, J., BIERAU, S., BALZER, S., ANDAG, R., KANZOW, P., SCHMITZ, J., GAEDCKE, J., MOERER, O., SLOTTA, J. E., WALSON, P., KOLLMAR, O., OELLERICH, M. & SCHÜTZ, E. 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, 1732-41.
- BECK, J., OELLERICH, M., SCHULZ, U., SCHAUERTE, V., REINHARD, L., FUCHS, U., KNABBE, C., ZITTERMANN, A., OLBRIGHT, C., GUMMERT, J. F., SHIPKOVA, M., BIRSCHMANN, I., WIELAND, E. & SCHUTZ, E. 2015. Donor-Derived Cell-Free DNA Is a Novel Universal Biomarker for Allograft Rejection in Solid Organ Transplantation. *Transplant Proc*, 47, 2400-3.
- BECK, J., URNOVITZ, H. B., RIGGERT, J., CLERICI, M. & SCHUTZ, E. 2009. Profile of the circulating DNA in apparently healthy individuals. *Clin Chem*, 55, 730-8.
- BELLOMO, R., RONCO, C., KELLUM, J. A., MEHTA, R. L., PALEVSKY, P. & ACUTE DIALYSIS QUALITY INITIATIVE, W. 2004. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second

- International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care*, 8, R204-12.
- BIO-RAD. *QX100 Droplet Digital PCR System Brochure, Rev C* [Online]. Available: www.bio-rad.com [Accessed 11-19 2019].
- BLOOM, R. D., BROMBERG, J. S., POGGIO, E. D., BUNNAPRADIST, S., LANGONE, A. J., SOOD, P., MATAS, A. J., MEHTA, S., MANNON, R. B., SHARFUDDIN, A., FISCHBACH, B., NARAYANAN, M., JORDAN, S. C., COHEN, D., WEIR, M. R., HILLER, D., PRASAD, P., WOODWARD, R. N., GRSKOVIC, M., SNINSKY, J. J., YEE, J. P., BRENNAN, D. C. & CIRCULATING DONOR-DERIVED CELL-FREE, D. N. A. I. B. F. D. A. R. I. K. T. R. S. I. 2017. Cell-Free DNA and Active Rejection in Kidney Allografts. *J Am Soc Nephrol*, 28, 2221-2232.
- BRENNAN, D. C., DALLER, J. A., LAKE, K. D., CIBRIK, D., DEL CASTILLO, D. & THYMOGLOBULIN INDUCTION STUDY, G. 2006. Rabbit antithymocyte globulin versus basiliximab in renal transplantation. *N Engl J Med*, 355, 1967-77.
- BRESSOLLETTE-BODIN, C., COSTE-BUREL, M., HOURMANT, M., SEBILLE, V., ANDRE-GARNIER, E. & IMBERT-MARCILLE, B. M. 2005. A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal transplant recipients. *Am J Transplant*, 5, 1926-33.
- BROMBERG, J. S., BRENNAN, D. C., POGGIO, E., BUNNAPRADIST, S., LANGONE, A., SOOD, P., MATAS, A. J., MANNON, R. B., MEHTA, S., SHARFUDDIN, A., FISCHBACH, B., NARAYANAN, M., JORDAN, S. C., COHEN, D. J., ZAKY, Z. S., HILLER, D., WOODWARD, R. N., GRSKOVIC, M., SNINSKY, J. J., YEE, J. P., BLOOM, R. D. & INVESTIGATORS, F. T. C. D.-D. C.-F. D. I. B. F. D. A. R. I. K. T. R. S. 2019. Biological Variation of Donor-Derived Cell-Free DNA in Renal Transplant Recipients: Clinical Implications. *The Journal of Applied Laboratory Medicine*, 2, 309-321.
- BRUNET, M., SHIPKOVA, M., VAN GELDER, T., WIELAND, E., SOMMERER, C., BUDDÉ, K., HAUFROID, V., CHRISTIANS, U., LOPEZ-HOYOS, M., BARTEN, M. J., BERGAN, S., PICARD, N., MILLAN LOPEZ, O., MARQUET, P., HESSELINK, D. A., NOCETI, O., PAWINSKI, T., WALLEMACQ, P. & OELLERICH, M. 2016. Barcelona Consensus on Biomarker-Based Immunosuppressive Drugs Management in Solid Organ Transplantation. *Ther Drug Monit*, 38 Suppl 1, S1-20.
- BUSTIN, S. A., BENES, V., GARSON, J., HELLEMANS, J., HUGGETT, J., KUBISTA, M., MUELLER, R., NOLAN, T., PFAFFL, M. W., SHIPLEY, G., WITTEWER, C. T., SCHJERLING, P., DAY, P. J., ABREU, M., AGUADO, B., BEAULIEU, J. F., BECKERS, A., BOGAERT, S., BROWNE, J. A., CARRASCO-RAMIRO, F., CELEN, L., CIBOROWSKI, K., CORNILLIE, P., COULON, S., CUYPERS, A., DE BROUWER, S., DE CEUNINCK, L., DE CRAENE, J., DE NAEYER, H., DE SPIEGELAERE, W., DECKERS, K., DHEEDENE, A., DURINCK, K., FERREIRA-TEIXEIRA, M., FIEUW, A., GALLUP, J. M., GONZALO-FLORES, S., GOOSSENS, K., HEINDRYCKX, F., HERRING, E., HOENICKA, H., ICARDI, L., JAGGI, R., JAVAD, F., KARAMPELIAS, M., KIBENGE, F., KIBENGE, M., KUMPS, C., LAMBERTZ, I., LAMMENS, T., MARKEY, A., MESSIAEN, P., METS, E., MORAIS, S., MUDARRA-RUBIO, A., NAKIWALA, J., NELIS, H., OLSVIK, P. A., PEREZ-NOVO, C., PLUSQUIN, M., REMANS, T., RIHANI, A., RODRIGUES-SANTOS, P., RONDOU, P., SANDERS, R., SCHMIDT-BLEEK, K., SKOVGAARD, K., SMEETS, K., TABERA, L., TOEGEL, S., VAN ACKER, T., VAN DEN BROECK, W., VAN DER MEULEN, J., VAN GELE, M., VAN PEER, G., VAN POUCKE, M., VAN ROY, N., VERGULT, S., WAUMAN, J., TSHUIKINA-WIKLANDER, M., WILLEMS, E., ZACCARA, S., ZEKA, F. & VANDESOMPELE, J. 2013. The need for transparency and good practices in the qPCR literature. *Nat Methods*, 10, 1063-7.

- BUSTIN, S. A., BENES, V., GARSON, J. A., HELLEMANS, J., HUGGETT, J., KUBISTA, M., MUELLER, R., NOLAN, T., PFAFFL, M. W., SHIPLEY, G. L., VANDESOMPELE, J. & WITTEWER, C. T. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55, 611-22.
- CHOU, D. 1993. Therapeutic drug monitoring (immunosuppressive drugs). *Anal Chem*, 65, 412R-415R.
- CLESCA, P., DIRLANDO, M., PARK, S. I., GARCIA, R., FERRAZ, E., PINHEIRO-MACHADO, P. G., KUSHNAROFF, L., TEDESCO-SILVA, H., JR. & MEDINA-PESTANA, J. O. 2007. Thymoglobulin and rate of infectious complications after transplantation. *Transplant Proc*, 39, 463-4.
- DAUBER, E., KOLLMANN, D., KOZAKOWSKI, N., RASOUL-ROCKENSCHAUB, S., SOLIMAN, T., BERLAKOVICH, G. A. & MAYR, W. R. 2020a. Quantitative PCR of INDEls to measure donor-derived cell-free DNA—a potential method to detect acute rejection in kidney transplantation: a pilot study. *Transpl Int*, 33, 298-309.
- DAUBER, E. M., KOLLMANN, D., KOZAKOWSKI, N., RASOUL-ROCKENSCHAUB, S., SOLIMAN, T., BERLAKOVICH, G. A. & MAYR, W. R. 2020b. Quantitative PCR of INDEls to measure donor-derived cell-free DNA—a potential method to detect acute rejection in kidney transplantation: a pilot study. *Transpl Int*, 33, 298-309.
- DE VLAMINCK, I., VALANTINE, H. A., SNYDER, T. M., STREHL, C., COHEN, G., LUIKART, H., NEFF, N. F., OKAMOTO, J., BERNSTEIN, D., WEISSHAAR, D., QUAKE, S. R. & KHUSH, K. K. 2014. Circulating cell-free DNA enables noninvasive diagnosis of heart transplant rejection. *Sci Transl Med*, 6, 241ra77.
- DENGU, F. 2020. Next-generation sequencing methods to detect donor-derived cell-free DNA after transplantation. *Transplant Rev (Orlando)*, 34, 100542.
- DEWITTE, A., JOANNES-BOYAU, O., SIDOBRE, C., FLEUREAU, C., BATS, M. L., DERACHE, P., LEUILLET, S., RIPOCHE, J., COMBE, C. & OUATTARA, A. 2015. Kinetic eGFR and Novel AKI Biomarkers to Predict Renal Recovery. *Clin J Am Soc Nephrol*, 10, 1900-10.
- DIEHL, F., LI, M., HE, Y., KINZLER, K. W., VOGELSTEIN, B. & DRESSMAN, D. 2006. BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. *Nat Methods*, 3, 551-9.
- EKBERG, H., TEDESCO-SILVA, H., DEMIRBAS, A., VITKO, S., NASHAN, B., GURKAN, A., MARGREITER, R., HUGO, C., GRINYO, J. M., FREI, U., VANRENTERGHEN, Y., DALOZE, P., HALLORAN, P. F. & STUDY, E. L.-S. 2007. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med*, 357, 2562-75.
- FILIPPONE, E. J. & FARBER, J. L. 2020. The Monitoring of Donor-Derived Cell-Free DNA (ddcfDNA) in Kidney Transplantation. *Transplantation*.
- FISHMAN, J. A. 2007. Infection in renal transplant recipients. *Semin Nephrol*, 27, 445-61.
- FLOWER, R. J. 1988. Eleventh Gaddum memorial lecture. Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. *Br J Pharmacol*, 94, 987-1015.
- GADI, V. K., NELSON, J. L., BOESPFLUG, N. D., GUTHRIE, K. A. & KUHR, C. S. 2006. Soluble donor DNA concentrations in recipient serum correlate with pancreas-kidney rejection. *Clin Chem*, 52, 379-82.
- GARCIA MOREIRA, V., PRIETO GARCIA, B., BALTAR MARTIN, J. M., ORTEGA SUAREZ, F. & ALVAREZ, F. V. 2009. Cell-free DNA as a noninvasive acute rejection marker in renal transplantation. *Clin Chem*, 55, 1958-66.
- GENESTIER, L., FOURNEL, S., FLACHER, M., ASSOSSOU, O., REVILLARD, J. P. & BONNEFOY-BERARD, N. 1998. Induction of Fas (Apo-1, CD95)-mediated apoptosis of activated lymphocytes by polyclonal antithymocyte globulins. *Blood*, 91, 2360-8.

- GIELIS, E. M., BEIRNAERT, C., DENDOOVEN, A., MEYSMAN, P., LAUKENS, K., DE SCHRIJVER, J., VAN LAECKE, S., VAN BIESEN, W., EMONDS, M. P., DE WINTER, B. Y., BOSMANS, J. L., DEL FAVERO, J., ABRAMOWICZ, D. & LEDEGANCK, K. J. 2018. Plasma donor-derived cell-free DNA kinetics after kidney transplantation using a single tube multiplex PCR assay. *PLoS One*, 13.
- GIELIS, E. M., LEDEGANCK, K. J., DENDOOVEN, A., MEYSMAN, P., BEIRNAERT, C., LAUKENS, K., DE SCHRIJVER, J., VAN LAECKE, S., VAN BIESEN, W., EMONDS, M. P., DE WINTER, B. Y., BOSMANS, J. L., DEL FAVERO, J. & ABRAMOWICZ, D. 2019. The use of plasma donor-derived, cell-free DNA to monitor acute rejection after kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant*.
- GIELIS, E. M., LEDEGANCK, K. J., DENDOOVEN, A., MEYSMAN, P., BEIRNAERT, C., LAUKENS, K., DE SCHRIJVER, J., VAN LAECKE, S., VAN BIESEN, W., EMONDS, M. P., DE WINTER, B. Y., BOSMANS, J. L., DEL FAVERO, J. & ABRAMOWICZ, D. 2020. The use of plasma donor-derived, cell-free DNA to monitor acute rejection after kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant*, 35, 714-721.
- GRADY, B. J., TORSTENSON, E. S. & RITCHIE, M. D. 2011. The effects of linkage disequilibrium in large scale SNP datasets for MDR. *BioData Min*, 4, 11.
- GRSKOVIC, M., HILLER, D. J., EUBANK, L. A., SNINSKY, J. J., CHRISTOPHERSON, C., COLLINS, J. P., THOMPSON, K., SONG, M., WANG, Y. S., ROSS, D., NELLES, M. J., YEE, J. P., WILBER, J. C., CRESPO-LEIRO, M. G., SCOTT, S. L. & WOODWARD, R. N. 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.
- GUTTMANN, R. D., CAUDRELIER, P., ALBERICI, G. & TOURAINE, J. L. 1997. Pharmacokinetics, foreign protein immune response, cytokine release, and lymphocyte subsets in patients receiving thymoglobuline and immunosuppression. *Transplant Proc*, 29, 24S-26S.
- HAAS, M., SIS, B., RACUSEN, L. C., SOLEZ, K., GLOTZ, D., COLVIN, R. B., CASTRO, M. C., DAVID, D. S., DAVID-NETO, E., BAGNASCO, S. M., CENDALES, L. C., CORNELL, L. D., DEMETRIS, A. J., DRACHENBERG, C. B., FARVER, C. F., FARRIS, A. B., 3RD, GIBSON, I. W., KRAUS, E., LIAPIS, H., LOUPY, A., NICKELEIT, V., RANDHAWA, P., RODRIGUEZ, E. R., RUSH, D., SMITH, R. N., TAN, C. D., WALLACE, W. D., MENGEL, M. & BANFF MEETING REPORT WRITING, C. 2014. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant*, 14, 272-83.
- HALLORAN, P. F. 2004. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med*, 351, 2715-29.
- HAYES, J. J. & HANSEN, J. C. 2001. Nucleosomes and the chromatin fiber. *Curr Opin Genet Dev*, 11, 124-9.
- HEDAYAT, S., KERSHNER, R. P. & SU, G. 1996. Relationship of whole-blood FK506 concentrations to rejection and toxicity in liver and kidney transplants. *J Biopharm Stat*, 6, 411-24.
- HINDSON, B. J., NESS, K. D., MASQUELIER, D. A., BELGRADER, P., HEREDIA, N. J., MAKAREWICZ, A. J., BRIGHT, I. J., LUCERO, M. Y., HIDDESEN, A. L., LEGLER, T. C., KITANO, T. K., HODEL, M. R., PETERSEN, J. F., WYATT, P. W., STEENBLOCK, E. R., SHAH, P. H., BOUSSE, L. J., TROUP, C. B., MELLEN, J. C., WITTMANN, D. K., ERNDT, N. G., CAULEY, T. H., KOEHLER, R. T., SO, A. P., DUBE, S., ROSE, K. A., MONTESCLAROS, L., WANG, S., STUMBO, D. P., HODGES, S. P., ROMINE, S., MILANOVICH, F. P., WHITE, H. E., REGAN, J. F., KARLIN-NEUMANN, G. A., HINDSON, C. M., SAXONOV, S. & COLSTON, B. W. 2011. High-

- throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem*, 83, 8604-10.
- HO, S., CLIPSTONE, N., TIMMERMANN, L., NORTHROP, J., GRAEF, I., FIORENTINO, D., NOURSE, J. & CRABTREE, G. R. 1996. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol*, 80, S40-5.
- HOGAN, J. J., MOCANU, M. & BERNS, J. S. 2016. The Native Kidney Biopsy: Update and Evidence for Best Practice. *Clin J Am Soc Nephrol*, 11, 354-62.
- HUANG, E., SETHI, S., PENG, A., NAJJAR, R., MIROCHA, J., HAAS, M., VO, A. & JORDAN, S. C. 2019. Early clinical experience using donor-derived cell-free DNA to detect rejection in kidney transplant recipients. *Am J Transplant*, 19, 1663-1670.
- HUGGETT, J. F., FOY, C. A., BENES, V., EMSLIE, K., GARSON, J. A., HAYNES, R., HELLEMANS, J., KUBISTA, M., MUELLER, R. D., NOLAN, T., PFAFFL, M. W., SHIPLEY, G. L., VANDESOMPELE, J., WITWER, C. T. & BUSTIN, S. A. 2013. The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clin Chem*, 59, 892-902.
- JAMIESON, A. & TAYLOR, S. C. 1997. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Anim Genet*, 28, 397-400.
- JIANG, P. & LO, Y. M. D. 2016. The Long and Short of Circulating Cell-Free DNA and the Ins and Outs of Molecular Diagnostics. *Trends Genet*, 32, 360-371.
- JOHNSTON, A. & HOLT, D. W. 1999. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs. *Br J Clin Pharmacol*, 47, 339-50.
- JUNG, M., KLOTZEK, S., LEWANDOWSKI, M., FLEISCHHACKER, M. & JUNG, K. 2003. Changes in concentration of DNA in serum and plasma during storage of blood samples. *Clin Chem*, 49, 1028-9.
- KAHAN, B. D., KEOWN, P., LEVY, G. A. & JOHNSTON, A. 2002. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs in clinical practice. *Clin Ther*, 24, 330-50; discussion 329.
- KHWAJA, A. 2012. KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury. *Nephron Clin Pract*, 120, c179-84.
- KNIGHT, S. R., THORNE, A. & LO FARO, M. L. 2019. Donor-specific Cell-free DNA as a Biomarker in Solid Organ Transplantation. A Systematic Review. *Transplantation*, 103, 273-283.
- KREIS, H., MANSOURI, R., DESCAMPS, J. M., DANDAVINO, R., N'GUYEN, A. T., BACH, J. F. & CROSNIER, J. 1981. Antithymocyte globulin in cadaver kidney transplantation: a randomized trial based on T-cell monitoring. *Kidney Int*, 19, 438-44.
- KUDOSE, S., HOSHI, M., JAIN, S. & GAUT, J. P. 2018. Renal Histopathologic Findings Associated With Severity of Clinical Acute Kidney Injury. *Am J Surg Pathol*, 42, 625-635.
- LEE, H., PARK, Y. M., WE, Y. M., HAN, D. J., SEO, J. W., MOON, H., LEE, Y. H., KIM, Y. G., MOON, J. Y., LEE, S. H. & LEE, J. K. 2017. Evaluation of Digital PCR as a Technique for Monitoring Acute Rejection in Kidney Transplantation. *Genomics Inform*, 15, 2-10.
- LO, Y. M. 2011. Transplantation monitoring by plasma DNA sequencing. *Clin Chem*, 57, 941-2.
- LO, Y. M., CHAN, K. C., SUN, H., CHEN, E. Z., JIANG, P., LUN, F. M., ZHENG, Y. W., LEUNG, T. Y., LAU, T. K., CANTOR, C. R. & CHIU, R. W. 2010. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med*, 2, 61ra91.
- LO, Y. M., TEIN, M. S., PANG, C. C., YEUNG, C. K., TONG, K. L. & HJELM, N. M. 1998. Presence of donor-specific DNA in plasma of kidney and liver-transplant recipients. *Lancet*, 351, 1329-30.
- LO, Y. M., ZHANG, J., LEUNG, T. N., LAU, T. K., CHANG, A. M. & HJELM, N. M. 1999. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet*, 64, 218-24.

- LUI, Y. Y., CHIK, K. W., CHIU, R. W., HO, C. Y., LAM, C. W. & LO, Y. M. 2002. Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem*, 48, 421-7.
- LUI, Y. Y., WOO, K. S., WANG, A. Y., YEUNG, C. K., LI, P. K., CHAU, E., RUYGROK, P. & LO, Y. M. 2003. Origin of plasma cell-free DNA after solid organ transplantation. *Clin Chem*, 49, 495-6.
- MANDEL, P. A. M., P. 1948. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *CR Acad. Sci. Paris*, 142, 241-243.
- MARKY, L. A. & BRESLAUER, K. J. 1987. Calculating thermodynamic data for transitions of any molecularity from equilibrium melting curves. *Biopolymers*, 26, 1601-20.
- MARTINS, L., FONSECA, I., ALMEIDA, M., HENRIQUES, A. C., DIAS, L., SARMENTO, A. M. & CABRITA, A. 2005. Immunosuppression with antithymocyte globulin in renal transplantation: better long-term graft survival. *Transplant Proc*, 37, 2755-8.
- MEHTA, R. L., KELLUM, J. A., SHAH, S. V., MOLITORIS, B. A., RONCO, C., WARNOCK, D. G., LEVIN, A. & ACUTE KIDNEY INJURY, N. 2007. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care*, 11, R31.
- MELANCON, J. 2020. Donor Derived Cell Free DNA: is it all the same? *Kidney360*, 10.34067/KID.0003512020.
- MENGEL, M., SIS, B., HAAS, M., COLVIN, R. B., HALLORAN, P. F., RACUSEN, L. C., SOLEZ, K., CENDALES, L., DEMETRIS, A. J., DRACHENBERG, C. B., FARVER, C. F., RODRIGUEZ, E. R., WALLACE, W. D., GLOTZ, D. & BANFF MEETING REPORT WRITING, C. 2012. Banff 2011 Meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*, 12, 563-70.
- MICHALLET, M. C., PREVILLE, X., FLACHER, M., FOURNEL, S., GENESTIER, L. & REVILLARD, J. P. 2003. Functional antibodies to leukocyte adhesion molecules in antithymocyte globulins. *Transplantation*, 75, 657-62.
- MISHRA, M. N. & BALIGA, K. V. 2013. Significance of panel reactive antibodies in patients requiring kidney transplantation. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 24, 495-9.
- MOECKEL, G. W. 2018. Pathologic Perspectives on Acute Tubular Injury Assessment in the Kidney Biopsy. *Semin Nephrol*, 38, 21-30.
- MOHAMMADPOUR, N., ELYASI, S., VAHDATI, N., MOHAMMADPOUR, A. H. & SHAMSARA, J. 2011. A review on therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs. *Iran J Basic Med Sci*, 14, 485-98.
- NASHAN, B., ABBUD-FILHO, M. & CITTERIO, F. 2016. Prediction, prevention, and management of delayed graft function: where are we now? *Clin Transplant*, 30, 1198-1208.
- NASHAN, B., MOORE, R., AMLOT, P., SCHMIDT, A. G., ABEYWICKRAMA, K. & SOULILLOU, J. P. 1997. Randomised trial of basiliximab versus placebo for control of acute cellular rejection in renal allograft recipients. CHIB 201 International Study Group. *Lancet*, 350, 1193-8.
- OELLERICH, M., SHIPKOVA, M., ASENDORF, T., WALSON, P. D., SCHAUERTE, V., METTENMEYER, N., KABAKCHIEV, M., HASCHE, G., GRÖNE, H. J., FRIEDE, T., WIELAND, E., SCHWENGER, V., SCHÜTZ, E. & BECK, J. 2019. Absolute quantification of donor-derived cell-free DNA as a marker of rejection and graft injury in kidney transplantation: Results from a prospective observational study. *Am J Transplant*, 19, 3087-3099.
- PARAJULI, S., AZIZ, F., GARG, N., PANZER, S. E., JOACHIM, E., MUTH, B., MOHAMED, M., BLAZEL, J., ZHONG, W., ASTOR, B. C., MANDELBROT, D. A. & DJAMALI, A. 2019.

- Histopathological characteristics and causes of kidney graft failure in the current era of immunosuppression. *World J Transplant*, 9, 123-133.
- PRATSCHKE, J., DRAGUN, D., HAUSER, I. A., HORN, S., MUELLER, T. F., SCHEMMER, P. & THAISS, F. 2016. Immunological risk assessment: The key to individualized immunosuppression after kidney transplantation. *Transplant Rev (Orlando)*, 30, 77-84.
- PREVILLE, X., FLACHER, M., LEMAUFF, B., BEAUCHARD, S., DAVELU, P., TIOLLIER, J. & REVILLARD, J. P. 2001. Mechanisms involved in antithymocyte globulin immunosuppressive activity in a nonhuman primate model. *Transplantation*, 71, 460-8.
- QUAN, P. L., SAUZADE, M. & BROUZES, E. 2018. dPCR: A Technology Review. *Sensors (Basel)*, 18.
- RACUSEN, L. C., COLVIN, R. B., SOLEZ, K., MIHATSCH, M. J., HALLORAN, P. F., CAMPBELL, P. M., CECKA, M. J., COSYNS, J. P., DEMETRIS, A. J., FISHBEIN, M. C., FOGO, A., FURNESS, P., GIBSON, I. W., GLOTZ, D., HAYRY, P., HUNSICKERN, L., KASHGARIAN, M., KERMAN, R., MAGIL, A. J., MONTGOMERY, R., MOROZUMI, K., NICKELEIT, V., RANDHAWA, P., REGELE, H., SERON, D., SESHAN, S., SUND, S. & TRPKOV, K. 2003. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant*, 3, 708-14.
- RACUSEN, L. C., HALLORAN, P. F. & SOLEZ, K. 2004. Banff 2003 meeting report: new diagnostic insights and standards. *Am J Transplant*, 4, 1562-6.
- RACUSEN, L. C., SOLEZ, K., COLVIN, R. B., BONSI, S. M., CASTRO, M. C., CAVALLO, T., CROKER, B. P., DEMETRIS, A. J., DRACHENBERG, C. B., FOGO, A. B., FURNESS, P., GABER, L. W., GIBSON, I. W., GLOTZ, D., GOLDBERG, J. C., GRANDE, J., HALLORAN, P. F., HANSEN, H. E., HARTLEY, B., HAYRY, P. J., HILL, C. M., HOFFMAN, E. O., HUNSICKER, L. G., LINDBLAD, A. S., YAMAGUCHI, Y. & ET AL. 1999. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int*, 55, 713-23.
- RAMIREZ-SANDOVAL, J. C., HERRINGTON, W. & MORALES-BUENROSTRO, L. E. 2015. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in kidney transplantation: A review. *Transplant Rev (Orlando)*, 29, 139-44.
- RICHARD J. JOHNSON, J. F., JÜRGEN FLOEGE 2015a. *Comprehensive Clinical Nephrology*, Philadelphia, PA 19103-2899, Elsevier Saunders.
- RICHARD J. JOHNSON, J. F., JÜRGEN FLOEGE 2015b. *Comprehensive Clinical Nephrology*, Philadelphia, PA 19103-2899, Elsevier.
- RICHARD J. JOHNSON, J. F., JÜRGEN FLOEGE 2015c. *Comprehensive Clinical Nephrology*, Philadelphia, PA 19103-2899, Elsevier Saunders.
- ROJAS, L., NEUMANN, I., HERRERO, M. J., BOSO, V., REIG, J., POVEDA, J. L., MEGIAS, J., BEA, S. & ALINO, S. F. 2015. Effect of CYP3A5*3 on kidney transplant recipients treated with tacrolimus: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Pharmacogenomics J*, 15, 38-48.
- RONCO, C., BELLOMO, R. & KELLUM, J. A. 2019. Acute kidney injury. *Lancet*, 394, 1949-1964.
- ROSENAU, H. 2019. *Dritter Tätigkeitsbericht der Gendiagnostik-Kommission; Dritter Bericht gemäß § 23 Abs. 4 Gendiagnostikgesetz (GenDG) für den Zeitraum vom 01.01.2016 bis 31.12.2018* [Online]. Available: https://www.rki.de/DE/Content/Kommissionen/GendiagnostikKommission/Taetigkeitsbericht/Taetigkeitsbericht_03.pdf;jsessionid=0664BCD9185686814A2E7CD91E1B9505.internet071?_blob=publicationFile [Accessed 08-02 2020].

- ROSTAMI, Z., NIKPOOR, M. & EINOLLAHI, B. 2013. Urinary Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL) for Early Diagnosis of Acute Kidney Injury in Renal Transplant Recipients. *Nephrourol Mon*, 5, 745-52.
- SALVADORI, M. & TSALOUCHOS, A. 2017. Biomarkers in renal transplantation: An updated review. *World J Transplant*, 7, 161-178.
- SCHIFF, J., COLE, E. & CANTAROVICH, M. 2007. Therapeutic monitoring of calcineurin inhibitors for the nephrologist. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2, 374-84.
- SCHINSTOCK, C. A. & GANDHI, M. J. 2018. Maintaining the Health of the Renal Allograft: Laboratory and Histologic Monitoring After Kidney Transplantation. *Clin Lab Med*, 38, 607-621.
- SCHÜTZ, E., ASENDORF, T., BECK, J., SCHAUERTE, V., METTENMEYER, N., SHIPKOVA, M., WIELAND, E., KABAKCHIEV, M., WALSON, P. D., SCHWENGER, V. & OELLERICH, M. 2020. Time-Dependent Apparent Increase in dd-cfDNA Percentage in Clinically Stable Patients Between One and Five Years Following Kidney Transplantation. *Clin Chem*, 66, 1290-1299.
- SCHUTZ, E. & VON AHSEN, N. 2009. Influencing factors of dsDNA dye (high-resolution) melting curves and improved genotype call based on thermodynamic considerations. *Anal Biochem*, 385, 143-52.
- SELLARES, J., DE FREITAS, D. G., MENGEL, M., REEVE, J., EINECKE, G., SIS, B., HIDALGO, L. G., FAMULSKI, K., MATAS, A. & HALLORAN, P. F. 2012. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant*, 12, 388-99.
- SHAW, L. M., HOLT, D. W., KEOWN, P., VENKATARAMANAN, R. & YATSCOFF, R. W. 1999. Current opinions on therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs. *Clin Ther*, 21, 1632-52; discussion 1631.
- SHEN, J., ZHOU, Y., CHEN, Y., LI, X., LEI, W., GE, J., PENG, W., WU, J., LIU, G., YANG, G., SHI, H., CHEN, J., JIANG, T. & WANG, R. 2019. Dynamics of early post-operative plasma ddcfDNA levels in kidney transplantation: a single-center pilot study. *Transpl Int*, 32, 184-192.
- SIGDEL, T. K., ARCHILA, F. A., CONSTANTIN, T., PRINS, S. A., LIBERTO, J., DAMM, I., TOWFIGHI, P., NAVARRO, S., KIRKIZLAR, E., DEMKO, Z. P., RYAN, A., SIGURJONSSON, S., SARWAL, R. D., HSEISH, S. C., CHAN-ON, C., ZIMMERMANN, B., BILLINGS, P. R., MOSHKEVICH, S. & SARWAL, M. M. 2018. Optimizing Detection of Kidney Transplant Injury by Assessment of Donor-Derived Cell-Free DNA via Massively Multiplex PCR. *J Clin Med*, 8.
- SIGDEL, T. K., VITALONE, M. J., TRAN, T. Q., DAI, H., HSIEH, S. C., SALVATIERRA, O. & SARWAL, M. M. 2013. A rapid noninvasive assay for the detection of renal transplant injury. *Transplantation*, 96, 97-101.
- SIS, B., MENGEL, M., HAAS, M., COLVIN, R. B., HALLORAN, P. F., RACUSEN, L. C., SOLEZ, K., BALDWIN, W. M., 3RD, BRACAMONTE, E. R., BROECKER, V., COSIO, F., DEMETRIS, A. J., DRACHENBERG, C., EINECKE, G., GLOOR, J., GLOTZ, D., KRAUS, E., LEGENDRE, C., LIAPIS, H., MANNON, R. B., NANKIVELL, B. J., NICKELEIT, V., PAPADIMITRIOU, J. C., RANDHAWA, P., REGELE, H., RENAUDIN, K., RODRIGUEZ, E. R., SERON, D., SESHAN, S., SUTHANTHIRAN, M., WASOWSKA, B. A., ZACHARY, A. & ZEEVI, A. 2010. Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant*, 10, 464-71.
- SNYDER, T. M., KHUSH, K. K., VALANTINE, H. A. & QUAKE, S. R. 2011. Universal noninvasive detection of solid organ transplant rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 6229-34.

- SOLEZ, K., AXELSEN, R. A., BENEDIKTSSON, H., BURDICK, J. F., COHEN, A. H., COLVIN, R. B., CROKER, B. P., DROZ, D., DUNNILL, M. S., HALLORAN, P. F. & ET AL. 1993. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int*, 44, 411-22.
- SOLEZ, K., BENEDIKTSSON, H., CAVALLO, T., CROKER, B., DEMETRIS, A. J., DRACHENBERG, C., EMANCIPATOR, S., FURNESS, P. N., GABER, L. W., GIBSON, I. W., GOUGH, J., GUPTA, R., HALLORAN, P., HAYRY, P., KASHGARIAN, M., MARCUSSEN, N., MASSY, Z. A., MIHATSCH, M. J., MOROZUMI, K., NORONHA, I., OLSEN, S., PAPADIMITRIOU, J., PAUL, L. C., PICKEN, M., RACUSEN, L. C., RAMOS, E. L., RANDHAWA, P., RAYNER, D. C., RUSH, D., SANFILIPPO, F., TASKINEN, E., TRPKOV, K., TRUONG, L., YAMAGUCHI, Y. & YILMAZ, S. 1996. Report of the Third Banff Conference on Allograft Pathology (July 20-24, 1995) on classification and lesion scoring in renal allograft pathology. *Transplant Proc*, 28, 441-4.
- SOLEZ, K., COLVIN, R. B., RACUSEN, L. C., HAAS, M., SIS, B., MENGEL, M., HALLORAN, P. F., BALDWIN, W., BANFI, G., COLLINS, A. B., COSIO, F., DAVID, D. S., DRACHENBERG, C., EINECKE, G., FOGO, A. B., GIBSON, I. W., GLOTZ, D., ISKANDAR, S. S., KRAUS, E., LERUT, E., MANNON, R. B., MIHATSCH, M., NANKIVELL, B. J., NICKELEIT, V., PAPADIMITRIOU, J. C., RANDHAWA, P., REGELE, H., RENAUDIN, K., ROBERTS, I., SERON, D., SMITH, R. N. & VALENTE, M. 2008. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant*, 8, 753-60.
- SOLEZ, K., COLVIN, R. B., RACUSEN, L. C., SIS, B., HALLORAN, P. F., BIRK, P. E., CAMPBELL, P. M., CASCALHO, M., COLLINS, A. B., DEMETRIS, A. J., DRACHENBERG, C. B., GIBSON, I. W., GRIMM, P. C., HAAS, M., LERUT, E., LIAPIS, H., MANNON, R. B., MARCUS, P. B., MENGEL, M., MIHATSCH, M. J., NANKIVELL, B. J., NICKELEIT, V., PAPADIMITRIOU, J. C., PLATT, J. L., RANDHAWA, P., ROBERTS, I., SALINAS-MADRIGA, L., SALOMON, D. R., SERON, D., SHEAFF, M. & WEENING, J. J. 2007. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant*, 7, 518-26.
- STITES, E., KUMAR, D., OLAITAN, O., JOHN SWANSON, S., LECA, N., WEIR, M., BROMBERG, J., MELANCON, J., AGHA, I., FATTAH, H., ALHAMAD, T., QAZI, Y., WISEMAN, A. & GUPTA, G. 2020. High levels of dd-cfDNA identify patients with TCMR 1A and borderline allograft rejection at elevated risk of graft injury. *Am J Transplant*, 20, 2491-2498.
- TOUW, D. J., NEEF, C., THOMSON, A. H., VINKS, A. A., COST-EFFECTIVENESS OF THERAPEUTIC DRUG MONITORING COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THERAPEUTIC DRUG, M. & CLINICAL, T. 2005. Cost-effectiveness of therapeutic drug monitoring: a systematic review. *Ther Drug Monit*, 27, 10-7.
- VAN GELDER, T., TEDESCO SILVA, H., DE FIJTER, J. W., BUDDE, K., KUYPERS, D., ARNS, W., SOULILLOU, J. P., KANELIS, J., ZELVYS, A., EKBERG, H., HOLZER, H., ROSTAING, L. & MAMELOK, R. D. 2010. Renal transplant patients at high risk of acute rejection benefit from adequate exposure to mycophenolic acid. *Transplantation*, 89, 595-9.
- VIDAL-PETIOT, E. & FLAMANT, M. 2017. [Measurement and estimation of glomerular filtration rate]. *Nephrol Ther*, 13, 560-568.
- VISHNU SWARUP, M. R. R. 2007. Circulating (cell-free) nucleic acids – A promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS Letters* 581, 795–799.
- VOGELSTEIN, B. & KINZLER, K. W. 1999. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 9236-41.
- WHALE, A. S., COWEN, S., FOY, C. A. & HUGGETT, J. F. 2013. Methods for applying accurate digital PCR analysis on low copy DNA samples. *PLoS One*, 8, e58177.

- WHITLAM, J. B., LING, L., SKENE, A., KANELIS, J., IERINO, F. L., SLATER, H. R., BRUNO, D. L. & POWER, D. A. 2019. Diagnostic application of kidney allograft-derived absolute cell-free DNA levels during transplant dysfunction. *Am J Transplant*, 19, 1037-1049.
- WU, D., ZHU, D., XU, M., RONG, R., TANG, Q., WANG, X. & ZHU, T. 2011. Analysis of transcriptional factors and regulation networks in patients with acute renal allograft rejection. *J Proteome Res*, 10, 175-81.
- ZAND, M. S., VO, T., HUGGINS, J., FELGAR, R., LIESVELD, J., PELLEGRIN, T., BOZORGZADEH, A., SANZ, I. & BRIGGS, B. J. 2005. Polyclonal rabbit antithymocyte globulin triggers B-cell and plasma cell apoptosis by multiple pathways. *Transplantation*, 79, 1507-15.
- ZHANG, H., ZHENG, C., LI, X., FU, Q., LI, J., SU, Q., ZENG, L., LIU, Z., WANG, J., HUANG, H., XU, B., YE, M., LIU, L. & WANG, C. 2020. Diagnostic Performance of Donor-Derived Plasma Cell-Free DNA Fraction for Antibody-Mediated Rejection in Post Renal Transplant Recipients: A Prospective Observational Study. *Front Immunol*, 11, 342.
- ZHANG, J., TONG, K. L., LI, P. K., CHAN, A. Y., YEUNG, C. K., PANG, C. C., WONG, T. Y., LEE, K. C. & LO, Y. M. 1999. Presence of donor- and recipient-derived DNA in cell-free urine samples of renal transplantation recipients: urinary DNA chimerism. *Clin Chem*, 45, 1741-6.
- ZHONG, X. Y., HAHN, D., TROEGER, C., KLEMM, A., STEIN, G., THOMSON, P., HOLZGREVE, W. & HAHN, S. 2001. Cell-free DNA in urine: a marker for kidney graft rejection, but not for prenatal diagnosis? *Ann N Y Acad Sci*, 945, 250-7.

7 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Klinikums Stuttgart unter Betreuung von Herrn Professor Dr. E. Wieland durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. E. Wieland, Laborleiter, und Frau Dr. med. M. Shipkova, Fachärztin für Laboratoriumsmedizin in Kooperation mit Chronix Biomedical Göttingen, Herrn Prof. Dr. E. Schütz, Facharzt für Laboratoriumsmedizin und Leiter des veterinärmedizinischen Institutslabors der Georg August Universität Göttingen und Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Oellerich, Facharzt für Laboratoriumsmedizin und Distinguished Research Professor des Pharmakologischen Instituts der Georg August Universität Göttingen.

Die Erfassung der klinischen Patientendaten erfolgten durch mich in Zusammenarbeit mit den Doktorandinnen Dominique Adelhof, Carolin Bräuer, Ortrun Canzler und Silvia Hubel. Die laborchemischen Untersuchungen wurden vom Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin im Klinikum Stuttgart und Chronix Biomedical Göttingen durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch Prof. E. Wieland, Dr. med. M. Shipkova und Herrn Thomas Asendorf (Leitung der Arbeitsgruppe Biometrie und Studiendokumentation, Institut für Medizinische Statistik, Universitätsmedizin Göttingen) durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Stuttgart, den 09.11.2020

Unterschrift

8 Veröffentlichungen

J Beck, M Oellerich, U Schulz, V Schauerte, L Reinhard, U Fuchs, C Knabbe, A Zittermann, C Olbricht, J F Gummert, M Shipkova, I Birschmann, E Wieland, E Schütz: **Donor-Derived Cell-Free DNA Is a Novel Universal Biomarker for Allograft Rejection in Solid Organ Transplantation** (Transplant Proc. 2015 Oct;47(8):2400-3)

Michael Oellerich, Maria Shipkova, Thomas Asendorf, Philip D. Walson, Verena Schauerte, Nina Mettenmeyer, Mariana Kabakchiev, Georg Hasche, Hermann-Josef Gröne, Tim Friede, Eberhard Wieland, Vedat Schwenger, Ekkehard Schütz, Julia Beck : **Absolute quantification of donor-derived cell-free DNA as a marker of rejection and graft injury in kidney transplantation: Results from a prospective observational study** (Am J Transplant. 2019 Nov;19(11):3087-3099)

Ekkehard Schütz, Thomas Asendorf, Julia Beck, Verena Schauerte, Nina Mettenmeyer, Maria Shipkova, Eberhard Wieland, Mariana Kabakchiev, Philip D. Walson, Vedat Schwenger and Michael Oellerich: **Time-Dependent Apparent Increase in dd-cfDNA Percentage in Clinically Stable Patients Between One and Five Years Following Kidney Transplantation** (Clinical Chemistry, Volume 66, Issue 10, October 2020, Pages 1290-1299)

9 Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. E. Wieland und meiner Betreuerin Frau Dr. M. Shipkova für die hervorragende Betreuung und ihr großes Engagement während der Arbeit an meiner Dissertation danken.

Ein ganz besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. C.J. Olbricht und Herrn Prof. Dr. V. Schwenger, die dieses Projekt nephrologisch und transplantationsmedizinisch engagiert mitbetreut haben. Ihnen beiden habe ich außerdem eine exzellente medizinische Weiterbildung – erst in der Inneren Medizin und dann in der Nephrologie – mit viel Raum für lehrreiche Diskussionen und stetigem Ansporn zur Vertiefung meines Wissens zu verdanken.

Insbesondere Herrn Prof. M. Oellerich und den Mitarbeitern von Chronix Biomedical in Göttingen, Herrn Prof. Dr. E. Schütz und Frau Dr. J. Beck, möchte ich für die Unterstützung bei den laborchemischen Messungen und die gute Kooperation während des Biomarker-Projekts danken.

Ebenso danke ich den Mitarbeitern des Zentralinstituts für Klinische Laboratoriumsmedizin im Klinikum Stuttgart, insbesondere Frau Mariana Kabakchiev, für die Unterstützung der dort durchgeführten laborchemischen Messungen.

Ebenfalls ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. R. Bolley für die Bahnung und Begleitung meines beruflichen Werdegangs sowie für die stetige Motivation zur Arbeit an meiner Dissertation.

Frau Dr. Andrea Ender, Leiterin des HLA-Labors im Klinikum Stuttgart, danke ich für ihre Unterstützung bei der Vertiefung meines Wissens in der Transplantationsimmunologie.

Herrn Thomas Asendorf danke ich für die gute und engagierte Beratung bei der Erstellung der Statistiken. Ohne ihn wäre der Weg zur Vollendung dieser Dissertation deutlich schwieriger gewesen.

Meinen Eltern, meiner Schwester und meinen engsten Freunden danke für die vielen Stunden emotionaler und mentaler Unterstützung, die mir sehr geholfen haben, die Dissertation zu beenden.