

Aus der Chirurgischen Klinik, Campus Charité Mitte | Campus Virchow-
Klinikum, der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin
Berlin

DISSERTATION

**CXCL9 und CD44 als Serumproteinbiomarker zur Diagnostik der
akuten zellulären Rejektion nach Lebertransplantation**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

Von

Kukuh Aji Prabowo

aus Jakarta, Indonesien

Datum der Promotion: 18.12. 2020

Vorwort

Die vorliegende Dissertation ist während meiner Studienzeit an der Charité – Universitätsmedizin Berlin in der Experimenteller Chirurgie und Regenerative Medizin unter der Leitung von Prof. Dr. med. Igor M. Sauer entstanden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits im Journal *Liver Transplantation* mit dem Titel „CD44 and CXCL9 serum protein levels predict the risk of acute cellular rejection after liver transplantation“ veröffentlicht (20.04.2015).

INHALTSVERZEICHNIS

Vorwort	2
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	6
Abstract (Deutsch)	7
Abstract (Englisch)	8
1 Einleitung	9
1.1 Die Lebertransplantation.....	9
1.2 Pathophysiologie der akuten zelluläre Rejektion.....	9
1.3 Die Bedeutung der histopathologischen Untersuchung im Transplantationsmanagement.....	12
1.4 Proteinbiomarker in der Transplantationsmedizin.....	15
1.5 Arbeitshypothese und Aufgabenstellung.....	19
2 Materialien und Methoden	20
2.1 Selektion der Proteinbiomarker und Ablauf der Studie.....	20
2.2 Verarbeitung und Lagerung der Patientenproben.....	23
2.3 Sammlung und Archivierung der Patientendaten.....	23
2.4 Materialien und Geräte.....	23
2.5 Enzyme Linked Immunosorbent Assay.....	25
2.6 Statistische Analyse.....	30
3 Ergebnisse	32
3.1 Demographische und klinische Merkmale der Patientengruppen.....	32
3.2 CD44-Konzentrationen in Serumproben der Rejektionsgruppe im Vergleich zur Nichtrejektionsgruppe.....	37
3.3 CD44- und CXCL9-Serumproteinspiegel am ersten postoperativen Tag identifizieren Patienten, in deren klinischen Verlauf mindestens einmal eine akute zelluläre Rejektion auftrat.....	38
3.4 Korrelation der primären Grunderkrankung mit dem perioperativen CD44- und CXCL9-Serumproteinspiegel.....	40

3.5 Korrelation zwischen der akuten zellulären Rejektion und CD44- und CXCL9-Serumproteinspiegel am POD1.....	42
3.6 Prognostischer Wert von CD44 und CXCL9 für klinisch signifikante akute zelluläre Rejektion nach LTx.....	43
3.7 Einfluss der präoperativen Dialysen auf den prädiktiven Wert von CD44 und CXCL9.....	45
3.8 Differenzierung von Patienten mit klinisch signifikanter akuter zellulärer Rejektion von Patienten mit Transplantatdysfunktion aufgrund anderer Ursachen im frühen postoperativen Verlauf.....	46
4 Diskussion.....	49
5 Zusammenfassung.....	57
Literaturverzeichnis	58
Eidesstattliche Erklärung.....	67
Anteilserklärung.....	68
Lebenslauf.....	69
Danksagung.....	70

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung von Biomarkerstudie.....	16
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Methode zur Entdeckung der spezifischen Proteinbiomarker für akute zelluläre Rejektion nach Chen et al. (17).....	20
Abbildung 3: Schematische Darstellung vom Ablauf der Studie.....	22
Abbildung 4: Schematische Darstellung von ELISA-Techniken.....	26
Abbildung 5: Zeitintervall von Transplantation bis zum Tag der Rejektion bzw. Biopsie.....	35
Abbildung 6: Transaminasen- und Cholestasewerte bis zu 48 Stunden vor der Biopsie (POD6-8).....	36
Abbildung 7: Serumproteinspiegel am Tag der Rejektion.....	37

Abbildung 8: Assoziation zwischen CD44- Serumproteinspiegel vor Transplantation und am POD1 mit akuter zellulärer Rejektion.....	39
Abbildung 9: Assoziation zwischen CXCL9- Serumproteinspiegel vor Transplantation und am POD1 mit akuter zellulärer Rejektion.....	40
Abbildung 10: Korrelation zwischen dem CD44- und CXCL9- Serumproteinspiegel mit primären Grunderkrankungen.....	41
Abbildung 11: Korrelation zwischen dem CD44- und CXCL9- Serumproteinspiegel mit HCV als Grunderkrankungen.....	42
Abbildung 12: Kaplan-Meier-Analyse zwischen Cut-off von CD44 und CXCL9 am POD 1.....	44
Abbildung 13: Kaplan-Meier-Analyse zwischen kombinierten Cut-off-Werten von hohem CD44 und niedrigem CXCL9 am POD 1.....	44
Abbildung 14: CD44- und CXCL9-Serumproteinspiegel in Rejektion- und Nicht-Rejektiongruppe mit oder ohne Dialyse vor Transplantation.....	45
Abbildung 15: Vergleich zwischen dem postoperativen Verlauf von CD44 und CXCL9 in den untersuchten Gruppen.....	46
Abbildung 16 und 17: CD44- und CXCL9-Serumproteinspiegel zwischen POD1-POD7.....	47-48

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Die Gradeinteilung der akuten zellulären Rejektion (Banff-Schema).....	12
Tabelle 2: Histopathologische Charakteristika der akuten zellulären Rejektion.....	13
Tabelle 3: Liste der Verwendeten Geräte.....	23
Tabelle 4: Liste der verwendeten Laborutensilien.....	24
Tabelle 5: Liste der verwendeten Reagenzien und Lösungen.....	24
Tabelle 6: Liste der verwendeten Computersoftware.....	25
Tabelle 7: Klinische Charakteristik der Patienten in der Studie.....	32
Tabelle 8: Perioperative Labordaten in der Studie.....	33
Tabelle 9: Immunsuppressive Therapie in frühen portoperativer Periode.....	36
Tabelle 10: Prädiktive Werte von CD44 und CXCL9 nach Transplantation für ACR.....	43

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ACR	Akute zelluläre Rejektion
APC	Antigenpräsentierende Zellen
AUC	Area Under the Curve
CD	Cluster of Differentiation
CsA	Cyclosporin A
DC	Dendritische Zellen
ELISA	Enzyme linked immunosorbent Assay
FBS	Fetal bovine serum
GEO	Gene Expression Omnibus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HLA	Humane Leukozytenantigen
IL-6	Interleukin-6
KCL	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
Na_2CO_3	Natriumcarbonat
NaHCO_3	Natriumbicarbonat
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
LTx	Lebertransplantation
LPS	Lipopolysaccharide
MHC	Major histocompatibility complex
MMF	Mycophenolat Mofetil
miRNA	micro Ribonucleic Acid
mRNA	Messenger Ribonucleic acid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NTx	Nierentransplantation
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
POD	Postoperativer Tag
ROC	Receiver Operating Characteristic
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor

Abstract

Hintergrund: Die Inzidenz der akuten zellulären Rejektion nach Lebertransplantation beträgt 15-60%. Der Goldstandard für die Diagnose einer akuten zellulären Rejektion nach Lebertransplantation stellt die histologische Analyse von bioptisch gesichertem Lebergewebe dar. Aufgrund der Risiken für Komplikationen bei der Gewebegewinnung und der möglichen Fehlinterpretationen der histologischen Untersuchungen ist es wünschenswert, hierfür Biomarker zu nutzen, welche nicht-invasiv aus dem Serum der Patienten bestimmt werden können. In der Literatur wurden CXCL9, CD44, CD31 und IL-6 als Organ-übergreifende Serumproteinbiomarker für die Transplantatrejektion beschrieben. In der vorliegenden Arbeit sollte der prädiktive und diagnostische Wert dieser Biomarker für eine akute zelluläre Rejektion in den ersten sechs Monaten nach Lebertransplantation ermittelt werden.

Methoden: Insgesamt wurden Serumproben von 94 Patienten nach orthotoper Lebertransplantation (LTx) gesammelt. Die Proteinbiomarker wurden vor der LTx, an den postoperativen Tagen 1, 3, 7 und 14 sowie zum Zeitpunkt einer klinisch indizierten Leberbiopsie mittels kommerziellen ELISA-Kits aus dem Serum der Patienten bestimmt. Eine akute zelluläre Rejektion wurde histologisch mittels Biopsie nachgewiesen. Danach wurden die ermittelten Konzentrationen der Proteinbiomarker mit den klinischen Daten korreliert und statistisch ausgewertet.

Ergebnisse: Im untersuchten Kollektiv kam es am postoperativen Tag 7 gehäuft zu einer akuten zellulären Rejektion. CD44 war bei Patienten zum Zeitpunkt einer akuten zellulären Rejektion signifikant erhöht. CD31, CXCL9 und IL-6 zeigten am Tag der Rejektion bzw. am Tag der Biopsie einen Trend zu höheren Serumproteinspiegeln, erreichten allerdings keine Signifikanz. CD44 war bei Patienten, welche im Verlauf eine akute zelluläre Rejektion entwickelten, am ersten postoperativen Tag 1 signifikant niedriger, während sich der CXCL9-Spiegel sowohl am POD 0 als auch POD 1 signifikant höher waren. Die Cut-Off-Wertkombination zwischen einem niedrigen CD44- und erhöhten CXCL9-Serumproteinspiegel ermöglichte die beste Prognose für eine akute zelluläre Rejektion innerhalb von 6 Monaten nach Lebertransplantation.

Zusammenfassung: Die Bestimmung der CD44- und CXCL9-Serumproteine ermöglichte die Vorhersage und Diagnose einer akuten zellulären Rejektion nach Lebertransplantation. Mithilfe dieser neuen spezifischen Biomarker könnten Patienten mit einem Risiko für eine akute zelluläre Rejektion identifiziert und somit das postoperative Management optimiert werden. Eine multizentrisch prospektive Studie wäre erforderlich, um das klinische Potential dieser Biomarker weiter zu untersuchen.

Abstract

Background: Acute cellular rejection (ACR) occurs in 15-60% of patients after liver transplantation. The standard diagnostic of ACR is currently based on histological analysis of tissue samples from biopsies. Due to the risk of complication during biopsy taking and possible misinterpretation of the histopathological analysis a simple non-invasive blood test based on biomarkers within the patient's serum would be a breakthrough in diagnosing ACR. The aim of this study was to validate CXCL9, CD44, CD31, and IL-6, which were previously proposed as being cross-organ serum protein biomarkers for organ transplant rejection, for diagnosis of ACR after liver transplantation.

Methods: Serum sample from 94 patients were collected prior and after orthotopic liver transplantation at postoperative day (POD) 1, 3, 7, 14, and during ACR. ACR was diagnosed by histological analyses of biopsy samples taken in case of clinically signs for acute rejection. The biomarkers were determined using commercially available ELISA-Kits in serum samples of patients. The concentration levels of the biomarkers were analyzed statistically.

Results: ACR occurred in this study mostly at POD7. CD44 serum protein levels were significantly lower At POD1 in patients with ACR compared to patients without ACR. CXCL9 was significantly elevated prior to transplantation and at POD 1. The combination between low CD44 and elevated CXCL9 showed a positive predictive value of 91% and a negative predictive value of 67% for ACR. CD44 was lower at rejection significantly and differentiated rejectors from patients with graft dysfunction due to other reasons.

Summary: CD44 and CXCL9 enabled to predict and detect liver allograft recipients at risk for ACR. These biomarkers could be used to treat rejection earlier than when parenchymal injury is already established. A prospective multicenter study would be necessary to further evaluate the validity of these biomarkers.

1 Einleitung

1.1 Die Lebertransplantation

Die orthotope Lebertransplantation (LTx) ermöglicht dank der Weiterentwicklung der Operationstechniken und des postoperativen Managements sowie insbesondere der kontinuierlichen Optimierung der immunsuppressiven Therapie eine effektive Therapie von Patienten mit fortgeschrittenen Lebererkrankungen, z. B. Leberzirrhose, sowie unter bestimmten Voraussetzungen bei Vorliegen eines hepatozellulären Karzinom (HCC). Sie ist außerdem die Therapie der Wahl bei bestimmten metabolischen Erkrankungen der Leber, wie z. B. Hämochromatose, Budd-Chiari-Syndrom, oder primär sklerosierender Cholangitis (PSC). Das mittlere 5-Jahres-Überleben liegt bei 75% (2).

Patienten mit erfolgter Hirntoddiagnostik und regelrechter Leberfunktion kommen als Organspender in Frage. Abgelehnt werden in der Regel Organe mit folgenden Kriterien: Spenderalter > 65 Jahre, 30% Steatosis des Parenchymvolumens, infiziertes Transplantat (Hepatitis B oder C), langes Intervall zwischen Hirntod und Organexplantation und über 12 Stunden kalte Ischämiezeit. Zudem gibt es die Möglichkeit, eine Leber mit erweiterten Spenderkriterien zu transplantieren. Aufgrund der Akzeptanz von Organen mit erweiterten Spenderkriterien konnte in den letzten Jahren die Anzahl der LTx gesteigert und die Patientenwarteliste verkürzt werden (68). Eine andere Strategie, um die Anzahl an Lebertransplantationen – zu steigern, ist die Leberlebendspende. Also der Leberteileresektion bei freiwilligen Spendern zur Gewinnung einer für den Empfänger ausreichend großen Leberteils. Diese Methode wird vor allem in asiatischen Ländern, in Europa und den USA angewandt.

In der Regel erfolgt die immunsuppressive Therapie nach Lebertransplantation mit Corticosteroiden, Calcineurininhibitoren wie Tacrolimus oder Cyclosporin A (CsA), und/oder Proliferationsinhibitoren wie z.B. Mycophenolat Mofetil (MMF). Trotz der in den letzten Jahren optimierten Immunsuppression nach LTx kommt es in 15 – 60% der Patienten in den ersten postoperativen Monaten zu einer akuten zellulären Rejektion (62, 64, 5).

1.2 Pathophysiologie der akuten zellulären Rejektion

Die akute zelluläre Rejektion stellt eine besondere Herausforderung nach einer Organtransplantation dar. Definiert wird eine Transplantatabstoßung als

immunologische Antwort auf fremde Antigene im Spenderorgan. Diese Antwort kann das Transplantat durch ständige Auseinandersetzung mit dem Immunsystem des Empfängers dauerhaft schädigen. Aufgrund der daraus resultierenden pathologischen Umbauvorgänge verliert das transplantierte Organ sukzessiv seine Funktion.

Klinisch stellt sich eine akute Abstoßung häufig unspezifisch dar. Zu den klinischen Symptomen können beispielsweise Fieber, Bauchschmerzen, Hepatomegalie und zunehmender Aszites gehören. Laborchemisch zeigen sich pathologisch erhöhte Werte der Aminotransferasen, der alkaline Phosphatase sowie der γ -glutamyl-Transferase.

Die Rejektion des Lebertransplantats wird nach dem Zeitpunkt des Auftretens in hyperakut, akut und chronisch unterschieden.

Eine hyperakute Rejektion des Lebertransplantats ist sehr selten. Diese Rejektionsform kommt meistens bei Empfängern mit ABO-Inkompatibilität vor (21, 22). Sie tritt entweder rasch in der perioperativen Periode oder in den ersten Tagen nach LTx auf (17). Sie führt zu einem rapiden Transplantatversagen mit koagulativen Nekrosen des Transplantates und Fibrinablagerung aufgrund der präformierten Antikörper des Empfängers. Histopathologisch ist erkennbar, dass die Lymphozyten abwesend und die Gallengänge nicht betroffen sind (31).

In den Anfängen der Lebertransplantationen betrug die Prävalenz der akuten Rejektion nach LTx über 75%. Dank kontinuierlicher Optimierung der immunsuppressiven Therapie sank der Anteil der Rejektion auf aktuell um 30% (16). Eine akute Rejektion, auch als akute zelluläre Rejektion bekannt, ist dennoch die häufigste Rejektionsform mit Häufigkeitsgipfel in den ersten 3 Monaten nach Transplantation (17, 57). Es wurde beobachtet, dass eine akute zelluläre Rejektion am 7. bis 10. postoperativen Tag gehäuft auftritt (7). Sie ist durch Infiltration von Lymphozyten in die Portalvene und Zerstörung der Gallengänge charakterisiert. Dabei bleibt die Transplantatfunktion in der Regel erhalten. Die Diagnose einer akuten zellulären Rejektion wird klinisch, laborchemisch und histopathologisch gestellt. Histologisch gehören drei wichtige Kriterien zur Diagnose einer akuten zellulären Rejektion: portale Entzündung, Gallengangsläsionen und venöse Entzündung (31). Man spricht von einer späten akuten Rejektion, wenn sie erst nach mehr als 3 Monaten auftritt. Hierbei zeigt sich histopathologisch eine Gallengangatrophy und zentrilobuläre Fibrose des Transplantats (31, 56).

Unter dem Begriff der chronischen Rejektion versteht man die Konsequenz mehrerer Episoden einer akuten Rejektion. Andere Ursache der chronischen Rejektion ist die steroidresistente Rejektion. Der häufigste Zeitpunkt für eine chronische Rejektion ist 2 bis 6 Monate nach LTx. Sie kommt bei ca. 3% der Patienten nach LTx vor und führt in der Regel zu einem Transplantatversagen. Duktopenie ist das wichtigste histopathologische Kennzeichen bei einer chronischen Rejektion (14, 17).

Eine akute zelluläre Rejektion ist ein pathophysiologisch komplexer Vorgang des Immunsystems und noch nicht vollständig erklärt. Sinusoidale Endothelzellen in der Leber exprimieren die MHC-Typ-2-Moleküle, die Antigene präsentieren (36, 37, 43). Die Zellen, die MHC-Typ-2-Moleküle exprimieren, werden als antigenpräsentierende Zellen (APC) bezeichnet. Außerdem sezernieren die Hepatozyten ca. 80-90% der Komplementfaktoren und exprimieren Toll-like-Rezeptoren (TLRs), die über die Portalvene transportierte Antigene auffangen (21). Bei der Aktivierung der TLRs werden vermehrt Lymphozyten und proinflammatorische Zytokine wie z. B. TNF produziert (41, 58). Dieses unterstützt die Reifung der dendritischen Zellen (DCs) und ihre Migration in die regionären Lymphknotenstationen bzw. Milz (4, 15, 37, 63). Anschließend werden in den regionären Lymphknotenstationen T-Lymphozyten aktiviert. Diese aktivierten T-Zellen produzieren dann proinflammatorische Zytokine, wie z.B. IL-17, welches für Reifung und Überproliferation weiterer Lymphozyten verantwortlich ist (50). Dabei werden andere Zytokine sezerniert, welche die aktivierten Lymphozyten zum transplantierten Organ anlocken und dabei eine immunologische Antwort, die Abstoßungsreaktion, hervorrufen (10, 26, 71, 70, 73).

Da eine akute zelluläre Rejektion gehäuft innerhalb der ersten 6 Wochen nach Transplantation auftritt, werden zur Detektion einer möglichen Rejektion im postoperativen Verlauf regelmäßig die Transaminasen- und Cholestaseparameter bestimmt. Im Falle pathologisch erhöhter Transaminase- und Cholestasewerte kann vermutet werden, dass eine akute zelluläre Rejektion vorliegt. Um dies zu bestätigen, ist eine Leberbiopsie notwendig. Mit Hilfe der histopathologischen Untersuchung kann zwischen akuter zellulärer Rejektion mitsamt dem Rejektionsgradindex (RAI), Reperfusionsschaden und Hepatitis-B/C-Reinfektion unterschieden werden.

1.3 Die Bedeutung der histopathologischen Untersuchung im Transplantationsmanagement

Die histopathologische Untersuchung gilt heutzutage in Ermangelung einer nicht-invasiven Diagnostik als der Goldstandard der Rejektionsdiagnostik nach einer Transplantation. Die Diagnose einer akuten Rejektion wird anhand der klinischen, laborchemischen und histopathologischen Kriterien gestellt. Bei einer pathologischen Erhöhung der Transaminase- und Cholestasewerte oder bei pathologischen Befunden in bildgebenden Verfahren ist eine Leberbiopsie durchzuführen. Anhand der histopathologischen Untersuchung kann eine akute zelluläre Rejektion und deren Grad bestätigt werden. Die Gradeinteilung der akuten zellulären Rejektion wird in den Tabellen 1 und 2 zusammengefasst (16). Außerdem kann die Histopathologie zusätzliche wichtige Informationen, z. B. über den Grad rekurrierender viraler Hepatitiden, über Komorbiditäten (z. B. Steatosis oder Steatohepatitis) und andere postoperative Komplikationen, liefern.

Grad	Kriterien
Intermediär	Portale Entzündung
Mild (Grad 1)	Rejektionsinfiltrat in wenigen Portalfeldern, intakte Grenzlamelle
Moderat (Grad 2)	Rejektionsinfiltrat in den meisten Portalfeldern bzw. allen Grenzlamellen
Schwer (Grad 3)	Wie bei "moderat" mit Durchbrechen der Grenzlamellen zum Parenchym, perivenuläre Hepatozytennekrose

Tabelle 1: Die Gradeinteilung der akuten zellulären Rejektion (Banff-Schema) (1,16)

Die histopathologischen Charakteristika der akuten Rejektion umfassen die portale Entzündung, Gallengängläsionen und die venöse Entzündung (Tabelle 2). Zwei von diesen Kriterien müssen vorliegen, um die Diagnose einer akuten Rejektion zu stellen. Außerdem weisen eine erhöhte Anzahl eosinophiler Granulozyten im portalen Entzündungsinfiltrat ebenso wie Mottenfraßnekrosen auf eine schwere Form hin (31). Die Histopathologie dient nicht nur der Diagnostik der akuten Rejektion nach Transplantation, sondern auch der histopathologischen Analyse der Spenderleber. Bei einer histopathologischen Analyse der Spenderleber werden mehr als 50% möglicher vorliegender Veränderungen gefunden. Die häufigste Veränderung ist die makrovaskuläre Leberzellverfettung. Die Steatosis hepatis wird bei einer Verfettung

< 30% als mild, 30 bis 60% als mäßig, > 60% als schwer graduiert. Ob der Grad der Steatosis den Transplantationsverlauf beeinflusst, ist umstritten. Weitere Befunde, die im Rahmen einer histopathologischen Untersuchung der Spenderleber erhoben werden, umfassen mikrovaskuläre Verfettung, portale Entzündung, vermehrte Eisenspeicherung, Granulome unklarer Ätiologie und Speicherung von α_1 -Antitrypsin (16).

Kategorie	Kriterien	Score
Portale Entzündung	Lymphozytäres Entzündungsinfiltrat in nicht-erweiterten Portalfeldern	1
	Verbreiterung der meisten oder aller Portalfelder durch gemischtes Entzündungsinfiltrat mit Lymphozyten, wenigen Blasten, Neutrophilen und Eosinophilen	2
	Ausgeprägte Verbreiterung der meisten oder aller Portalfelder durch gemischtes Entzündungsinfiltrat mit Lymphozyten, vielen Blasten, Neutrophilen und Eosinophilen mit Durchbruch zum Parenchym	3
Gallengang-entzündung / -zerstörung	Wenige Gallengänge werden von Entzündungszellen umgeben und infiltriert, geringe reaktive Veränderungen wie verschobene Kern-Zytoplasma-Relation	1
	Die meisten Gallengänge sind entzündlich infiltriert. Degenerative Veränderungen mit Kernpleomorphie, gestörter Polarität und vakuolisiertem Zytoplasma	2
	Wie bei Score 2 mit Befall aller Gallengänge und fokaler Zerstörung des Gallenganglumens	3
Venöse endotheliale Entzündung	Subendotheliales lymphozytäres Infiltrat in einzelnen, aber nicht in der Mehrheit der portalen oder zentralen Venolen	1
	Subendotheliales Infiltrat in vielen oder allen portalen oder zentralen Venolen	2
	Wie bei Score 2 mit Extension in das perivenuläre Parenchym mit Hepatozytennekrosen	3

Tabelle 2: Histopathologische Charakteristika der akuten zellulären Rejektion (1, 16)

Außer der akuten zellulären Rejektion sind bei einer histopathologischen Untersuchung andere Transplant-assoziierte Befunde zu erkennen, wie z.B. der Ischämie-/Reperfusionsschaden. Dieser entwickelt sich meist in den ersten 48

Stunden nach Transplantation und ist auf die immunologische Antwort auf die Reperfusion nach kalter Ischämie zurückzuführen. Nach Reperfusion kommt es zum Zelltod und zur Ablösung der sinusoidalen endothelialen Zellen, was zum Anlocken der neutrophilen Granulozyten und zur Aktivierung des Komplementsystems führt. Dieser Prozess verstärkt den Endothelschaden. Histologisch umfassen die Preservations-/Reperfusionsschäden Zellballonierung, Einzelzellnekrosen und Apoptosen in Form azidophiler Körperchen, Aggregationen neutrophiler Granulozyten und Cholestase. Gelegentlich finden sich auch konfluierende Nekrosen (16).

Eine differentialdiagnostische Herausforderung ist die Unterscheidung zwischen einer akuten Rejektion und einer akuten Hepatitis C-Reinfektion sowie einer Kombination beider Erkrankungsbilder (47). Die Unterscheidung zwischen einer akuten zellulären Rejektion und einer Hepatitis C-Reinfektion ist wichtig, da unterschiedliche Therapieansätze für diese Erkrankungen angewandt werden (20). Während bei einer akuten Rejektion ein gemischtes entzündliches Infiltrat dominiert, ist mononukleäres Infiltrat das Hauptcharakteristikum einer Hepatitis-Reinfektion. Außerdem zeigt sich bei einer Hepatitis-Reinfektion eine geringere Beteiligung der Gallengänge. Die Polymerase-Ketten-reaktion (PCR) ist ein hilfreiches Zusatzinstrument für die Unterscheidung zwischen Virus-Reinfektion und einer akuten Rejektion (16).

Die Diagnostik der akuten zellulären Rejektion mittels histopathologischer Untersuchung ist heutzutage unvermeidbar. Allerdings ist diese Diagnostik in der Regel erst bei klinischen Auffälligkeiten und zum Zeitpunkt der Rejektion durchführbar, da sie die Gewinnung von Gewebematerial aus dem Lebertransplantat voraussetzt. Die Leberbiopsie ist ein relativ invasiver Eingriff, welcher Komplikationen wie Nachblutung, Schädigung des Transplantatparenchyms und anderer Organe sowie ein erhöhtes Thromboembolie-Risiko nach sich ziehen kann (42). Außerdem kann es bei der histologischen Differenzierung zwischen akuter zellulärer Rejektion und rezidivierender Hepatitis C oder anderer postoperativen Komplikationen zu einer Fehlinterpretation kommen.

Aus diesen Gründen sind Verfahren zur nichtinvasiven Diagnostik einer akuten zellulären Rejektion, welche dieses Ereignis möglichst vor dem klinischen Auftreten anzeigen, erstrebenswert. Idealerweise sollten solche Biomarker im Serum bestimmt werden können. Eine spezifische und sensitive Detektionsmethode für Proteinbiomarker im Serum könnte nach einer Transplantation oder sogar bereits vor einer Transplantation Auskunft darüber geben, ob eine akute Rejektion auftreten wird.

Darüber hinaus könnte die Analyse dieser Biomarker die Beurteilung des individuellen Risikos für ein Transplantatsrejektion und dementsprechend eine individualisierte Anpassung der Immunsuppression ermöglichen.

1.4 Proteinbiomarker in der Transplantationsmedizin

Trotz der Optimierung der immunsuppressiven Therapie und verbesserten Operationstechniken kommt akute zelluläre Rejektion weiterhin vor. Histopathologische Untersuchungen sind erst bei klinischem Verdacht und zum Zeitpunkt einer Rejektion indiziert. Deshalb ist eine frühe, nicht-invasive Detektion einer akuten zellulären Rejektion anhand von Biomarkern in Serumproben wünschenswert.

Unter dem Begriff Biomarker versteht man gemäß der „*Biomarker Definition Working Group*“ ein objektiv messbares und evaluiertes Charakteristikum als Indikator für physiologische, pathologische oder pharmakologische Reaktion auf eine therapeutische Intervention (44).

Ein Biomarker für die Detektion einer akuten zellulären Rejektion sollte hochspezifisch und -sensitiv sowie nicht-invasiv, schnell verfügbar und kostenfreundlich sein. Darüber hinaus sollte es klinisch bereits validiert sein. Die Identifizierung von Biomarkern ist ein Prozess, welcher aus mehreren Phasen besteht.

Heutzutage werden in Studien zur Etablierung von Biomarkern Informationen aus verschiedenen Ebenen gesammelt. *Single Nucleotid Polymorphism* (SNP), epigenetische Mechanismen bezüglich der mRNA, microRNA (miRNA), Proteinen, Peptiden, Antikörpern und Metaboliten können als Biomarker für die Transplantationsmedizin relevant sein.

Um die Aussagekraft potentieller Biomarker zu ermitteln, sollten nach der Entdeckung dieser Biomarker mehrere Validierungsphasen erfolgen, z. B. durch prospektive Studien. Die wichtigsten Phasen in der Entwicklung von Biomarkern sind die Entdeckungs- und Validierungsphase (Abb. 1). In der Entdeckungsphase stehen biostatistische Analysen und multiple molekulardiagnostische Plattformen bzw. Datenbanken zur Verfügung. Diese Datenbanken, wie z. B. *Gene Expression Omnibus* (GEO), enthalten hunderte Kandidaten für Biomarker und erlaubten beispielsweise die Verwendung der verfügbaren Daten für die Entdeckung eines Biomarkers.

Einer Entdeckungsphase folgen mindestens zwei Validierungsphasen. In der Validierungsphase wird ein initialer Biomarker in einer Studie mit meist 50 - 100 Teilnehmern unabhängig von den Proben analysiert. Danach erfolgt die Validierungsphase auf der klinischen Ebene, um die Sensitivität, Spezifität sowie die negativen und positiven prädiktiven Werte eines Biomarkers zu identifizieren.

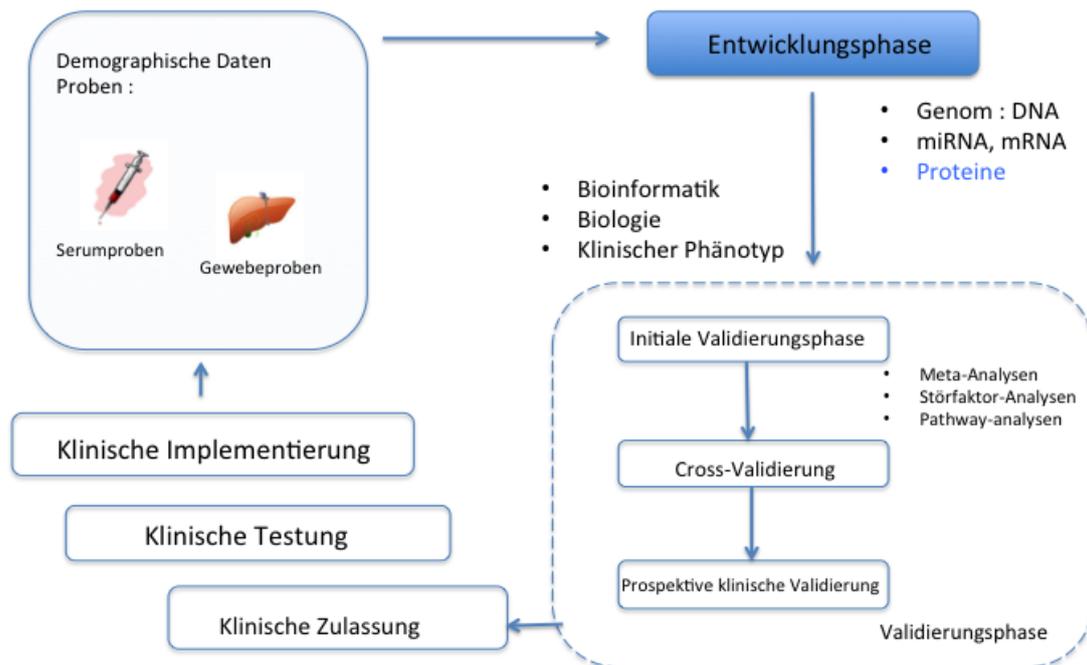


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Biomarkerstudie, modifiziert nach Roedder et al. (61)

Aktuell klinisch verfügbare Biomarker basieren zumeist auf Proteinen, welche im Blut gemessen werden können. Beispiele sind der Serum-Kreatininwert nach erfolgter Nierentransplantation und Transaminasenwerte nach einer Lebertransplantation. Diese Marker sind leider relativ unspezifisch und erst im Fall einer bereits stattfindenden akuten Rejektion erhöht. Daneben können beispielsweise eine akute virale Hepatitis, eine medikamentös-toxische Schädigung, eine Cholangitis oder Ischämie zu einem Anstieg der Transaminasen führen. Die akute zelluläre Rejektion ist die Folge einer komplexen Immunantwort auf der Molekularebene, bei der Zytokine und Chemokine eine große Rolle spielen. Da die akute zelluläre Rejektion eine T-Zellen-vermittelte Reaktion ist, ist es sinnvoll, Chemokine und Zytokine, die bei einem Entzündungsprozess involviert sind, zu untersuchen. Außerdem kann durch die Identifizierung von Biomarkern auf molekularer Ebene die grundlegende Ursache eines Transplantatversagens verstanden werden.

Es wird postuliert, dass prädisponierende epigenetische Signaturen einer akuten Rejektion nach LTx aus Blutproben von Patienten identifiziert werden können. Im Blut spielen sich immunologische Prozesse ab, welche auf epigenetischer Ebene diagnostiziert werden können, somit bietet sich das Blut als Medium für die Messungen von epigenetischen Signaturen an. Zytokine und Chemokine sind potentielle Biomarker, die im Bereich der Nieren-, Herz-, Lungen- und Lebertransplantation intensiv untersucht werden. Diese Moleküle regulieren die Differenzierung, Migration und Proliferation der Immunzellen während einer akuten Rejektion. Biomarker auf Chemokinebene sind bislang nicht für die klinische Diagnostik etabliert oder befinden sich derzeit in der Phase der klinischen Zulassung oder klinischen Testung.

In einigen Arbeiten wurden einzelne Biomarker zur Diagnose einer akuten Rejektion nach Lebertransplantation beschrieben. *Kobayashi et al.* zeigten, dass guanylate-binding protein 2 – mRNA (GBP2-mRNA) in den Leukozyten von lebertransplantierten Patienten eine Unterscheidung zwischen einer akuten Rejektion und den anderen Leberdysfunktionen nach LTx erlaubt (38). Andere Autoren beobachteten Divergenzen bezüglich der Rekonstitution von killer cell immunoglobulin-like receptor-natürliche Killerzellen (KIR2D⁺-NK-Zellen) und von KIR2D⁺ CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen nach LTx. Während eine späte Regeneration der KIR2D⁺-NK-Zellpopulation mit dem Auftreten einer akuten Rejektion einherging, korrelierte der frühe Anstieg der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellpopulation mit einer zufriedenstellenden frühen Transplantatfunktion (46).

Testro et al. bestimmten die Expression von TLR2 und TLR4 (Toll-like receptor) in Monozyten des Blutes (PBMCs) lebertransplantierten Patienten (69). Bereits vor LTx zeigte sich bei Patienten, die später eine Rejektion entwickelten, eine verstärkte TLR-4-abhängige Immunantwort einhergehend mit einer erhöhten Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF-alpha, welche für die Aktivierung alloimmuner T-Zellen verantwortlich ist.

Bereits 1995 konnte in einer pädiatrischen Lebertransplantationskohorte eine Korrelation des von T-Zellen sezernierten Zytokins IL-5 mit akuten Abstoßungsreaktionen belegt werden. Die höchsten IL-5 Spiegel wurden in Patienten mit akuter Rejektion (in 15 von 16 Patienten) drei Tage vor der histologischen Bestätigung durch eine Biopsie sowohl im Serum als auch in der Galle gemessen. Die

erhöhte IL-5-Produktion war mit einer erhöhten Anzahl peripherer eosinophiler Granulozyten assoziiert (40).

Ebenso wurde die Signifikanz erhöhter IL-6-Konzentrationen in der Galle bei akuter Abstoßung nach Lebertransplantation beschrieben, während sich ein Anstieg der IL-6-Konzentration im Blut als weniger spezifisch erwies. *Kita et al.* (35) konnten jedoch zeigen, dass erhöhte IL6-Serumkonzentrationsspiegel bei Patienten nach LTx eine akute zelluläre Rejektion vorhersagen konnten. IL-6 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das z. B. zur Entwicklung von rheumatoider Arthritis oder anderer Autoimmunerkrankungen beiträgt (33).

Warlé et al. zeigten den Zusammenhang von akuten Rejektionen und einem Anstieg der soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) im Serum sowie IL-8 in der Galle, konnten aber eine höhere Spezifität der Zytokinbestimmung in der Galle gegenüber einem Nachweis im Serum nicht bestätigen. In einer weiteren Studie dieser Arbeitsgruppe zur Bedeutung von Zytokin-Genpolymorphismen konnte ein IL-10-Polymorphismus als genetischer Risikofaktor für eine akute Rejektion nach Lebertransplantation identifiziert werden (72).

Chen et al. (13) haben drei Proteinbiomarker aus einer Metaanalyse biopsiebasierter Microarrays bei Patienten nach Nieren- und Herztransplantationen untersucht. Die Proteinbiomarker waren CXCL9, CD44 und CD31, welche im Serum der Herz- und Nierentransplantationspatienten bei einer akuten Rejektion erhöht waren. CXCL9 präsentiert eine Gruppe von IFN-induzierenden CXC-Chemokinen. Es ist eine chemisch hochpotente Substanz, die mononukleare Zellen wie aktivierte T-Zellen, B-Zellen und natürliche Killerzellen (NK) anlockt (9). CD31 spielt eine entscheidende Rolle bei der Beseitigung von gealterten neutrophilen Granulozyten. Es kommt in fast allen Oberflächen von Endothelzellen, Thrombozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten vor. CD44 ist ein transmembranes Typ-I-Glykoprotein, das in vielen Geweben, z. B. Leukozyten, epithelialen und endothelialen Zellen, exprimiert wird (18). Die Interaktion zwischen Hyaluronat und CD44 spielt eine entscheidende Rolle bei der Migration von Lymphozyten aus Blutgefäßen in die extrazelluläre Matrix, in der Entzündungsprozesse stattfinden.

Chen et al. (13) hat jedoch keine Validierung dieser Proteinbiomarker bei Lebertransplantationspatienten durchgeführt. Aufgrund der Charakteristika der von *Chen et al.* (13) und *Kita et al.* (35) untersuchten Biomarker wäre es interessant zu

untersuchen, ob diese Proteinbiomarker zur Diagnostik einer akuten zellulären Rejektion validiert werden können.

1.5 Arbeitshypothese und Aufgabenstellung

Die vorliegende Arbeit geht von der Hypothese aus, dass epigenetische Signaturen einer akuten Rejektion nach LTx aus Serumproben von Patienten identifiziert werden können. Diese Annahme orientiert sich an den Arbeiten von *Chen et al.* (13) und *Kita et al.* (35), in welchen Proteine mittels einer Metaanalyse biopsiebasierter Microarrays mit Probematerial nach Nieren- und Herztransplantation untersucht wurden. Die Arbeitsgruppe selektierte drei Proteinbiomarker, die im Serum von Patienten nach Nieren- oder Herztransplantation prospektiv validiert wurden: nämlich die Proteine Chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (CXCL9), Cluster of Differentiation 44 (CD44) und Cluster of Differentiation 31 (CD31). Außerdem wird in der vorliegenden Arbeit Interleukin-6 (IL-6) untersucht und mit den anderen Proteinen verglichen, die in der Studie von *Kita et al.* (35) vor und während einer akuten zellulären Rejektion bei Lebertransplantation signifikant erhöht waren.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Proteinbiomarker im Serum zur Diagnostik einer akuten Rejektion nach Lebertransplantation zu identifizieren und zu validieren. Durch die Validierung dieser Proteinbiomarker könnte ein neuer, nichtinvasiver Diagnostikweg für akute zelluläre Rejektion nach LTx etabliert werden. Darüber hinaus könnten diese Proteinbiomarker eine akute Rejektion sogar vor der LTx voraussagen und helfen, die individuellen Risiken der Patienten richtig einzuschätzen und das Patientenmanagement nach einer LTx zu optimieren.

Um die Studienziele zu erreichen, wurden Serumproben von Patienten nach LTx aus zwei Zentren in Deutschland gesammelt. Anschließend wurden die Proteine in den Serumproben mittels Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestimmt. Abschließend wurden die Ergebnisse der ELISA-Bestimmung statistisch analysiert. Dieses beinhaltet parametrische (Student's t-Test) und nichtparametrischer Tests (Mann-Whitney-U-Test) sowie eine multivariate Analyse (One-Way und Two-Way ANOVA) und den Survival-Test.

2 Materialien und Methoden

2.1 Selektion der Proteinbiomarker und Ablauf der Studie

Zur Selektion der Proteinbiomarker orientiert sich diese Arbeit an den Ergebnissen der Studie von Chen et al. (13). Sie haben ein bioinformatisches Verfahren entwickelt, welches öffentlich verfügbare microArray-Datensätze nutzt. Das Verfahren basiert auf der Koppelung mehrerer cross-organ mRNA-Datensätze, welche während Rejektion in verschiedenen Organen in gleicher Weise reguliert sind. Die durch diese Gene regulierten Proteine wurden mittels ELISA in Serumproben gemessen.

In der Studie zeigten Chen et al (13) anhand dieser Methode, dass 45 Gene für akute Rejektion hochreguliert werden. Von diesen 45 hochregulierten Genen waren für 10 Proteine ELISA-Sets kommerziell verfügbar. Die Ergebnisse dieser ELISA-Untersuchungen ergaben die 3 Proteine CXCL9, CD44 und CD31, welche bei einer akuten Rejektion nach Nieren- und Herztransplantation hochreguliert werden. Diese Proteine wurden noch einmal bei herztransplantierten Patienten mittels ELISA validiert (Abb. 2).

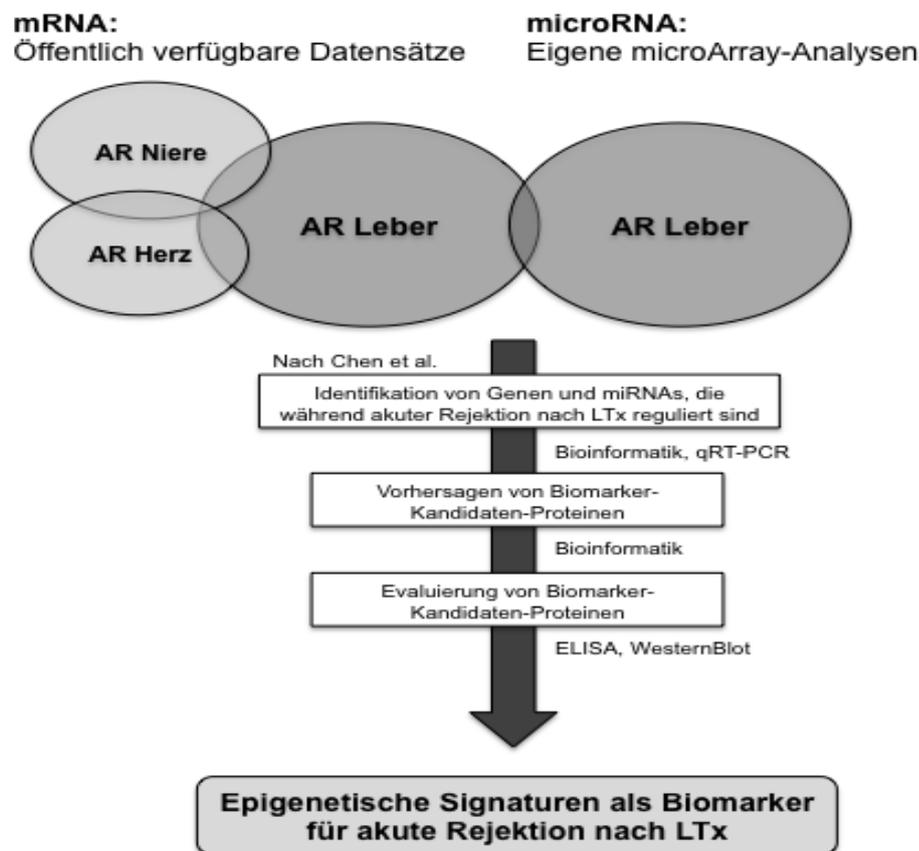


Abbildung 2: Identifikation von Proteinbiomarkern modifiziert nach Chen et al. (13)

Zudem wurden die Proteine CXCL9, CD44 und CD31 in dieser Arbeit mit dem Protein IL-6 verglichen. *Kita et al.* hatten gezeigt, dass IL-6 im Blut präoperativ und während der Rejektion bei Z.n Lebertransplantation erhöht war (35). In der Studie konnten sie nachweisen, dass der IL-6-Serumspiegel bei Patienten vor LTx (n=169) signifikant erhöht war im Vergleich zu gesunden Probanden als Kontrollgruppe. Während der Rejektion war der IL-6-Serumspiegel ebenfalls erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. In dieser Arbeit wurden Patienten selektiert, die sich einer orthotopen Lebertransplantation in zwei Transplantationszentren in Deutschland von 06/2011 bis 12/2012 unterzogen haben. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Charité, EA2/123/10, genehmigt. Die Einschlusskriterien waren männliche und nicht schwangere weibliche Patienten, die einwilligungsfähig und mindestens 18 Jahre alt sind. Die Ausschlusskriterien sind die Nichterfüllung der Einschlusskriterien. Alle Lebertransplantate wurden von Spendern nach Hirntod entnommen. Re-Transplantationen wurden aus der Auswertung ausgeschlossen. Die Organisation bzw. die Durchführung der Probenentnahme erfolgte durch das Studienteam der experimentellen Chirurgie über ein Studientelefon. Von dem Studienteam wurden bis spätestens 48 Stunden nach LTx die Serumproben vom Tag 0 zur Verarbeitung und Lagerung abgeholt und die weiteren Blutentnahmen organisiert. Es wurden perioperative Serumproben sowie nach bestimmtem Zeitpunkt gesammelte Serumproben gewonnen (Abb. 3). Zeitpunkte der Serumprobengewinnung waren:

- Tag der LTx (Tag 0 / POD 0).
- Tag 1,3,7 (POD1, POD3, POD7) nach LTx.
- Tag 14 und 6. Woche (POD14, W6) nach LTx: erfolgt durch das Team der behandelnden Station (Organisation durch Studienteam).

Bei einer klinisch signifikanten akuten zellulären Rejektion wurde das Studienteam informiert und entsprechend Serumproben entnommen. Als eine klinisch signifikante akute zelluläre Rejektion wurde bezeichnet, wenn durch histologische Untersuchung von Leberbiopsien eine akute Rejektion nachgewiesen wurde. Leberbiopsien wurden bei einem klinischen Verdacht auf eine akute Rejektion, gekennzeichnet durch inadäquaten Anstieg oder Abfall der Transaminasewerte oder der Cholestasewerte, bei klinischer Indikation durchgeführt und nach dem Banff-Schema histopathologisch ausgewertet.

Das Immunsuppressionsprotokoll bestand aus Tacrolimus und Prednisolon. Der

Tacrolimusspiegel in der 1.-4. postoperativen Woche sollte ca. 6-10ng/mL und in der 5.-8. postoperativen Woche 5-8ng/mL betragen. Die initiale Dosis von Prednisolon war 40 µg/Tag. Prednisolon wurde bis zur 6. postoperativen Woche reduziert oder bei 5 mg/Tag belassen. Bei Unverträglichkeit gegen Tacrolimus wurde die Immunsuppression von Tacrolimus auf Cyclosporin umgestellt. Mycophenolate mofetil (MMF) wurde im Rahmen der Nachsorge zum immunsuppressiven Regime hinzugefügt. Keiner der eingeschlossenen Patienten erhielt eine Induktionstherapie.

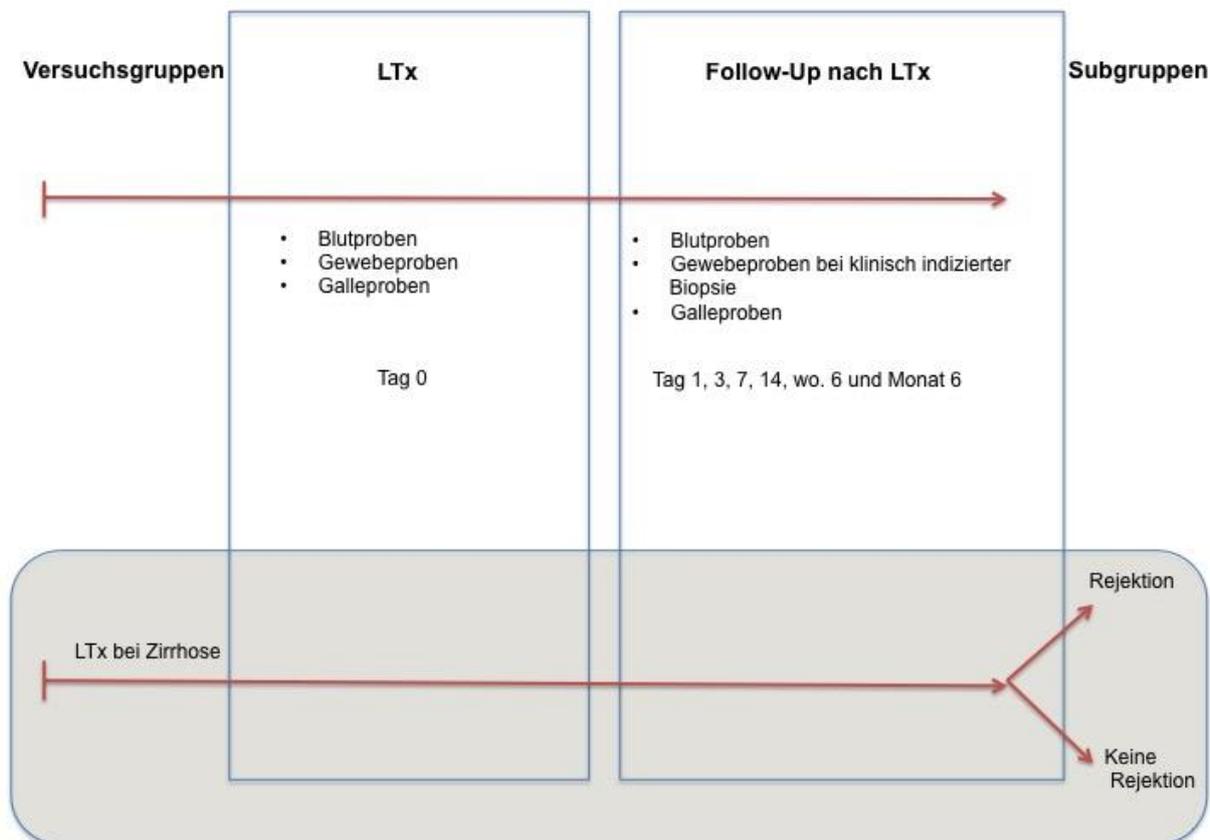


Abbildung 3: Ablauf der Studie

Als Beobachtungszeitraum waren die ersten sechs Monate nach Lebertransplantation definiert (Abb.3). Alle Patienten wurden in die *Rejektions-Gruppe* und *Nichtrejektions-Gruppe* eingeteilt. Die *Nichtrejektions-Gruppe* wurde nochmal eingeteilt in die *Ohne Rejektion/Ohne Biopsie-Gruppe* und die *Ohne Rejektion/Biopsie-Gruppe*. Die *Ohne Rejektion/Ohne Biopsie-Gruppe* war eine Gruppe von Patienten, die 6 Monate nach LTx keine Auffälligkeiten zeigten. Patienten, die aufgrund klinischen Verdachts einer akuten zellulären Rejektion bzw. einer Erhöhung der laborchemischen Werte biopsiert wurden, aber keinen histologischen Nachweis einer akuten zellulären Rejektion

hatten, gehörten zur *Ohne Rejektion/Biopsie-Gruppe*.

In dieser Arbeit wurden vier Patienten ausgeschlossen, weil sie während der Studie retransplantiert werden mussten und/oder innerhalb von 7 Tage nach LTx verstorben sind. Außerdem wurden vier weitere Patienten, welche eine Kortisonstoßtherapie ohne histologischen Nachweis einer akuten Rejektion erhalten haben, von der Auswertung ausgeschlossen.

2.2 Verarbeitung und Lagerung der Patientenproben

Die Serumproben wurden zuerst bis spätestens 48 Stunden nach erfolgter LTx im Studienkühlschrank bei 4°C gelagert und dann vom Studienteam abgeholt. Anschließend erfolgte die Verarbeitung. Die Serumproben wurden bei 3000 rpm und 22°C für 10 Minuten mit dem Gerät *Thermo Scientific (Heraeus Multifuge 3SR+)* zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in 2 Kryo-Röhrchen 2 x 0,75mL abpipetiert. Alle Proben wurden anonymisiert, beschriftet und bei -80° C gelagert.

2.3 Sammlung und Archivierung von Patientendaten

Alle wichtigen und relevanten Patientendaten aus SAP und Patientenakte wurden durch das Studienteam in der LTx-miRNA-Datenbank archiviert.

2.4 Materialien und Geräte

In den Tabellen 3-6 sind die verwendeten Labormaterialien, Geräte und Computerprogramme aufgelistet.

Geräte	Hersteller
BIOREADER 3000 C / BIOCOUNTER System	BIO-SYS, Karben, Deutschland
Feinwaage (AC121A)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Kühlschränke (4°)	
pH-Meter (CG840)	Schott, Mainz, Deutschland
pH-Sonde (52000102)	Mettler-Toledo, Giessen, Deutschland
Sterilwerkbänke	Heraeus, Hanau, Deutschland
Ultratiefkühltruhe (-20°, -80°)	Sanyo, Moriguchi, Osaka, Japan
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Zentrifuge	Heraeus Multifuge 3SR+

Tabelle 3: Liste der Verwendeten Geräte

Laborutensilien	Hersteller
Serum Blutröhrchen (Gelb) Vacutainer	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Einfrierbox	Nalgene
Einwegpipetten	Bibby Sterikin Ltd., Stone, UK
Einwegpasteurpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96-Well Plates	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Falcon Tubes	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Feinpipetten Research	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Finnpipetten	Labsystems, Quickborn, Deutschland
Disposable Scalpel No. 20	
Glasbehälter	Duran Group GmbH, Deutschland
Pipettboy	Integra Biosciences, Chur, Schweiz (Fernwald, Deutschland)
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rührfisch / Gerät MR 3001 K	Heidolph
Kryo-Röhrchen	
Stickstoffbehälter	
Steriler Filter	Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland

Tabelle 4: Liste der verwendeten Laborutensilien.

Reagenzien und Lösungen	Hersteller
CXCL9 ELISA-Kits IL-6 ELISA-Kits	BD Bioscience Pharmingen, San Diego CA
CD44 ELISA-Set CD31 ELISA Set	abcam Cambridge UK
Coating Buffer 0,1 M bestehend aus: NaHCO ₃ 7,13 g Na ₂ CO ₃ 1,59 g Aqua dest., 1 L pH auf 9,5 mit 10 N NaOH eingestellt	Boca Scientific
PBS-Lösung bestehend aus: 10% FBS pH 7,0 NaCl 80 g Na ₂ HPO ₄ 11,6 g KH ₂ PO ₄ 2 g KCL 2 g Aqua dist., 10 L	Fisher Scientific GmbH
Wash Buffer bestehend aus: PBS Tween-20 0,05%	Fisher Scientific GmbH
Substratlösung bestehend aus: Tetramethylbenzidine (TMB) Hydrogenperoxid	Sigma-Aldrich

Stopplösung: H ₃ PO ₄ 1 M H ₂ SO ₄ 2 N	Fisher Scientific GmbH
Standard diluent Buffer (CD44, CD31)	Abcam Cambridge UK
Wash Buffer (CD44, CD31)	Abcam Cambridge UK
Biotinylated - anti CD44 Biotinylated – anti CD31	Abcam Cambridge UK
Streptavidin-HRP	Abcam Cambridge UK

Tabelle 5: Liste der verwendeten Reagenzien und Lösungen.

Software	Hersteller
CellQuest® Pro ver. 5.2.1	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FileMaker Pro 13	FileMaker, Inc. Santa Clara, CA, USA
GraphPad Prism®, ver. 4	GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
GraphPad InStat®, ver. 3.0	GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA

Tabelle 6: Liste der verwendeten Computersoftware.

2.5 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) gehört zur Gruppe der antikörperbasierten Nachweisverfahren. Das Verfahren basiert auf einer enzymatischen Farbreaktion und gehört somit zu den enzymatischen Immunadsorptionsverfahren. Mit Hilfe von ELISA sind Proteine, Virus und niedermolekulare Verbindungen wie z.B. Hormone und Toxine in einer Probe nachzuweisen. Es gibt drei unterschiedliche Typen bzw. Techniken von ELISA: Direkte, Sandwich- und kompetitive ELISA. In dieser Arbeit wurde die Sandwich-ELISA-Technik verwendet. Bei Sandwich-ELISA werden zwei Antikörper verwendet, die spezifisch an das getestete Antigen binden. Der erste Antikörper wird meist an Mikrotiterplatten mit 96 wells bzw. Vertiefungen gebunden und inkubiert. Danach wird das nachzuweisende Antigen zugegeben und nach einer bestimmten Inkubationszeit gewaschen. Dadurch werden die nichtgebundene Bestandteile der Proben entfernt. Im nächsten Schritt wird der Detektionsantikörper zugegeben. Der Detektionsantikörper bindet an das Antigen und es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Dann kann das Antigen detektiert und quantifiziert werden (Abb. 4). In dieser Arbeit wurden kommerzielle ELISA-Sets für IL-6 und CXCL9 der Firma Beckton Dickison (BD Bioscience Pharmingen, San Diego USA) und ELISA-Kits für

CD44 und CD31 der Firma abcam (Cambridge, UK) verwendet.

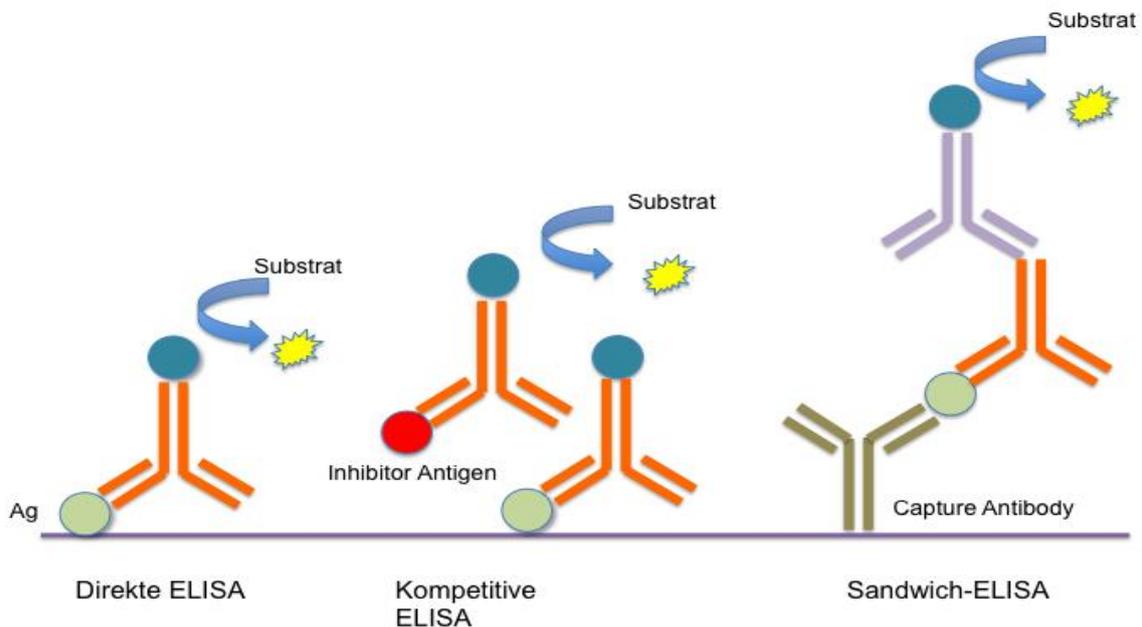


Abbildung 4: Nachgezeichnet und modifiziert nach Rassow, Joachim, *Biochemie Duale Reihe* Georg Thieme Verlag. 2008. (59)

Die ELISA-Set von *BD OPtEIA* beinhaltet *Coating Buffer*, *Assay Diluent*, Substratreagenz A und B, Stopplösung und 20 X Wash Buffer.

Coating Buffer

Für die Herstellung des Coating Buffer (0,1 M) wurden 7,13 g Natriumbicarbonat (NaHCO_3) und 1,59 g Natriumcarbonat (Na_2CO_3) mit destilliertem Wasser auf 1,0 L aufgefüllt und gerührt. Danach wurde der pH-Wert auf 9,5 mit 10N Natriumhydroxid (NaOH) eingestellt. Diese Lösung ist für 7 Tage verwendbar und zwischen 2° bis 8° zu lagern.

Assay Diluent

Als *Assay Diluent* wurde *Phosphate buffer saline* (PBS) mit 10% Fetal bovine serum (FBS) mit pH 7,0 verwendet. Die Lösung wird wie folgt hergestellt: 80,0 g Natriumchlorid (NaCl), 11,6 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4), 2 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) und 2,0 g Kaliumchlorid (KCl) wurden auf 10 L mit destilliertem Wasser aufgefüllt und gerührt. Anschließend wird der pH-Wert auf 7,0

eingestellt.

Wash Buffer

Für diese Lösung wird PBS in 0,05% Tween-20 gerührt, bis eine klar durchsichtige Lösung entsteht.

Substrat- und Stopplösung

Als Stopplösung wird entweder 1 M Phosphorsäure (H₃PO₄) oder 2 N Hydrogensulfat (H₂SO₄) verwendet. Als Substratlösung werden Tetramethylbenzidine (TMB) von Firma Becton Dickison (San Diego, USA) und Hydrogenperoxid benützt. Die Herstellung von TMB ist wie folgt: Die TMB-Substrateagenz besteht aus 2 Reagenzien. Reagenz A, welche klar und farblos ist, enthält Hydrogenperoxid. Reagenz B enthält 3,3',5,5' TMB. Die Substratlösung wird 15 Minuten vor der Verwendung vorbereitet, indem man das gleiche Volumen von Reagenz A und Reagenz B mischt. Für eine 96-Wells-Platte wird 12mL TMB-Substrat benötigt. Bei der Mischung der Reagenzien wird die Lösung klar bis schwach blau.

2.5.2 Standardlösungsvorbereitung für IL-6

Zunächst wird die Standardlösung auf die Zimmertemperatur erwärmt. Danach wird diese mit 1,0 mL deionisiertem Wasser gemischt. Gleich danach werden 50µL per Aliquots der Standardlösung aufgeteilt und in -80° C gelagert. Für die Assay werden 300 pg/mL Standard aus dem 18 ng/mL Standardstock vorbereitet. Dieser Standardstock wird dann 1:250 verdünnt. Danach werden 300µL Assay Diluent in 7 Tuben pipettiert und jeweils mit 300 pg/mL, 150 pg/mL, 75 pg/mL, 37,5 pg/mL, 18,8 pg/mL, 9,4 pg/mL und 4,7 pg/mL beschriftet. Die erste Tube enthält 300 pg in 640µL *Assay Diluent*, welches aus 10,67µL Stockstandard und 629,33µL Assay Diluent besteht. Anschließend wird die Standardkonzentration durch Abpipettieren von 300µL des Standards in die nächste Tube vorbereitet.

2.5.3 Standardlösungsvorbereitung für CXCL9

Die Standardlösungsvorbereitung für CXCL9/MIG ist identisch. Es werden aber aus 80ng/mL Standardstock verdünnt 1:250 2000 pg/mL, 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL und 62,5 pg/mL, 31,25 pg/mL und 15,62 pg/ml vorbereitet.

2.5.4 Probenvorbereitung für IL-6 und CXCL9

Die in -80°C gelagerten Serumproben werden zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut. Danach erfolgt die Probenverdünnung. Für IL-6 ELISA werden die Serumproben nicht verdünnt, während sie für CXCL9/MIG ELISA mit 1:10 auf $200\mu\text{L}$ verdünnt werden. Alle Serumproben werden in *Assay Diluent*-Lösung verdünnt und auf einmal verbraucht. Die Serumproben, die für die Messung verwendet wurden, sind alle Rejektionsserumproben sowie alle Proben, die bis zum Tag der Rejektion entnommen wurden. Außerdem werden auch Proben gemessen, die als Kontrolle dienen. In dieser Arbeit werden die Proben als Kontrollprobe bezeichnet, bei denen es keine klinische Indikation für eine akute Rejektion nach LTx gibt.

2.5.5 ELISA-Prozedur für IL-6 und CXCL9

Zunächst erfolgt das *Coating* von 96-Well-Platten. Die Platten werden mit $100\mu\text{l}$ von *Capture*-Antikörper hineingeschichtet, welche in Coating Buffer abgelöst wurden. Danach werden die Platten für eine Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend werden die Platten drei Mal mit $300\mu\text{L/well}$ *Wash Buffer* gewaschen. Nach dem dritten Waschen werden die Platten getrocknet. Die Platten werden danach mit $200\mu\text{l/well}$ *Assay Diluent* geblockt und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Die Platten werden nochmal mit $3 \times 300\mu\text{L/well}$ *Wash Buffer* gewaschen. Nun wird die Standardlösung wie oben genannt (3.5.2. Standardvorbereitung) in *Assay Diluent* vorbereitet und in die entsprechenden Wells pipettiert. In dieser Arbeit werden die Patientenproben zweimal gemessen. Jede Well wird mit $100\mu\text{l}$ Serumproben gefüllt; danach werden die Platten zugedeckt und für 2 Stunden inkubiert. Nach 2 Stunden Inkubationszeit werden die Platten aspiriert und erneut mit *Wash Buffer* gewaschen. Es erfolgt 5-maliges Waschen. Nach dem Waschen der Platten werden in alle Wells $100\mu\text{l}$ *Working Detector* pipettiert. Der *Working Detector* besteht aus *Detection*-Antikörpern und Streptavidin-HRP-Reagenz. Anschließend sind die Platten zu bedecken und für eine Stunde bei Raumtemperatur zu inkubieren. Danach aspiriert man die Platten und wäscht sie daraufhin für 7 Male. Jetzt werden in alle Platten $100\mu\text{l}$ TMB pipettiert und für maximal 15 Minuten bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. In diesem Schritt zeigt sich die Farbveränderung der Proben und

Standardlösung in den Platten bläulich. Anschließend wird 50 µl Stopplösung auf alle Platten pipettiert. Schließlich werden die Platten mit dem Gerät *BGM LABTECH FLUOstar OPTIMA* bei 450nm innerhalb von 30 Minuten nach der Stoppreaktion gemessen.

2.5.6 Pufferlösungen für CD44 und CD31

Die ELISA-Kits für CD44 (Cat.Nr. ab45913) und CD31/PECAM-1 (Cat.Nr. ab45910) der Firma *abcam* (Cambridge, UK) beinhalten 2x 96 Well-Platten, Plattenbedeckungen, 4 Röhrchen 10 ng/mL Standard, 4 Kontrollröhrchen, 1 Flasche (25 mL) Standard *Diluent Buffer*, 2 Röhrchen (je 0,4 mL) anti-CD44, 2 Röhrchen (je 400µL) anti-CD31, 1 Flasche (13 mL) Antibody-Diluent, 4 Röhrchen (je 5µL) Streptavidin-HRP, 2 Flaschen (je 23 mL) HRP Diluent, 2 Flaschen (je 10mL) Wash Buffer, 1 Flasche (24 mL) chromogen TMB und 2 Flaschen (je 11 mL) Stoppreagenz H₂SO₄.

Standard Diluent Buffer

Das vorgefertigte 10X Standard Diluent Buffer muss in einem Verhältnis von 10:1 mit destilliertem Wasser vor der Verwendung verdünnt werden.

Wash Buffer

Das 200X Wash Buffer-Konzentrat sollte in einem Verhältnis von 200:1 mit destilliertem Wasser gemischt werden. Für 1X *Wash Buffer* wird 10 mL *Wash Buffer*-Konzentrat mit 1.990mL destilliertem Wasser gerührt.

Kontrollösung

Die Kontrollösung muss mit 1X Standard *Diluent Buffer* gemischt werden. Vor der Verwendung sollte die Kontrollösung für 5 Minuten ruhen.

Biotinylated anti-CD44-Lösung und anti-CD31-Lösung

Das 1X Biotinylated anti-CD44 wird wie folgt hergestellt: Es werden für eine 96-Wellplatte 240µL anti-CD44 / CD31 mit 6,360µL Antikörper-Diluent aufgefüllt und gerührt.

Streptavidin-HRP-Lösung

Für 1X streptavidin-HRP-Lösung werden vor der Verwendung 150µL Streptavidin-HRP und 10mL HRP-Diluent gemischt.

2.5.7 Standardlösungsvorbereitung für CD44 und CD31

Für die erste Tube des Standards werden 10 ng/mL mit 1X Standard *Diluent Buffer* gemischt. Anschließend werden die Tuben 2-6 mit 100 µL 1X Standard *Diluent Buffer* aufgefüllt. Standard Nr.2 wird hergestellt, indem man 100 µL von Standard 1 zusätzliche Röhren pipettiert.

2.5.8 Probenvorbereitung für CD44 und CD31

Die bei -80°C gelagerten Serumproben werden zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut. Für CD44-ELISA werden die Proben 1:40 verdünnt, während sie für CD31 1:4 verdünnt werden.

2.5.9 ELISA-Prozedur für CD44 und CD31

Zuerst werden die Standardlösungen in die entsprechenden Wells pipettiert. Anschließend werden 50 µL Biotinylated anti-CD44/anti-CD31 in alle Wells hinzugefügt. Die Wells-Platten werden zugedeckt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wäscht man die Platten mit 300 µL 1X *Wash Buffer* in jede Well. Dieser Vorgang wird drei Mal wiederholt. Nach dem Waschen werden 100 µL 1X Streptavidin-HRP-Lösung dazugegeben und die Platten für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der nächste Schritt ist das Wäschen wie oben beschrieben. 100 µL TMB-Substrat werden in alle Wells pipettiert und danach werden die Platten im Dunkeln für maximal 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach gibt man 100 µL Stoppreagenz dazu und innerhalb von 30 Minuten nach Gabe der Stoppreagenz mit Spectrophotometer 450 nm werden die Proben gemessen.

2.6 Statistische Analysen

Die Serumproben der Rejektion-Gruppe und Nichtrejektion-Gruppe wurden miteinander verglichen. Alle statistischen Analysen in dieser Arbeit werden mit einem Computerprogramm *GraphPad Prism* Version 6.0e (La Jolla, CA, USA) und *SPSS* Version 22 (IBM, Ehningen, Deutschland) verarbeitet. Von allen Rohdaten werden

zunächst Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Alle Labordaten und Serumprotein-Biomarkerspiegel wurden mit dem Student's t-Test oder dem nichtparametrischen Mann-Whitney U Test bestimmt. Die klinische Charakteristik der Studienkohorte, wie z.B. Studienpopulation, Grunderkrankungen, Grad der Rejektion usw. werden anhand des Fischer exact Tests miteinander verglichen. Außerdem wird One-Way-ANOVA-Test beim Vergleichen zwischen zwei oder mehreren Gruppen verwendet. Um den Einfluss von der Gruppe und Zeitpunkt auf die Biomarker zu untersuchen, wird der Two-way ANOVA-Test durchgeführt. Eine Multivariate Logistikanalyse wird verwendet, um zu untersuchen, ob es Variablen gibt, die die Inzidenz von akuter zellulärer Rejektion stören könnten. *Receiver operator characteristic* (ROC) bestimmt die *Cut-Off*-Werte von Proteinbiomarker zwischen Patienten mit oder ohne Rejektion. Der Kaplan-Meier-Test wird außerdem verwendet, um Rejektion-Survival-Ratio zu bestimmen. P-Werte niedriger als oder gleich 0,05 sind statistisch signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Demographische und klinische Merkmale der Patientengruppen

Die Tabellen 7 und 8 zeigen die klinischen und demographischen Daten der Empfänger bzw. Patienten und Spender in der Studienkohorte sowie die perioperativen Labordaten. Es wurden 102 Patienten in die Arbeit eingeschlossen, 94 Patienten wurden statistisch analysiert. Von diesen erlitten 46 Patienten mindestens einmal eine klinisch signifikante, akute zelluläre Rejektion.

Kategorie	Variable	Rejektionsgruppe	Nichtrejektionsgruppe	p-Wert
Studienpopulation	Anzahl	46	48	
	Alter (Jahre)	53±11	57±10	0.0413
	Geschlecht (m/w)	31/15	38/10	n.s.
Grunderkrankung*	Virale Zirrhose	8	15	n.s.
	HCC	12	25	0.0119
	HCV	7	8	n.s.
	Alkoholische Zirrhose	15	10	n.s.
	PSC	2	2	n.s.
	Andere	6	6	n.s.
Empfängerdaten	MELD score	22±10	19±9	n.s.
	labMELD score	20±10	17±9	n.s.
	Dialyse	8	6	n.s.
	Body mass index [kg/m ²]	26.8±4.3	27.1±4.6	n.s.
Spender-und Transplantatdaten	Spenderalter [Jahre]	58±17	55±16	n.s.
	Kalteischämie [min.]	508±162	567±182	n.s.
	Warmischämie [min.]	50±12	48±16	n.s.
Grad der Rejektion ^T	Intermediat/mild	24	0	
	Moderat/schwer	22	0	

Tabelle 7: Klinische Charakteristik der Patienten in der Studie

*Patienten wurden nach der Grunderkrankung gruppiert, um den Einfluss der Pathologie auf ACR zu untersuchen.

^TACR-Grad: Grad der ersten akuten zellulären Rejektion nach LTx. MELD score: berechnet als 40 im Falle einer Listung mit HU-Status. labMELD score wurde nach Labordaten am Tag der Transplantation berechnet. Alle statistischen Analysen wurde mittels Student's t-Test/Mann-Withney-Test oder Exakter Test nach Fischer/Chi-Quadrat-Test durchgeführt.

Variable		Rejektionsgruppe	Nichtrejektionsgruppe	p-Wert
Aspartat aminotransferase [U/L]	POD 0	204±366	99±145	n.s.
	POD 1	872±723	1092±1106	n.s.
Alanine aminotransferase [U/L]	POD 0	119±203	83±172	n.s.
	POD 1	568±463	598±414	n.s.
Alkaline phosphatase [U/L]	POD 0	167±196	167±118	n.s.
	POD 1	93±74	94±52	n.s.
Gamma glutamyl transpeptidase [U/L]	POD 0	139±173	152±142	n.s.
	POD 1	81±64	102±65	n.s.
Bilirubin [mg/dL]	POD 0	7.9±10.4	6.5±11.8	n.s.
	POD 1	5.5±3.7	5.2±3.8	n.s.
International normalized ratio	POD 0	1.9±1.2	1.5±0.5	n.s.
	POD 1	1.6±0.3	1.6±0.3	n.s.
Kreatinin [mg/dL]	POD 0	1.4±1.1	1.1±0.9	n.s.
	POD 1	1.7±1.0	1.4±0.8	n.s.
C-reaktives Protein [mg/L]	POD 0	16±22	18±30	n.s.
	POD 1	60±31	48±28	n.s.
Glomerular filtration rate [mL/min]	POD 0	89.8±42.2	112.5±60.4	n.s.
	POD 1	73.5±40.2	90.6±53.4	n.s.
Erythrozyten [n/mL]	POD 0	3.6±0.7	3.8±0.7	n.s.
	POD 1	3.1±0.3	3.3±0.4	0.0180
Leukozyten [n/mL]	POD 0	8.4±5.2	6.9±3.1	n.s.
	POD 1	9.2±4.5	9.4±4.5	n.s.
Thrombozyten [n/mL]	POD 0	102.3±49.6	117.3±99.6	n.s.
	POD 1	49.8±23.5	69.4±69.5	n.s.
Lymphozyten [n/mL]	POD 0	1.3±0.7	1.2±0.7	n.s.
	POD 1	0.5±0.3	0.5±0.3	n.s.
Monozyten [n/mL]	POD 0	0.9±0.5	0.8±0.5	n.s.
	POD 1	0.5±0.3	0.6±0.4	n.s.
Neutrophilen [n/mL]	POD 0	5.4±3.7	4.7±2.8	n.s.
	POD 1	8.4±4.6	8.5±4.2	n.s.
Tacrolimusspiegel [µg/L]	POD 1	9.8±5.9	7.9±3.7	n.s.

Tabelle 8: Perioperative Labordaten in der Studie

Als Kontrollgruppe wurden 48 Patienten in zwei Gruppen eingeteilt. In der ersten Gruppe waren 24 Patienten, die keine klinisch signifikante Rejektion innerhalb der ersten 6 Monate nach LTx aufwiesen und deshalb nicht biopsiert wurden. Die restlichen 24 Patienten hatten mindestens eine Leberbiopsie aufgrund eines klinischen Verdachts auf eine akute zelluläre Rejektion.

Eine akute zelluläre Rejektion trat gehäuft um den siebten Tag nach LTx auf (Abb. 5). Zeigte sich eine Veränderung der laborchemischen Parameter (Erhöhung der Transaminase- und Cholestaseparameter) zwischen POD 6 und 8, wurde eine Biopsie durchgeführt, um eine akute zelluläre Rejektion zu bestätigen oder auszuschliessen. Hinsichtlich des Verlaufs der Transaminase- und Cholestaseparameter der Patienten 2 Tage vor der Biopsie zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Transaminasenwerte bei Patienten mit einer akuten zellulären Rejektion ($p < 0,05$), während die Cholestasewerte (GGT und Bilirubin) in allen untersuchten Gruppen keinen signifikanten Wert erreichen (Abb. 6). Als Kontrollgruppe (*Keine Biopsie/Keine Rejektion-Gruppe*) wurden Serumproben vom POD7 gemessen, da es aufgrund des Studiendesigns keinen festgelegten Zeitpunkt gab.

Wie in Tabelle 1 und 2 dargestellt, unterschieden sich das Alter des Empfängers, HCC als Grunderkrankung und die Anzahl der Erythrozyten am POD 1 signifikant mit p-Werten von 0,041, 0,012 und 0,018. Die anderen untersuchten Parameter, wie das Empfängergeschlecht, das MELD-Score, andere Grunderkrankungen, das Spenderalter, die kalte und warme Ischämie sowie laborchemische Parameter, einschließlich Tacrolimusspiegel am POD 0 und 1, unterscheiden sich nicht zwischen den Rejektions- und Nichtrejektionspatienten. Außerdem zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der postoperativen Immunsuppression (Tabelle 9).

Zeitintervall von Transplantation bis zur Biopsie

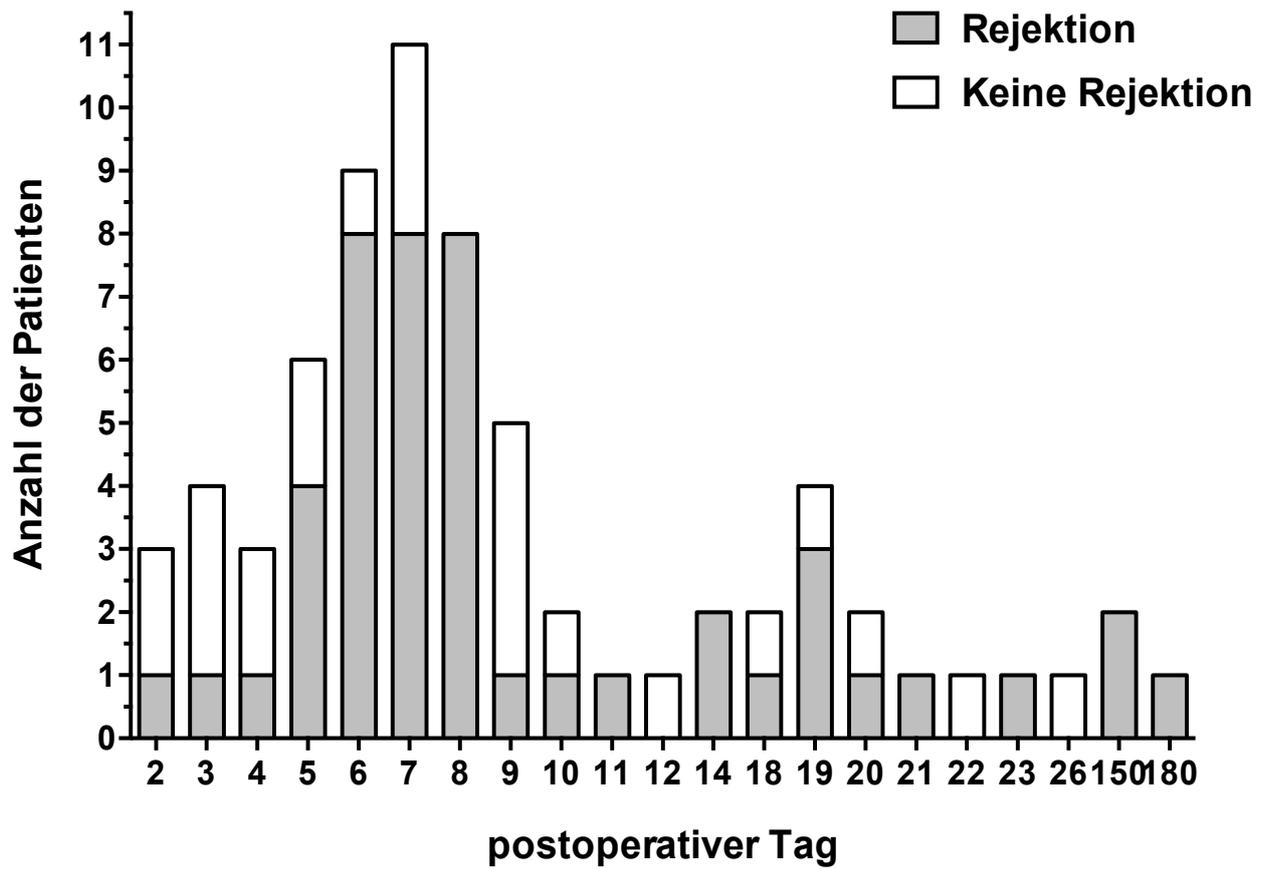


Abbildung 5: Zeitintervall von Transplantation bis zum Tag der Rejektion bzw. Biopsie.

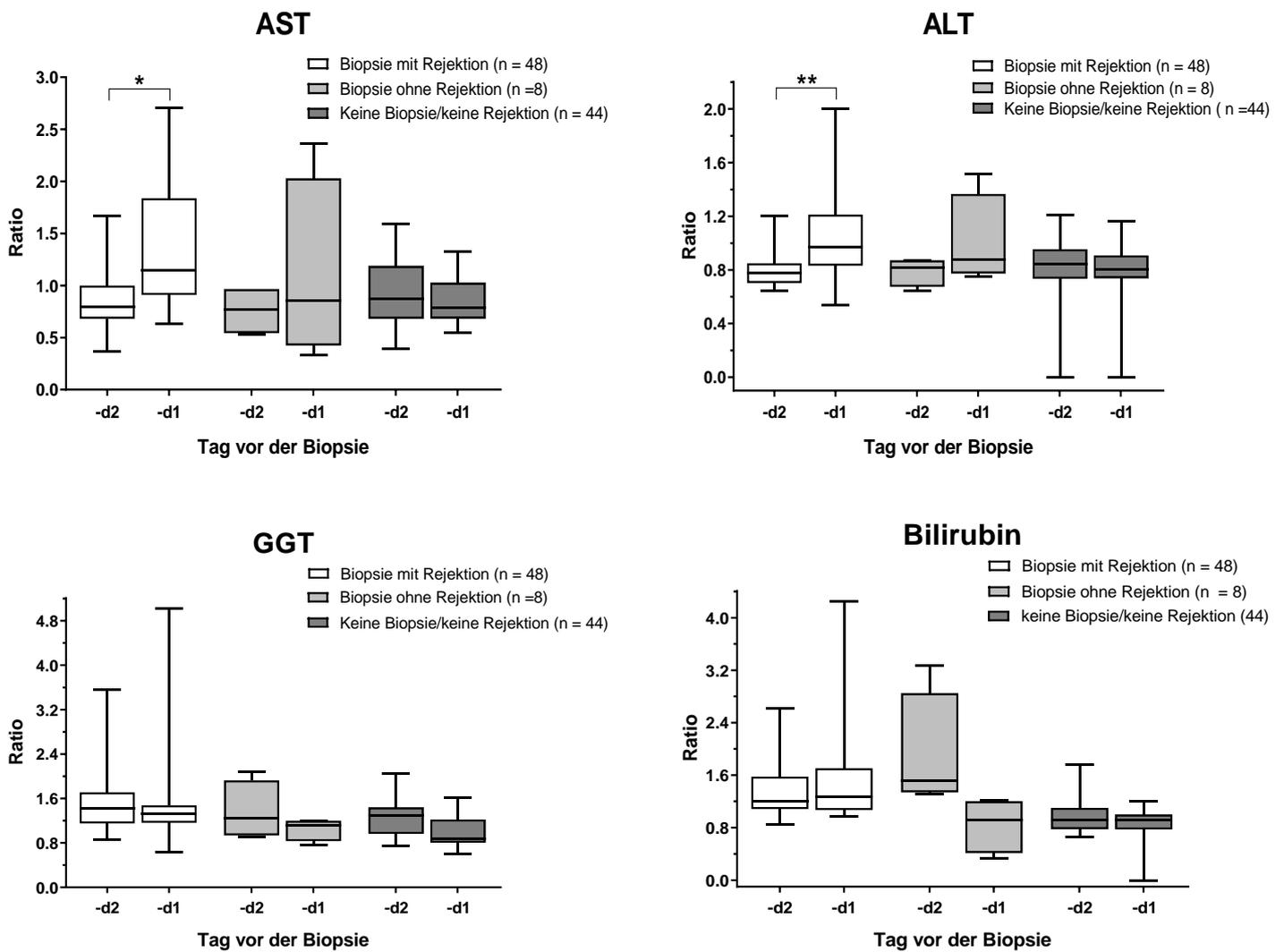


Abbildung 6: Transaminasen- und Cholestasewerte bis zu 48 Stunden vor der Biopsie (POD6-8).

POD	Gruppe	Tacrolimus + Prednisolon	Tacrolimus + MMF	CyA + Prednisolon	CyA + Prednisolon + MMF	p-Wert
1	Rejektion	43	3	0	0	0,61
	Kontrolle	46	2	0	0	
3	Rejektion	42	3	0	0	0,67
	Kontrolle	46	2	0	0	
7	Rejektion	28	3	0	1	0,30
	Kontrolle	46	2	0	1	
14	Rejektion	8	2	0	1	0,09
	Kontrolle	45	3	1	0	

Tabelle 9: Immunsuppressive Therapie in früher portoperativer Periode

Die Immunsuppression aller Untersuchten wurde bis zum POD 14 verglichen. Bei Nachweis einer Rejektion wurde der entsprechende Patient aus der Auswertung ausgeschlossen. Die Analysen wurden mittels des Chi-Quadrat-test oder Exakter Test nach Fischer durchgeführt.

3.2 CD44-Konzentrationen in Serumproben der Rejektionsgruppe im Vergleich zur Nichtrejektionsgruppe

Bei der Mehrheit der Patienten (52%) trat die erste klinisch signifikante akute zelluläre Rejektion zwischen Tag 6 und 8 auf (Abb. 5). Um die Aussagekraft von CXCL9, CD31, CD44 und IL-6 für die Diagnostik einer akuten zellulären Rejektion zu untersuchen, wurden mittels ELISA die Konzentrationen dieser Biomarker in Serumproben am Tag der Biopsie analysiert. Als Kontrollgruppe wurden die Serumproben der Nichtrejektionsgruppe am Tag 7 aufgrund des Studiendesigns untersucht. Abb. 7 zeigt, dass im Vergleich zur Nichtrejektionsgruppe der CD44-Serumproteinspiegel in der Rejektionsgruppe am Tag der Biopsie signifikant erniedrigt war ($p < 0,0001$). Im Gegensatz zu CD44 wiesen zum Zeitpunkt der Biopsie CD31, CXCL9 und IL-6 in der Rejektionsgruppe einen höheren Spiegel auf (Abb. 7), jedoch nicht signifikant zu der Nichtrejektionsgruppe. Der CD44-Spiegel war zum Zeitpunkt der Rejektion signifikant niedriger als in der Gruppe ohne Rejektion.

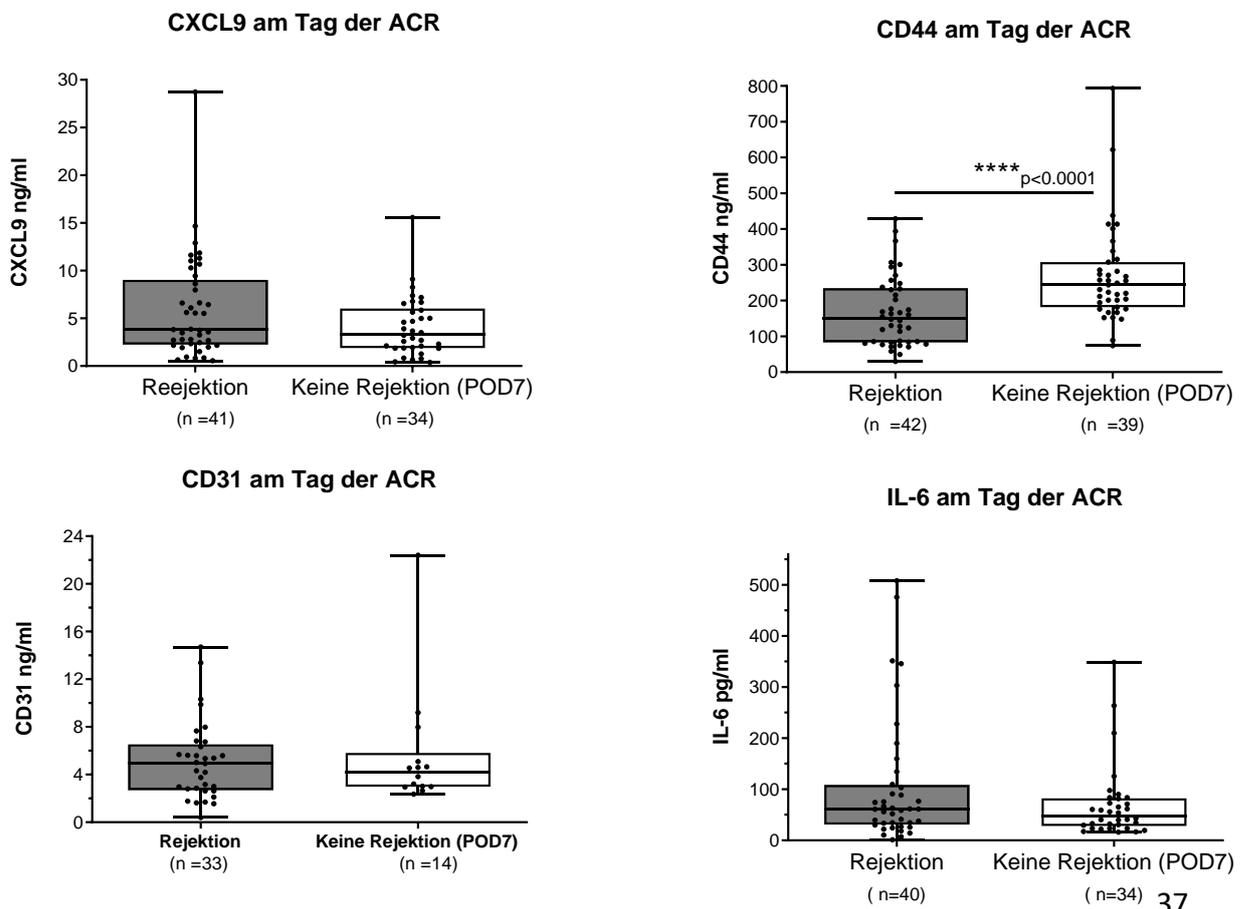
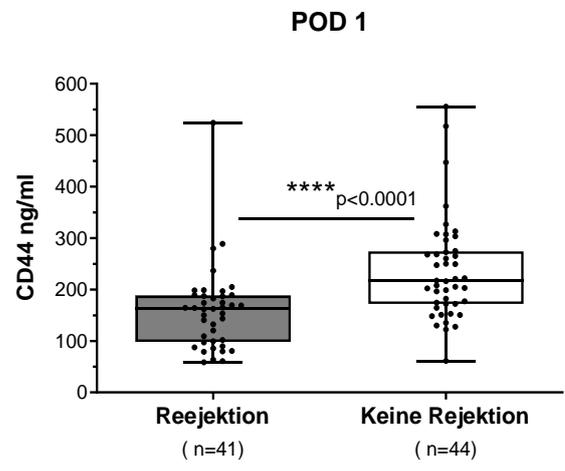
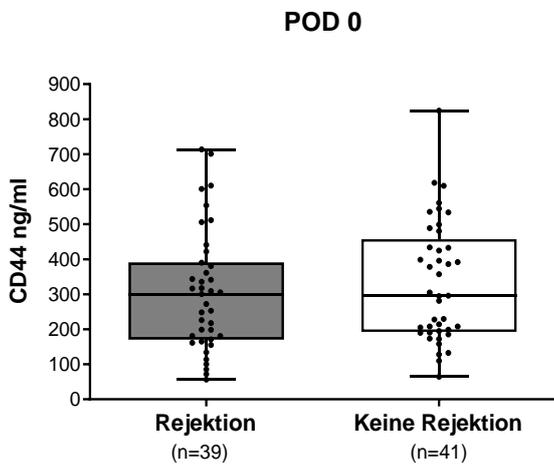


Abbildung 7: Serumproteinspiegel am Tag der Rejektion

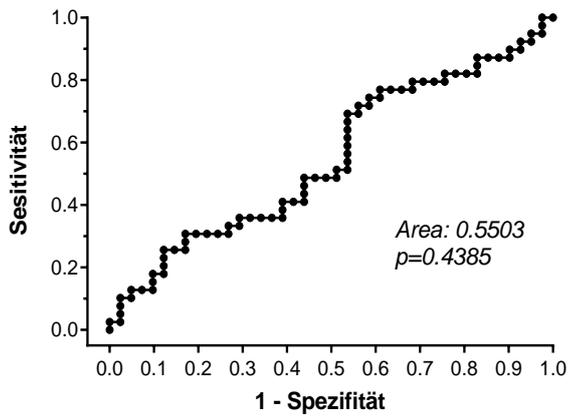
3.3 CD44- und CXCL9-Serumkonzentrationen am POD1 identifizierten Patienten, in deren klinischem Verlauf mindestens einmal eine akute zelluläre Rejektion auftrat

Um die Aussagekraft von CD31, IL-6, CXCL9 und CD44 für die Vorhersage einer akuten zellulären Rejektion zu untersuchen, wurden alle Serumprotein-Biomarkerspiegel am Tag der Transplantation und am postoperativen Tag 1 bestimmt. Die Konzentrationen von Patienten mit einer histologisch gesicherten akuten zellulären Rejektion, die innerhalb von sechs Monaten nach LTx auftrat, und von Patienten ohne akute zelluläre Rejektion in diesem Zeitraum wurden analysiert und verglichen. Hierzu wurden der Student's t-Test oder der nicht parametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet.

CD31- und IL-6-Serumproteinspiegel am POD 0 und POD1 zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen Rejektionsgruppe und Nichtrejektionsgruppe (Ergebnisse nicht gezeigt). Auch der CD44-Serumproteinspiegel am POD 0 unterschied sich nicht zwischen den untersuchten Gruppen (Abb. 8). Hier zeigte sich die ROC-Kurve für CD44 am POD 0 mit $AUC = 0,5503$, während der CXCL9-Serumproteinspiegel am POD 0 einen signifikanten p-Wert von $p = 0,0487$ und $AUC = 0,6288$ bei der ROC-Kurve in der Rejektionsgruppe erreichte (Abb. 9).



ROC-Kurve CD44 am POD 0



ROC-Kurve CD44 POD1

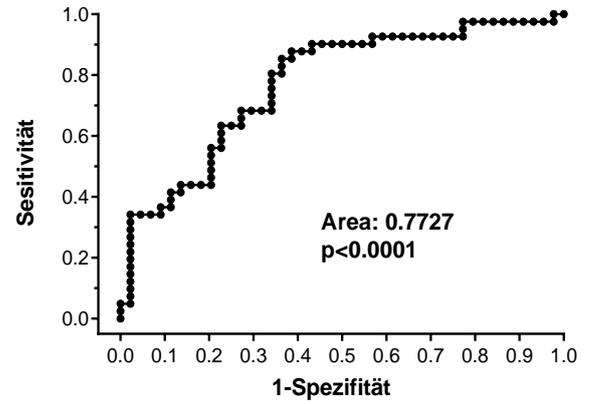


Abbildung 8: Assoziation zwischen CD44- Serumproteinspiegel vor Transplantation und am POD1 mit akuter zellulärer Rejektion

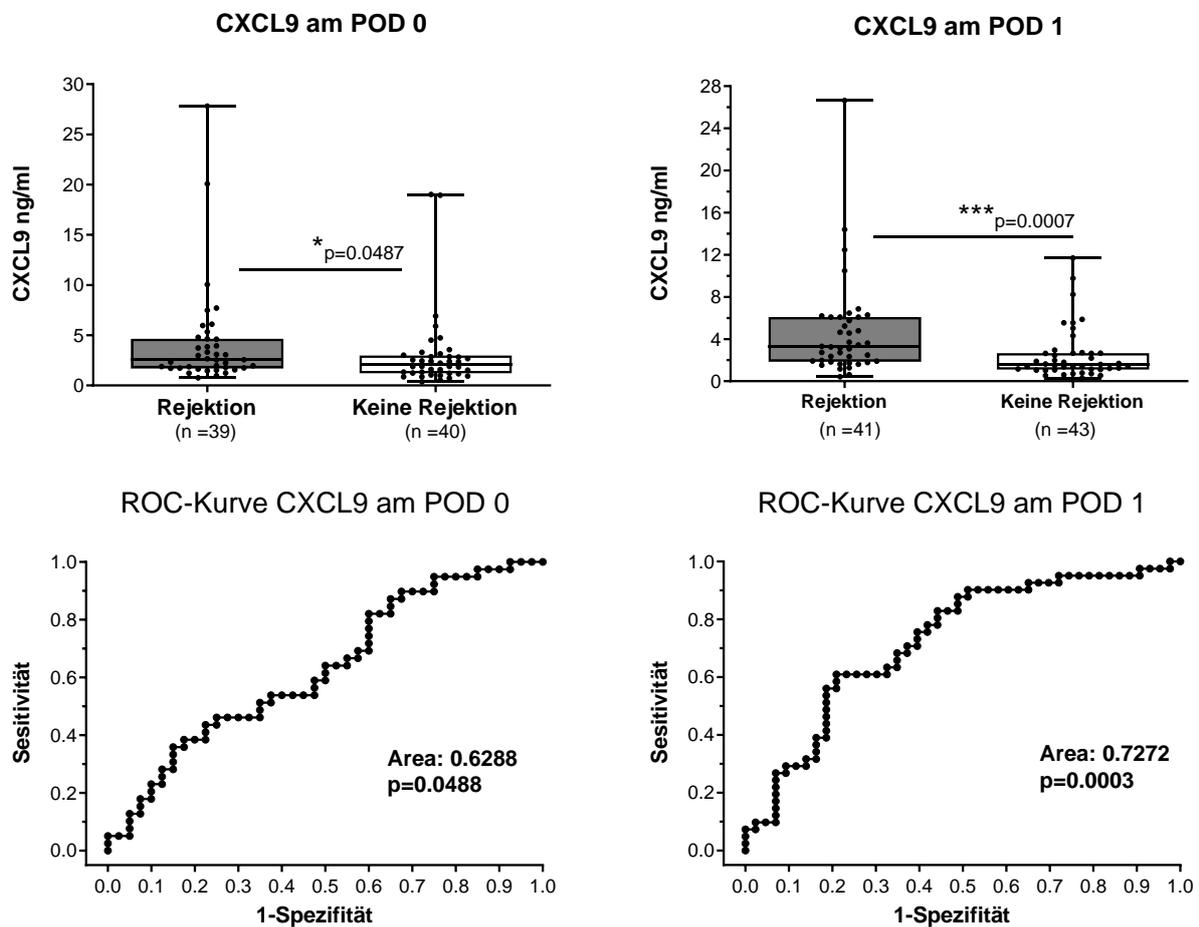


Abbildung 9: Assoziation zwischen CXCL9- Serumproteinspiegel vor Transplantation und am POD1 mit akuter zellulärer Rejektion.

CD44- und CXCL9-Serumproteinspiegel am POD 1 unterschieden sich zwischen den beiden untersuchten Gruppen wesentlich deutlicher als CXCL9 und CD44 am POD 0 ($p < 0,0001$; $p = 0,0007$): CD44 war signifikant erniedrigt, während CXCL9 signifikant erhöht war (Abb. 8 und 9).

Anhand der ROC-Kurvenanalyse konnte für CD44 am POD 0 kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden, während CXCL9 am POD 0 einen signifikanten Wert erreichte ($p = 0,048$, AUC: 0,6288) (Abb. 8 und 9). Sowohl CD44 als auch CXCL9 am POD 1 unterschieden sich in den untersuchten Gruppen signifikant mit AUC = 0,7727 und AUC = 0,7272 (Abb.8 und 9).

3.4 Korrelation zwischen der primären Grunderkrankung mit dem perioperativen CD44- und CXCL9-Serumproteinspiegel

Um die Grunderkrankung der Patienten als perioperativen Störfaktor auszuschließen, wurde die zur Transplantation führende Grunderkrankung mit dem perioperativen CD44- und CXCL9-Spiegel am POD 0 und 1 im Serum korreliert. Die Abb. 10 zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen dem CD44- und CXCL9-Spiegel am POD

0 und 1 bei Patienten mit Leberzirrhose bei alkoholischer Leberzirrhose (mit oder ohne HCC), Leberzirrhose bei viralen Hepatitiden B und C (mit oder ohne HCC) sowie Leberzirrhose durch andere Ursachen und bei primär sklerosierender Cholangitis. Spezifisch für Hepatitis C wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Es zeigte sich für CD44 ein höherer Spiegel bei HCV-Patienten und bei CXCL9 ein niedrigerer Spiegel. Es ließ sich jedoch keine Korrelation zwischen HCV als Grunderkrankung mit CD44- und CXCL9-Spiegel am POD0 und POD1 nachweisen (Abb. 11).

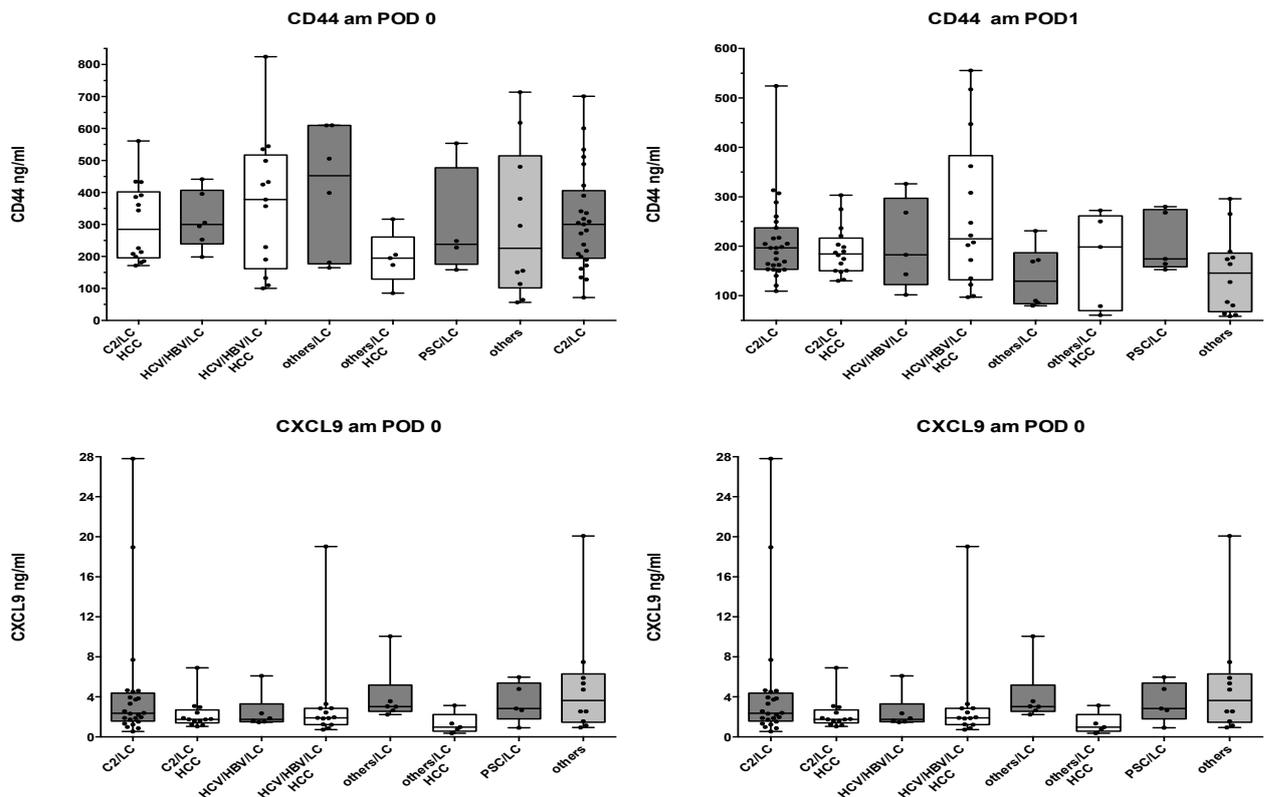


Abbildung 10: Korrelation zwischen dem CD44- (n=86) und CXCL9- (n=82) Serumproteinenspiegel mit primären Grunderkrankungen.

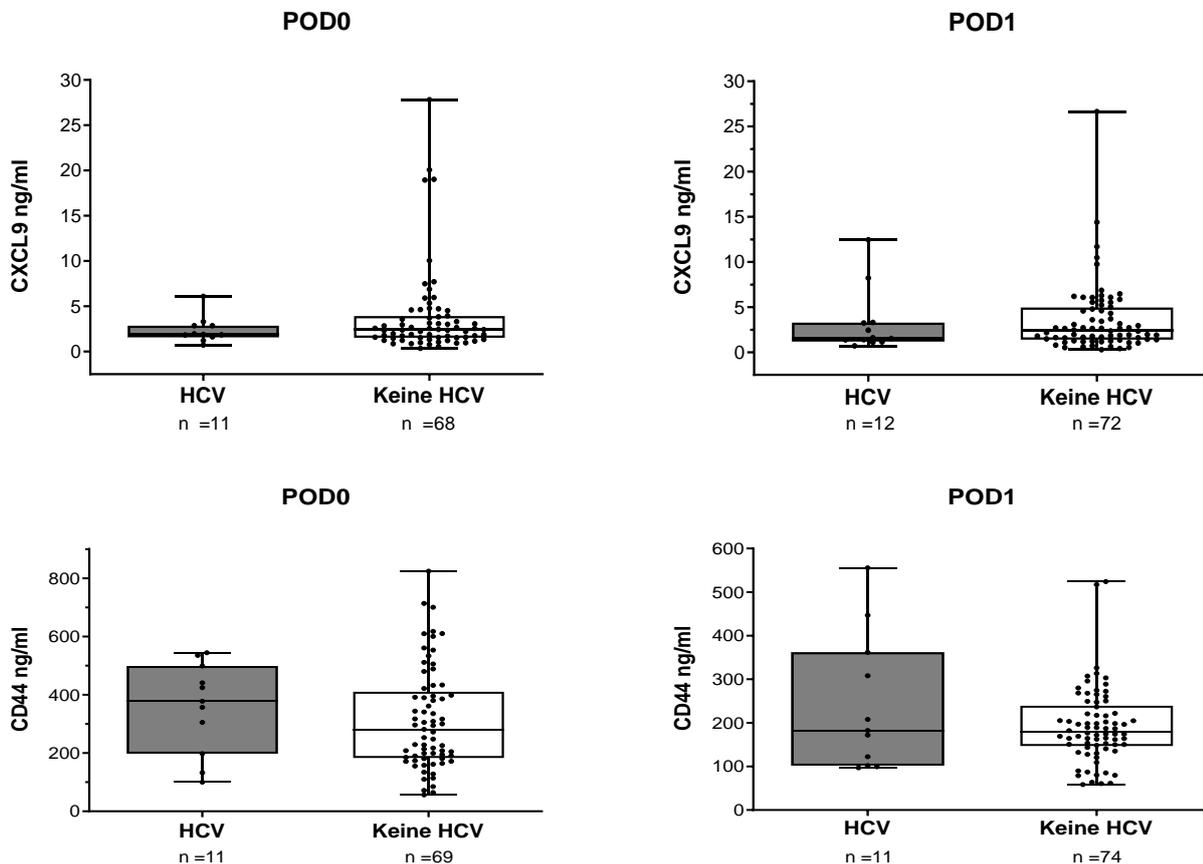


Abbildung 11 : Korrelation zwischen dem CD44- und CXCL9-Serumproteinspiegel mit HCV als Grunderkrankungen.

3.5 Korrelation zwischen der akuten zellulären Rejektion und CD44- und CXCL9-Serumproteinspiegel am POD1

In der univariaten Analyse (Tab. 1 und 2) hatten Empfängeralter, HCC als Grunderkrankung und Erythrozytenanzahl am POD 1 einen signifikanten Wert erreicht. Um weiter zu untersuchen und zu kontrollieren, ob diese Faktoren den CD44- und CXCL9-prädiktiven Wert beeinflussen können, wurde eine multivariate Analyse zwischen Rejektions- und Nichtrejektionsgruppe durchgeführt. In dieser Analyse zeigte sich, dass CD44- ($p < 0,01$; Odds Ratio = 0,988; 95% Konfidenz-Intervall: 0,979-0,997) und CXCL9-Spiegel im Serum am POD 1 ($p < 0,04$; Odds Ratio = 1,359; 95% Konfidenz-Intervall: 1,022-1,807) signifikant mit einer akuten zellulärer Rejektion korrelierten. Die anderen Variablen (CXCL9 und CD44 am POD 0, Grunderkrankung mit oder ohne HCC, Empfängeralter, Kreatinin und GFR am POD 0 und Erythrozytenanzahl am POD 1) wiesen keinen signifikanten Wert in der multivariaten Analyse auf.

3.6 Prognostischer Wert von CD44 und CXCL9 für klinisch signifikante akute zelluläre Rejektion nach LTx

Aus den ROC-Analysen wurden die Cut-off-Werte berechnet, um CD44- und CXCL9-Spiegel mit höchster Spezifität und Sensitivität zwischen Patienten mit und ohne akute zelluläre Rejektion genauer zu identifizieren (Tab. 10). Der höchste positive prädiktive Wert (PPV) für CD44 war am POD 1 mit dem Cut-off-Wert < 200,5ng/ml (Spezifität: 61%; Sensitivität: 88%) zu detektieren, während er am POD 1 CXCL9 den Cut-off-Wert > 2,7ng/ml (Spezifität: 60%; Sensitivität: 79%) aufwies (Abb 12).

Zeitpunkt	Biomarker	Prävalenz (%)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	PPV	NPV
Präoperativ (Tag der Transplantation)	CD44 < cutoff (390.9ng/mL)	67	77	39	55	63
	CXCL9 > cutoff (1.4ng/mL)	78	90	33	56	76
	Kombiniert < CD44 & > CXCL9 cutoff	49	66	65	64	67
Postoperativ (POD 1)	CD44 < cutoff (200.5ng/mL)	62	88	61	68	84
	CXCL9 > cutoff (2.7ng/mL)	41	60	79	74	67
	Kombiniert < CD44 & > CXCL9 cutoff	27	50	95	91	67

Tabelle 10: Prädiktive Werte von CD44 und CXCL9 nach Transplantation für ACR

Die Kombination der Cut-off-Werte der Proteinbiomarker (<CD44 und >CXCL9) ermöglichte den besten prädiktiven Wert für das Risiko einer akuten zellulären Rejektion (PPV: 91% und NPV: 67%). Die Prävalenz von Patienten, die dieses Kriterium erfüllten, betrug 27% am POD 1. Dieses wies darauf hin, dass eine bestimmte Anzahl an Patienten mit dem Risiko einer akuten zellulären Rejektion am postoperativen Tag 1 identifiziert werden konnte. Ein weiterer Survival-Test wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob der PPV für die Kombination von den Cut-off-Werten signifikant war. Abbildung 12 zeigt bei den kombinierten Cut-off-Werten von

CXCL9 und CD44 in den ersten 6 Monaten nach Transplantation einen signifikanten Unterschied ($p < 0.0001$) zwischen den Patienten mit erfülltem Kriterium und den Patienten, die weder den Cut-off Wert für CD44, noch den für CXCL9 erfüllen (Abb. 13).

Assoziation zwischen niedrigen CD44 am POD1 und ACR-frei-Survival Assoziation zwischen hohen CXCL9 am POD1 und ACR-frei Survival

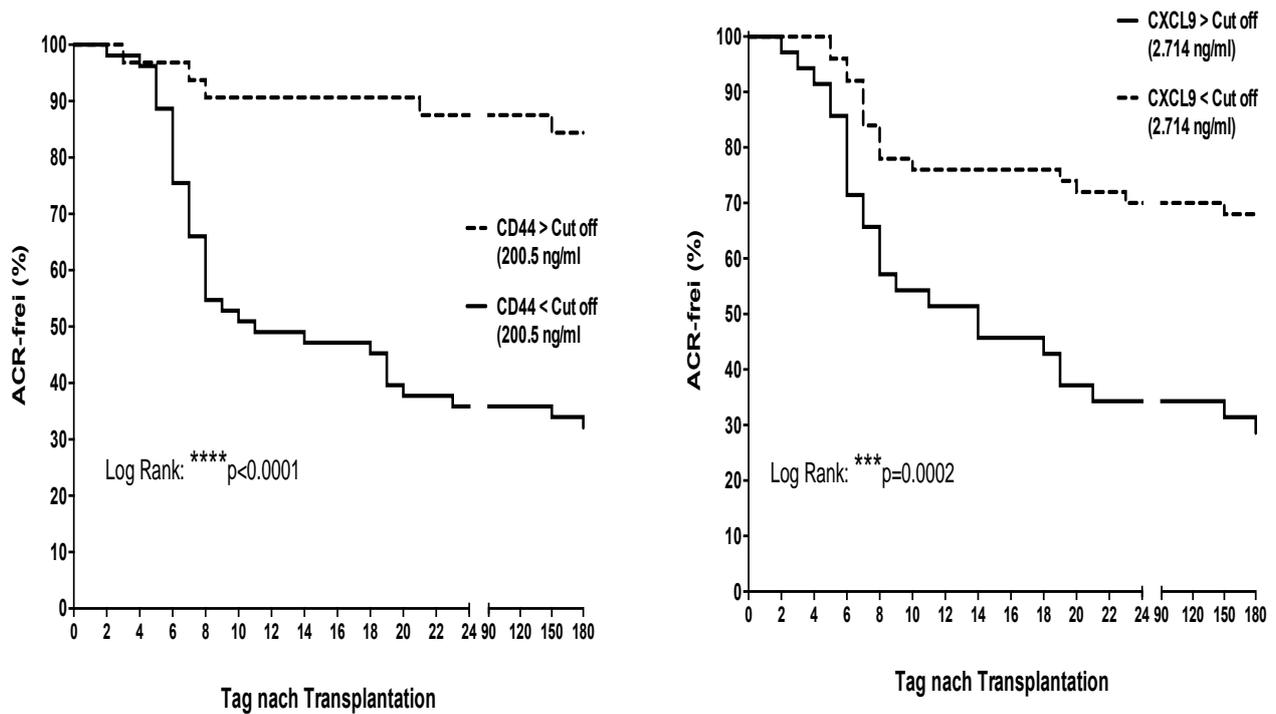


Abbildung 12: Kaplan-Meier-Analyse zwischen Cut-off von CD44 und CXCL9 am POD 1

Assoziation zwischen niedrigen CD44 und hohen CXCL9 am POD1 und ACR-frei-Survival

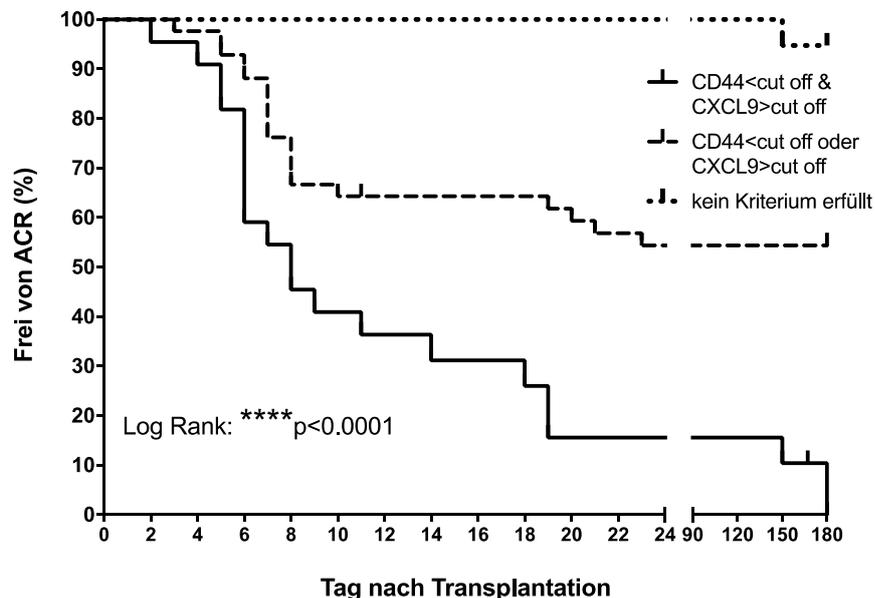


Abbildung 13: Kaplan-Meier-Analyse der kombinierten Cut-off-Werten von hohem CD44 und niedrigem CXCL9 am POD 1

Diejenigen Patienten welche Rejektion zeigten wiesen am POD 1 einen CD44-Wert unterhalb des Cut-off und einen CXCL9-Wert oberhalb des Cut-off auf. Die Prävalenz dieser Patienten betrug 27%. 95% der Patienten mit CD44-Werten oberhalb des Cut-off-Werts und CXCL9-Werte unterhalb des Cut-off-Werts erlitten keine Rejektion innerhalb der ersten 6 Monate nach Transplantation.

3.7 Einfluss der präoperativen Dialyse auf den prädiktiven Wert von CD44 und CXCL9

Es war wichtig, zu untersuchen, ob eine präoperative Dialyse die CXCL9- und CD44-Serumproteinspiegel beeinflussen könnte. Deshalb wurde CXCL9 und CD44 spezifisch perioperativ am POD 0 und POD 1 in Bezug auf eine präoperative Dialyse statistisch analysiert.

Für POD1 konnte gezeigt werden, dass bei Patienten ohne präoperative Dialyse sowohl beim CXCL9-Serumspiegel als auch beim CD44-Serumspiegel signifikante Unterschiede zwischen Rejektions- und Nichtrejektionsgruppe vorlagen. CXCL9 zeigte eine signifikante Erhöhung ($p = 0,001$), während CD44 signifikant ($p < 0,0001$) erniedrigt war (Abb. 14).

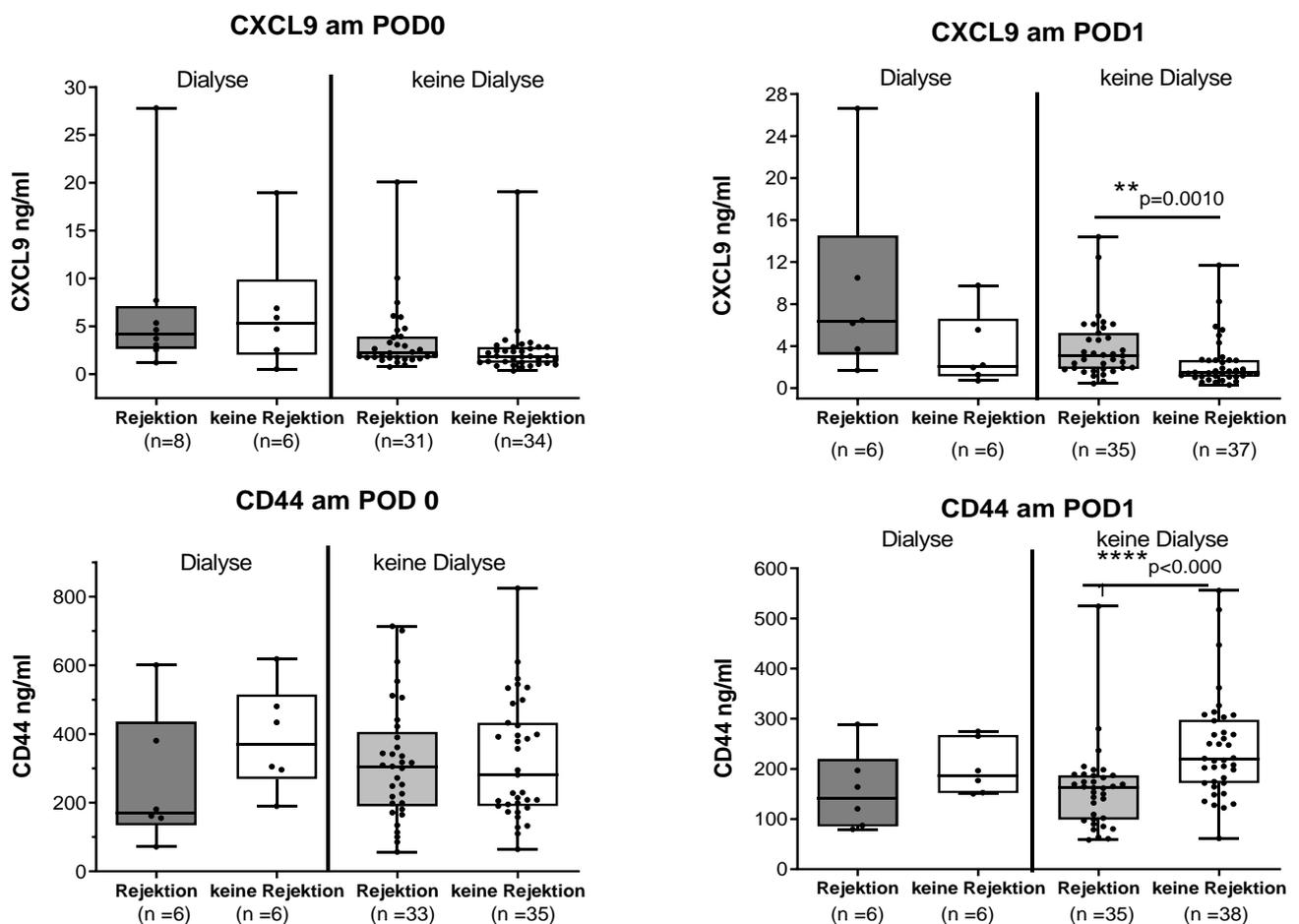


Abbildung 14. CD44- und CXCL9-Serumproteinspiegel in Rejektion- und Nicht-Rejektionsgruppe mit oder ohne Dialyse vor Transplantation

3.8 Differenzierung von Patienten mit klinisch signifikanter akuter zellulärer Rejektion von Patienten mit Transplantatdysfunktion aufgrund anderer Ursachen im frühen postoperativen Verlauf

Schließlich war es von großer Bedeutung, ob sich anhand von CXCL9 und CD44 Patienten mit einer akuten zellulären Rejektion von Patienten ohne Rejektion und Patienten mit einer biochemischer Funktionsstörung des Lebertransplantats aufgrund anderer Ursachen als einer Rejektion in den ersten zwei Wochen nach Transplantation unterscheiden ließen. Die Two-Way-ANOVA ergab einen signifikanten Unterschied für die beiden Biomarker in den untersuchten Gruppen. Der CD44-Spiegel war bis zu POD 7 am niedrigsten bei Patienten mit akuter zellulärer Rejektion und am höchsten bei Patienten ohne Rejektion und mit Biopsie. CXCL9 zeigte bis zu POD 7 den höchsten Wert bei Rejektionspatienten und den niedrigsten bei Patienten ohne Rejektion und Biopsie (Abb. 15).

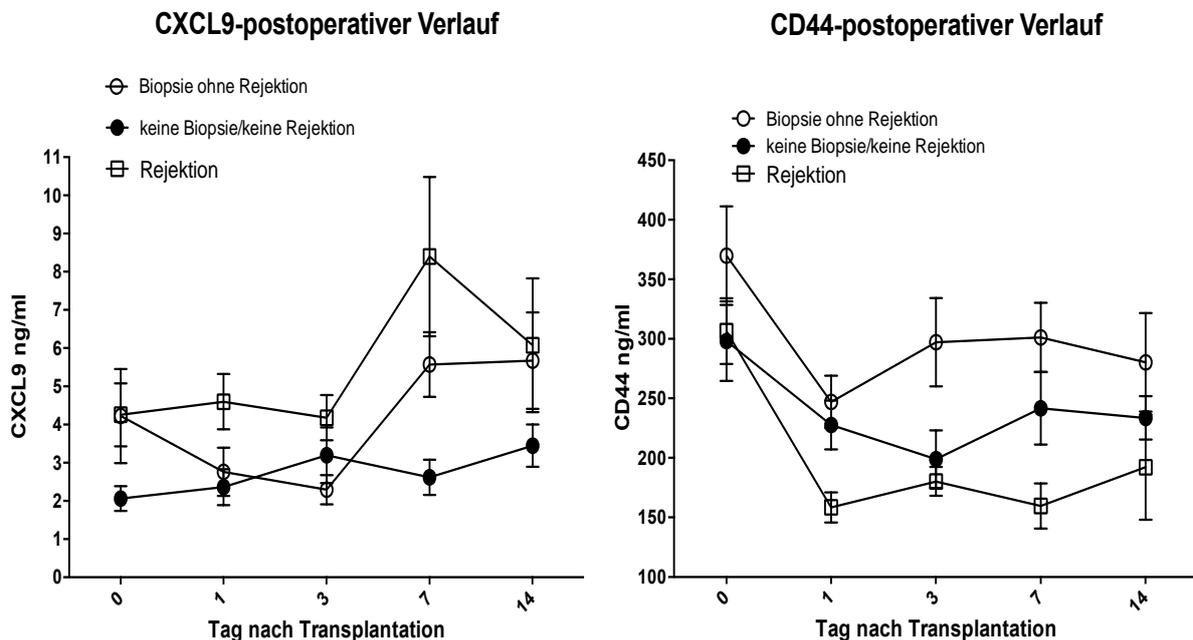


Abbildung 15: Serumproteinspiegel von CD44 und CXCL9 in den ersten 14 Tagen nach Transplantation und die Vergleiche der Biomarker zwischen der Rejektion-Gruppe und Nicht-Rejektionsuntergruppe.

Am POD 14 waren die p-Werte für CD44 nicht mehr signifikant (Abb. 16). Dies war möglicherweise auf die geringe Anzahl an Patienten am POD14, die ausgeschlossen

wurden, zurückzuführen. Ähnlich wie CD44 erreichte CXCL9 am POD 1 einen signifikanten Unterschied in den untersuchten Gruppen. Zu den späteren Zeitpunkten konnte anhand der CXCL9-Werte eine klinisch akute zelluläre Rejektion von einer biochemischen Transplantatdysfunktion differenziert werden. (Abb. 17)

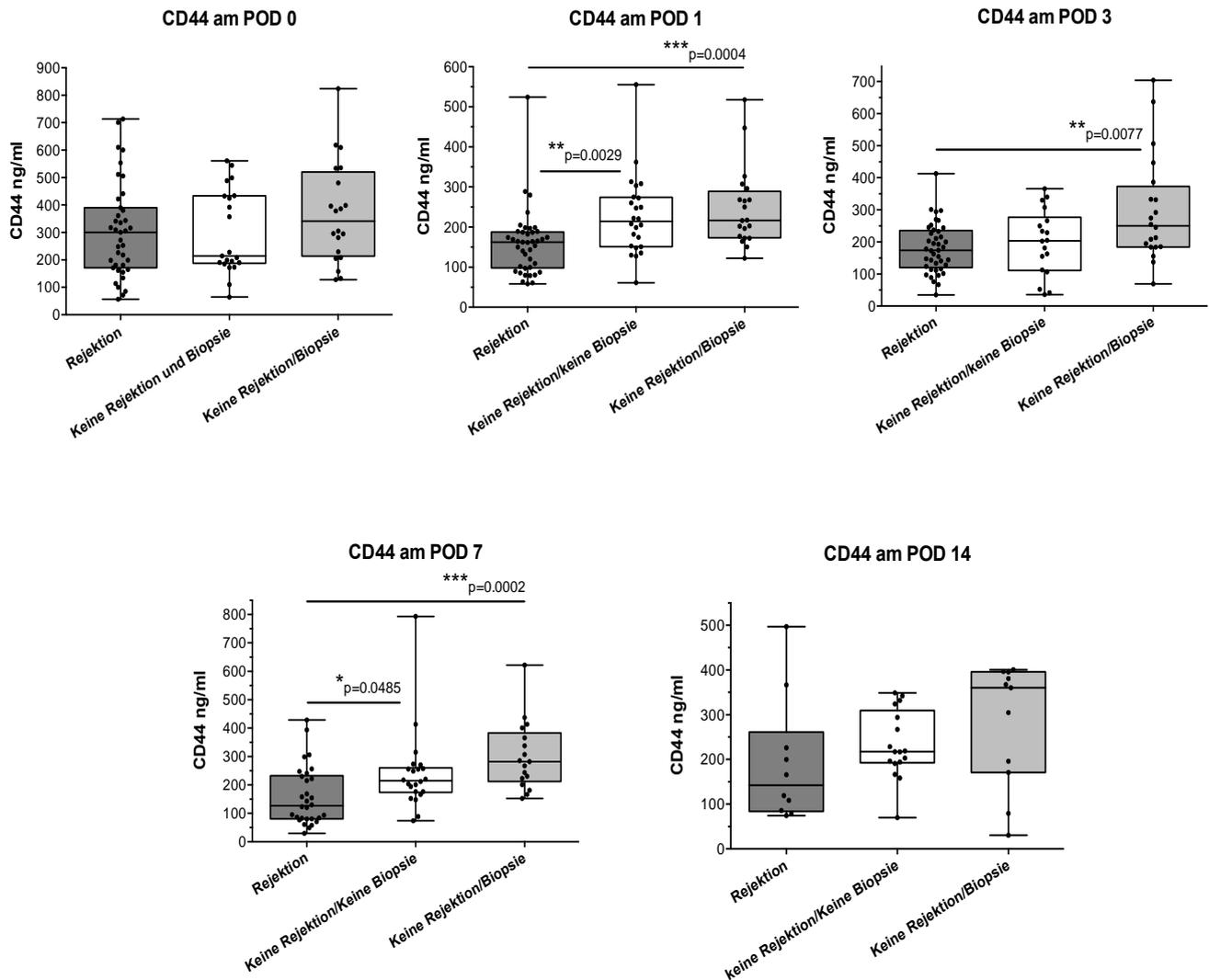


Abbildung 16: CD44-Serumproteinspiegel in den ersten 14 Tagen nach Transplantation und die Vergleiche der Biomarker zwischen der Rejektion-Gruppe und Nicht-Rejektionsuntergruppe.

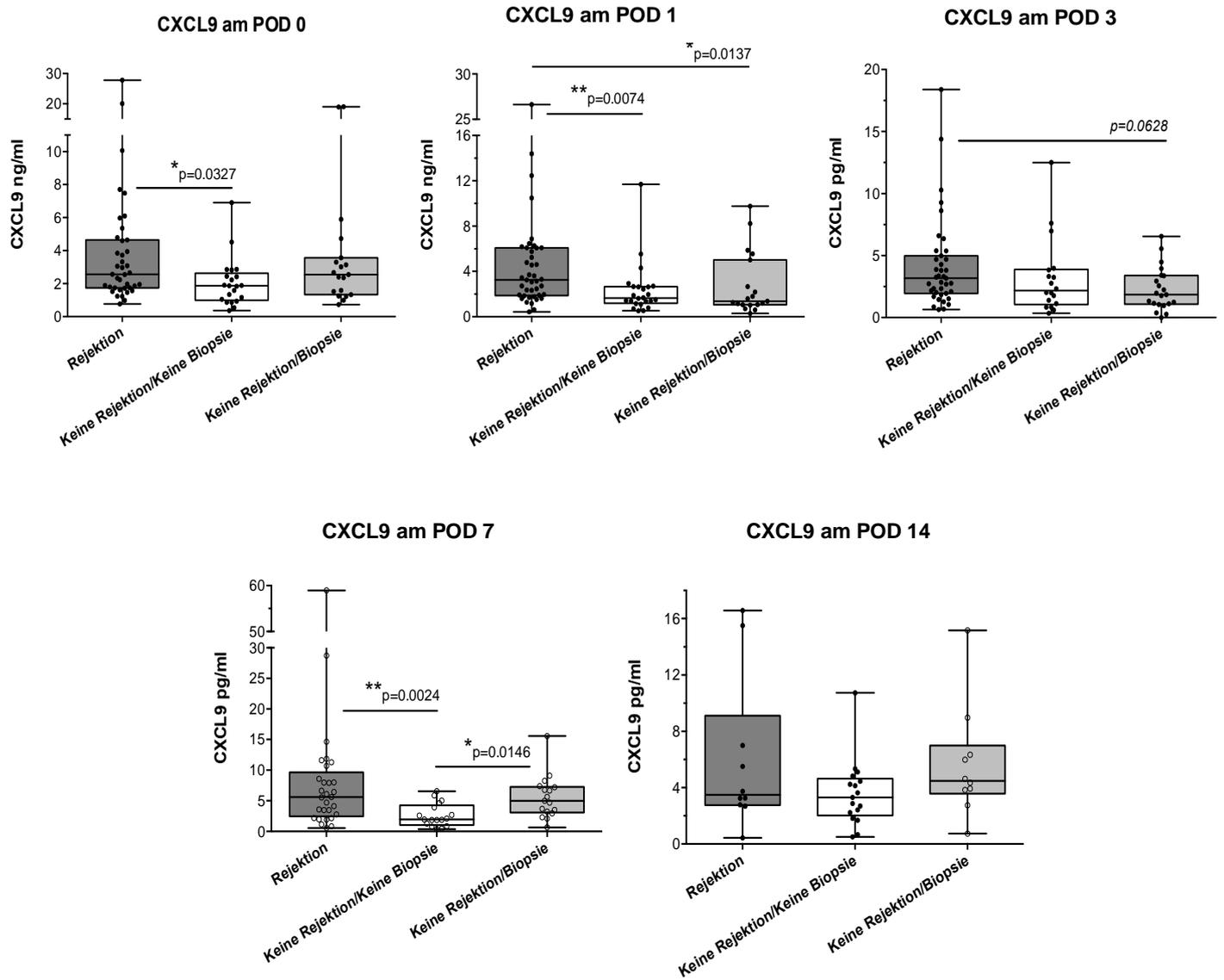


Abbildung 17: CXCL9-Serumproteinspiegel in den ersten 14 Tagen nach Transplantation und die Vergleiche der Biomarker zwischen der Rejektion-Gruppe und Nicht-Rejektionsuntergruppe.

4 Diskussion

Eine akute zelluläre Rejektion tritt trotz heutiger optimierter Immunsuppressionstherapie, moderner Operationstechniken und exzellentem postoperativem Management bei ca. 15 – 60% der transplantierten Patienten auf und ist die häufigste Ursache einer Transplantatsdysfunktion nach Lebertransplantation (2). Die Diagnostik bzw. der Nachweis einer klinisch signifikanten akuten zellulären Rejektion stellen nach wie vor eine klinische Herausforderung dar. Die engmaschige laborchemische Kontrolle der Transaminasen- und Cholestasewerte stellen derzeit den Goldstandard dar, um den Immunstatus des Empfängers nach Lebertransplantation zu beobachten. Diese ist aber unspezifisch für die akute zelluläre Rejektion, da die Leberwerte ebenso bei den anderen Ursachen der Transplantatsdysfunktionen, z. B. Cholangitis und ischämischer Schaden, erhöht sind. Bei Verdacht auf Vorliegen einer Rejektion ist eine Biopsie zur Gewinnung einer Gewebeprobe für die feingewebliche Untersuchung erforderlich. In der vorliegenden Arbeit wurde eine akute zelluläre Rejektion als klinisch signifikant bezeichnet, wenn spezifische biochemische Parameter (Transaminase- und Cholestasewerte) erhöht waren und aufgrunddessen eine Biopsie und eine histopathologische Beurteilung des Transplantates durch einen erfahrenen Pathologen erfolgte.

Die Identifizierung und die klinische Etablierung von leicht verfügbaren, verlässlichen und nichtinvasiven Methoden würden einen wichtigen Fortschritt in der Diagnostik einer akuten zellulären Rejektion und hinsichtlich der Verbesserung des postoperativen Managements darstellen. Nichtinvasive Diagnostik könnte außerdem eine personalisierte und optimierte Therapie für Patienten nach Lebertransplantation ermöglichen, sodass die Morbidität verringert und die Transplantatfunktion verbessert werden kann. Somit könnten der Krankenhausaufenthalt verkürzt und die Therapiekosten reduziert werden. Proteinbiomarker in der nichtinvasiven Diagnostik einer akuten zellulären Rejektion könnten eine Therapieverzögerung aufgrund biopsieassoziiierter Komplikationen, wie z. B. Einblutungen, Schmerzen und Infektionen, oder aufgrund histopathologischer Fehlinterpretation, z.B. hinsichtlich der Differenzierung einer Hepatitis C von einer akuten zellulären Rejektion, verhindern (64). Histologisch gesehen kann eine akute zelluläre Rejektion von einer Hepatitis-C-Reinfektion nur schwer unterschieden werden. *Regev et al.* untersuchten die Übereinstimmungsrate erfahrener Leberpathologen bezüglich der histopatho-

logischen Differenzierung von Hepatitis C und akuter zellulärer Rejektion (60). Sie konnten zeigen, dass die Übereinstimmungsrate der Diagnosen bezüglich HCV und akuter zellulärer Rejektion zwischen den Leberpathologen in der Studie sehr niedrig war und deshalb die histopathologische Untersuchung zur Unterscheidung zwischen Hepatitis C (HCV) und akuter zellulärer Rejektion unzuverlässig ist. Die Durchführung einer Leberbiopsie nach einer hochdosierten Cortisontherapie bei einer akuten zellulären Rejektion kann helfen, zwischen HCV und akuter zellulärer Rejektion zu unterscheiden. Die Genauigkeit dieser Methode ist aber fraglich, da eine klinische Besserung (klinischer und biochemischer Status) sowohl bei HCV als auch bei akuter zellulärer Rejektion durch Cortison-Stoßtherapie erreicht werden kann.

Um Proteinbiomarker für die Diagnostik einer akuten zellulären Rejektion nach Lebertransplantation zu identifizieren, fokussierte sich die vorliegende Arbeit auf Proteine, die in der Literatur als Biomarker in Serumproben für akute zelluläre Rejektion beschrieben wurden. Die untersuchten Proteinbiomarkern waren CXCL9, CD44, CD31 und IL-6.

CXCL9 präsentiert eine Gruppe von IFN-induzierenden CXC-Chemokinen. Es ist eine chemisch hochpotente Substanz, die mononukleare Zellen, wie aktivierte T-Zellen, B-Zellen und natürliche Killerzellen (NK), anlockt (9). Den G-gekoppelten Rezeptor CXC-Rezeptor 3 (CXCR3) bindet CXCL9 und induziert Entzündungsprozesse (Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, Anlockung anderer Immunzellen) (39). CXCR3 findet sich vor allem in Monozyten, NK-Zellen und T_H1-Lymphozyten (45). Es wurde beschrieben, dass CXCL9 und CXCR3 bei einer akuten zellulären Rejektion nach Lungentransplantation im Rattenmodell in erhöhter Konzentration vorlagen (9). *Brouard et al.* zeigten, dass ein vor Transplantation erhöhter CXCL9-Spiegel eine akute zelluläre Rejektion nach Nierentransplantation vorhersagen konnte (12). Außerdem wurde gezeigt, dass niedrige CXCL9-Konzentration im Urin bei NTx-Patienten mit einer stabilen Nierentransplantatsfunktion assoziiert waren (30).

IL-6 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das z. B. zur Entwicklung von rheumatoider Arthritis oder anderen Autoimmunerkrankungen beiträgt (33). Außerdem beeinflusst IL-6 die Differenzierung von naiven T-Zellen zu T_H17-Zellen und supprimiert dadurch die Proliferation von T_{REG}. Nakagiri et al. zeigten, dass bei einer akuten zellulären Rejektion nach Lungentransplantation erhöhte IL-6-Werte zu einer Proliferation von T_H17-Zellen führt (52), welche den Vorgang einer akuten zellulären Rejektion unterstützt.

CD31 spielt eine entscheidende Rolle bei der Beseitigung von gealterten neutrophilen Granulozyten. Es kommt in fast allen Oberflächen von Endothelzellen, Thrombozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten vor. Außerdem ist CD31 an der Angiogenese beteiligt. Es dient hauptsächlich der Steuerung der Leukozytenmigration.

CD44 ist ein transmembranes Typ-I-Glykoprotein, das in vielen Geweben, z. B. Leukozyten, epithelialen und endothelialen Zellen, exprimiert wird (18). Alle CD44-Isoformen haben eine Bindungsstelle für Hyaluronat und Osteopontin, die CD44-Hauptliganden (6, 18). CD44 ist an vielen physiologischen und pathologischen Prozessen, z. B. an der Interaktion zwischen Zellen sowie zwischen Zellen und Matrix, an Wundheilungsprozessen, der Aktivierung von Lymphozyten und an der Bindung von Wachstumshormonen, beteiligt. Die Interaktion zwischen Hyaluronat und CD44 spielt eine entscheidende Rolle bei der Migration von Lymphozyten aus Blutgefäßen in die extrazelluläre Matrix, in der Entzündungsprozesse stattfinden. In vielen Biomarkerstudien wurde beobachtet, dass eine erhöhte CD44-Expression im Nierengewebe und im Plasma nach Nierentransplantation eine akute zelluläre Rejektion vorhersagen kann (66, 67).

In der vorliegenden Arbeit hat nur der CD44-Spiegel am Tag der Rejektion einen signifikanten Wert erreicht. Die Serumspiegel der anderen Proteinbiomarker unterscheiden sich nicht signifikant zwischen den untersuchten Gruppen. Im Vergleich zu anderen Studien zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass der CD44-Wert in der Rejektionsgruppe bis zum POD 7 signifikant erniedrigt war. Chen et al. beschrieben dagegen eine Assoziation von erhöhter CD44-Expression und akuter zellulärer Rejektion nach Herz- und Nierentransplantation (13). Rouschop et al. beobachteten einen signifikant erhöhten CD44-Spiegel in der Rejektionsgruppe mit 23 Patienten mit histologisch nachgewiesener akuter zellulärer Rejektion nach Nierentransplantation gegenüber 9 Patienten ohne Rejektion (67). Darüber hinaus publizierten sie in einer anderen Studie den Anstieg des CD44-Spiegels 24-Stunden vor Nierentransplantationen, die zu einem späteren Zeitpunkt eine akute Rejektion entwickelten (66). Durch die Differenzierung zwischen den CD8- und CD4-positiven Lymphozyten in den präoperativen Serumproben fanden sie eine signifikant niedrige CD44-Expression für CD8-positive Zellen und Ähnliches für CD4 in der Rejektionsgruppe.

Hinsichtlich des Grunds für die Diskrepanz zwischen dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit mit einem niedrigen CD44-Spiegel vor und während einer akuten zellulären Rejektion bei Lebertransplantation und dem bereits beschriebenen erhöhten CD44-Spiegel bei Nieren- und Herztransplantation kann nur spekuliert werden. Im Gegensatz zur Studie von Rouschop et al. (66) waren in der vorliegenden Studie keine Korrelation zwischen CD44-Wert und der Anzahl der Lymphozyten sowie kein signifikanter Unterschied vor Transplantation in den untersuchten Gruppen zu beobachten. Der CD44-Wert in der Rejektionsgruppe blieb vom Tag der Transplantation bis zum Tag der Rejektion (POD7) niedrig. Es scheint, dass dieser Effekt mit einer spezifischen Körperreaktion auf das Transplantat und dessen Neigung zu einer akuten zellulären Rejektion zusammenhängt.

Bei Lebertransplantationen kommt eine spontane Toleranzentwicklung häufiger vor als bei anderen Organtransplantationen. Neben der CD44-Beteiligung an der Th1-assoziierten Immunreaktion wurde der Einfluss auf T_{REG} beschrieben. Ein Beispiel für die Immuntoleranzentwicklung sind die *myeloid derived suppressor cells* (MDSC), welche eine immunsuppressive Wirkung triggern können. Humane MDSC sind mit Supprimierung der T-Zellen und der Induktion der T_{REG} sowie der Prognose bei Krebspatienten assoziiert (3, 11, 28). MDSC können in folgende Untergruppen eingeteilt werden: Lin⁻HLA-DR^{-/low}, CD14⁺HLA-DR und CD15⁺HLA-DR MDSC (29, 74). Außerdem wurde beschrieben, dass hepatische Sternzellen (HSC) MDSC hochregulieren können (24). In der Studie von Höchst et al. wurde gezeigt, dass CD14⁺HLA-DR MDSC die T-Zellen-Proliferation hemmt. Zudem konnten Höchst et al. beweisen, dass die Induktion von CD14⁺HLA-DR MDSC durch HSC von CD44 abhängig ist (27). Im Rattenmodell wurde eine erhöhte CD44-Expression in HSC aus geschädigten Lebern beschrieben. Höchst et al. fanden heraus, dass durch die Blockierung der CD44-Expression die Induktion der MDSC reduziert werden konnte (27). Darüber hinaus zeigten sie, dass durch diese Blockierung von CD44 die suppressive Wirkung der MDSC verringert werden konnte.

Ausgehend von diesen Studienergebnissen kann spekuliert werden, dass eine geringe CD44-Expression im humanen Serum die MDSC inhibiert und dadurch eine Toleranzentwicklung nach LTx hemmt und gleichzeitig einen Entzündungsprozess unterstützt.

CXCL9 ist ein bereits in der Literatur beschriebener Biomarker der nichtinvasiven Diagnostik einer akuten zellulären Rejektion, welcher noch nicht für

Lebertransplantationen evaluiert wurde. Anders als CD44 zeigte CXCL9 in der vorliegenden Arbeit am Tag der Rejektion keinen signifikanten Unterschied in den untersuchten Gruppen. Allerdings war CXCL9 am präoperativen Tag und POD 1 hochreguliert und erreichte einen signifikanten Wert. In unterschiedlichen Biomarkerstudien wurde beschrieben, dass CXCL9 ein sensibler Biomarker für eine akute zelluläre Rejektion ist. *Belperio et al.* zeigten im Rattenmodell eine Korrelation zwischen einem erhöhten CXCL9-Wert im Sekret der bronchoalveolären Lavage (BAL) und dem Eintreten einer akuten zellulären Rejektion (9). Außerdem wurde in der Studie bewiesen, dass die Interaktion zwischen CXCL9 und seinem Rezeptor (CXCR3) die Rekrutierung von mononuklearen Zellen induziert. In einer retrospektiven Studie von *Rotondi et al.* wurden präoperative CXCL9-Spiegel bei 252 Nierentransplantation-Biopsien gemessen (65). Präoperatives CXCL9 war bei den Patienten signifikant hochreguliert, die innerhalb von einem Jahr nach Transplantation eine akute zelluläre Rejektion erlitten. Außerdem wurde eine CXCL9-mRNA-Hochregulierung bei akuter zellulärer Rejektion bei Herz-, Nieren- und Leberbiopsien beschrieben (12, 32, 52, 65). Heidt et al. dagegen zeigten, dass präoperative CXCL9-Werte eine akute zelluläre Rejektion nach Nierentransplantation nicht vorhersagen konnte (25).

Friedman et al. fanden einen signifikant erhöhten CXCL9-Spiegel in Serumproben am POD 1 bei LTx-Patienten mit einer klinisch frühen Transplantatfunktionsstörung (19). Dieses Ergebnis ist allerdings mit der vorliegenden Arbeit nicht zu vergleichen, da Friedman et al. keine histopathologische Untersuchung zur Unterscheidung zwischen einer akuten Rejektion und einer frühen Transplantatfunktionsstörung durchgeführt hatten. CXCL9 erreichte in der vorliegenden Arbeit keinen signifikanten Wert am Tag der Rejektion in den untersuchten Gruppen. Allerdings war ein signifikanter Unterschied der CXCL9-Werte am POD 0 und POD 1 zu beobachten. Das weist darauf hin, dass CXCL9 als Biomarker für eine akute zelluläre Rejektion genutzt werden könnte.

Die Entdeckung von potentiellen Biomarkern für die nichtinvasive Diagnostik ist ein wichtiges Ziel in der Transplantationsmedizin. Die klinischen Entscheidungen zu vereinfachen und die Patientenbehandlung zu optimieren stellen den Zweck der Verwendung von Biomarkern dar. Trotz mehrerer Versuche in den o.g. Studien ist es fast unmöglich, einen einzigen spezifischen und sensiblen Biomarker für akute zelluläre Rejektion nach Lebertransplantation zu identifizieren, und es bedarf

Langzeitstudien, um den identifizierten Biomarker klinisch zu validieren. Außerdem wird die Expression von Chemokinen und Zytokinen von z. B. Infektionen oder Autoimmunerkrankungen beeinflusst. Aufgrund dessen und aufgrund der in der vorliegenden Arbeit analysierten Ergebnisse erschien es vielversprechend, den kombinierten Effekt von niedrigem CD44- und erhöhtem CXCL9-Spiegel im Serum und die potentielle Interaktion zu evaluieren. Nayoung et al. haben bewiesen, dass IL-7-, IL-10- und CXCL10-Spiegel im Serum bis zu 14 Tagen nach LTx signifikant erhöht sind (54). Dabei wurde der kombinierte prognostische Wert von o. g. Chemokinen untersucht. Es zeigte sich, dass die kombinierte IL-10, IL-7 und CXCL10 in den ersten 14 Tagen nach LTx eine akute zelluläre Rejektion mit einer Spezifität von 97% und einer Sensitivität von 94% vorhersagen können. *Olofsson et al.* untersuchten in ihrer experimentellen Arbeit das Zusammenwirken zwischen CD44 und CXCL9 (55). Sie blockierten in Endothelzellen die Expression von CD44 und wiesen nach, dass durch die Blockierung der CD44-Expression eine Hochregulierung der CXCL9- und CXCL12-mRNA folgte. Außerdem wurde CXCR3 hochreguliert, was die Interferonausschüttung förderte. Dadurch wurden weitere inflammatorische Zytokine, wie z. B. IL-6, produziert, die T-Lymphozytenproliferation angeregt und die T-Lymphozyten in das Lebertransplantat gelockt

In der Ergebnisanalyse der vorliegenden Arbeit wurden der Cut-off-Wert von CD44 und von CXCL9 berechnet und miteinander verglichen. Die Kombination aus niedrigem CD44-Cut-off-Wert und hohem CXCL9-Cut-off-Wert zeigte die beste Prädiktion für eine akute zelluläre Rejektion nach LTx mit einem PPV von 91% und einem NPV von 67%. Obwohl ca. 50% der Patienten mit einer akuten zellulären Rejektion durch die Prädiktion mittels Biomarker nicht detektiert wurden, entwickelten fast alle Patienten mit niedrigem CD44- und hohem CXCL9-Wert eine akute zelluläre Rejektion. Dieses Ergebnis zeigte, dass die CD44- und CXCL9-Serumanalyse am POD 1 helfen können, das Risiko für die Entwicklung einer akuten zellulären Rejektion zu identifizieren. Andere klinische Studien, die die Korrelation zwischen akuter zellulärer Rejektion und Biomarkern untersuchten, sind *Musat et al.* und *Millán et al.* *Musat et al.* korrelierten das Risiko einer akuten zellulären Rejektion mit präoperativen, spenderspezifischen antihuman Leukozyten-Antigen-Antikörpern in den ersten 90 Tagen nach Lebertransplantation und erzielten einen PPV von 46% und einen NPV von 97% (51). *Millán et al.* (49) untersuchten den prädiktiven Wert von intrazellulärem Interferon- γ für eine akute zelluläre Rejektion bei 47

lebertransplantierten Patienten. Sie zeigten, dass der präoperative Cut-off-Wert von mehr als 56% Interferon- γ positiven CD8⁺-Lymphozyten eine akute zelluläre Rejektion mit einer Sensitivität von 75% und einer Spezifität von 82% vorhersagen konnte. Das Ergebnis in der vorliegenden Arbeit deutete darauf hin, dass die CD44- und CXCL9-Analyse am POD 1 ein vergleichbares Ergebnis zur Identifizierung von Patienten mit Risiko einer klinisch signifikanten akuten zellulären Rejektion liefert. Dies gilt insbesondere für Patienten, welche mit Tacrolimus immunsupprimiert werden, da alle Patienten in der Studienkohorte Tacrolimus am POD 1 erhalten hatten, und für Patienten ohne Dialysebehandlung vor Transplantation. Eine prospektiv multizentrische Studie ist erforderlich, um das klinische Potential von CD44 und CXCL9 als Rejektionsbiomarker bei Lebertransplantationen weiter zu untersuchen. Patienten mit einem anderen immunsuppressiven Therapieregime und anderer Induktionstherapie sowie Patienten mit Niereninsuffizienz und vortransplantierte Patienten sollten zur Validierung eingeschlossen werden, da sie in der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen worden waren. Dieses stellte eine Limitation dieser Arbeit dar. Eine weitere Limitation dieser Arbeit war die Auswahl der Kontrollgruppe. In dieser Studie bestand die Kontrollgruppe aus Patienten, die in den ersten 6 Monaten nach LTx rejektionsfrei waren oder die ohne Rejektion biopsiert wurden. Es wäre interessant, den Protein-Biomarkerspiegel bei gesunden, nicht operierten Probanden zu bestimmen und zu analysieren. Denn die Operation ist ein weiterer Faktor, der den Biomarkerspiegel beeinflusst haben könnte. Bei einer Operation kann durch das Verletzen des Gewebes ein Entzündungsprozess verstärkt werden. Dieser Entzündungsprozess kann die Chemokine beeinflussen und dadurch den prädiktiven Wert von den Biomarkern verfälschen. *Hamilton et al.* zeigten, dass operative Eingriffe (LTx) mit der Freisetzung von Endotoxinen assoziiert sind und deshalb ein akuter Entzündungsprozess durch intraoperativ erhöhte TNF- α und IL-6 gefördert wird (23). Außerdem sollte eine effektive und standardisierte Methode für die laborchemischen Untersuchungen zur Bestimmung der Protein-Biomarkerspiegel etabliert werden. Die unterschiedliche Verarbeitung von Serumproben, die analytischen Methoden sowie die Datenverarbeitung der Untersuchungsergebnisse können zu Diskrepanzen führen. Eine etablierte Methode zur Verarbeitung der Proben und Bestimmung der Biomarkerspiegel im Serum könnten beispielsweise bei der Normalisierung der Biomarkerspiegel helfen.

Die Inzidenz der klinisch signifikanten akuten zellulären Rejektion in der vorliegenden Arbeit war relativ hoch. Eine Leberbiopsie wurde in der Studienkohorte nur bei klinischem Verdacht, d.h. Anstieg der Leberzellschädigungs- und Cholestaseparameter, durchgeführt. Da eine akute zelluläre Rejektion am häufigsten am POD 7 aufgetreten waren, sollte im Studienprotokoll zukünftiger Studien eine Biopsie am POD 7 geplant werden.

Die Identifizierung von CD44 und CXCL9 als Biomarker für die Prädiktion einer akuten zellulären Rejektion nach LTx ist relevant für den postoperativen Verlauf. Da die Differenzierung von Hepatitis C und akuter zellulärer Rejektion mittels histopathologischer Untersuchung schwierig ist, bietet es sich an, in der Zukunft diesbezüglich auf CXCL9- und CD44-Werte zurückzugreifen. Im Rahmen der postoperativen Therapie ist es z. B. möglich, durch die Kombination von gängigen Immunsuppressiva und CD44-/CXCL9-Blockierung eine noch optimalere postoperative immunsuppressive Therapie zu erreichen. In der Studie von Belperio et al. konnte gezeigt werden, dass im Rattenmodell die Kombination von anti-CXCL9 und Cyclosporin A (CSA) den Rejektionsgrad bzw. -score im Lungentransplantat reduzieren konnte (9). Weitere experimentelle und klinische Untersuchungen in diesem Bereich, vor allem hinsichtlich der Lebertransplantation, sind erforderlich, damit anti-CXCL9 oder anti-CD44 bei transplantierten Patienten verwendbar sind.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Patienten nach Lebertransplantation am Tag der Rejektion bzw. am Tag aufgrund des Verdachts auf Rejektion erfolgter Biopsie einen erhöhten Serumproteinspiegel von CD31, CXCL9 und IL-6 aufwiesen. Die Erhöhungen waren allerdings nicht signifikant. Die CD44-Serumproteinspiegel waren dagegen mit einem mit hoher Signifikanz erniedrigt. Zur Bestimmung des diagnostischen und frühen prädiktiven Werts wurden CD44- und CXCL9-Spiegel am POD 0 und POD 1 analysiert. CD44 waren signifikant erniedrigt am POD 1, während CXCL9 sowohl am POD 0 als auch am POD 1 signifikant höhere Werte im Serum von Patienten mit einer akuten zellulären Rejektion erreichte. Die Cut-off-Kombination zwischen dem niedrigen CD44- und dem erhöhten CXCL9-Serumproteinspiegel ermöglichte die beste Prognose für eine akute zelluläre Rejektion innerhalb von 6 Monaten nach LTx. Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Studie beobachtet werden, dass 91% der Patienten mit diesem Kriterium eine akute zelluläre Rejektion entwickelten. Die CD44-Serumproteinspiegel bis zum POD 7 waren in der Rejektionsgruppe am niedrigsten. CXCL9 zeigte umgekehrt analog zu CD44 bis zum POD 7 die höchsten Werte in der Rejektionsgruppe.

Abschließend lässt sich von den Ergebnissen in dieser Arbeit ableiten, dass die Bestimmung von CD44 und CXCL9 im Serum als eine neue nicht-invasive Methode für die Diagnostik und Vorhersage der akuten zellulären Rejektion nach LTx genutzt werden könnte. Durch diese spezifischen Biomarker können Patienten mit einem Risiko einer akuten zellulären Rejektion identifiziert und somit das postoperative Management dieser Patienten optimiert werden. Eine multizentrisch prospektive Studie wäre erforderlich, um das klinische Potential von CD44 weiter zu untersuchen.

Literaturverzeichnis

1. (o. A.). *Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document*. *Hepatology*, 1997 Mar; 25:658–663
2. Adam, R. and E. Hoti. Liver transplantation: the current situation. *Semin Liver Dis*, 2009; Feb **29**(1): p. 3-18.
3. Allavena P, Mantovani A. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. *Clin Exp Immun*, 2012 Feb;167:195–205.
4. Antonysamy MA, Fanslow WC, Fu F, Li W, Qian S, Troutt AB, Thomson AW. Evidence for a role of IL-17 in alloimmunity: a novel IL-17 antagonist promotes heart graft survival. *Transplant Proc*, 1999 Mar; **31** (1-2): 93.
5. Asaoka, T., Marubashi S., Kobayashi S., Hama N., Eguchi H., Takeda Y., Tanemura M., Wada H., Takemasa I., Takahashi H., Ruiz P., Doki Y., Mori M., Nagano H. Intragraft transcriptome level of CXCL9 as biomarker of acute cellular rejection after liver transplantation. *J Surg Res*, 2012 Dec; **178**(2): p. 1003-14.
6. Baaten, B.J., C.R. Li, and L.M. Bradley. Multifaceted regulation of T cells by CD44, in *Communicative and Integrative Biology*. 2010 Nov; 3(6) p. 508-12.
7. Bartlett, A.S., Ramadas R., Furness S., Gane E., McCall JL. The natural history of acute histologic rejection without biochemical graft dysfunction in orthotopic liver transplantation: a systematic review. *Liver Transplant*, 2002 Dec; **8**(12): p. 1147-53.
8. Beckebaum, S., Chen X., Sotiropoulos GC., Radtke A., Daoudaki M., Baba HA, Wohlschlaeger J., Broelsch CE, Gerken G., Cicinnati VR. Role of osteopontin and CD44s expression for patients with hepatocellular carcinoma undergoing liver transplantation or resection. *Transplant Proc*, 2008 Nov; **40**(9): p. 3182-4.
9. Belperio, J.A., Keane MP, Burdick MD, Lynch JP 3rd, Zisman DA, Xue YY, Li K., Ardehali A., Ross DJ, Strieter RM. Role of CXCL9/CXCR3 Chemokine Biology during Pathogenesis of Acute Lung Allograft Rejection. *J Immun*, 2003 Nov; **171**(9): p. 4844-4852.
10. Bishop G, Sun J., Decruz DJ, Rokahr KL, Sedgwick JD, Sheil AG, Gallagher ND, Mcgaughan GW. Tolerance to rat liver allografts. III. Donor cell

- migration and tolerance-associated cytokine production in peripheral lymphoid tissues. *J Immun*, 1996 Jun 15; **156** (12): 4925–4931.
11. Bronte V, Apolloni E, Cabrelle A, Ronca R, Serafini P, Zamboni P, Restifo NP, Zanovello P. Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood*, 2000 Dec 1; 96(12): 3838–3846.
 12. Brouard, S. and J.P. Souillou. Pre-transplant serum level of CXCL9 as a biomarker of acute rejection and graft failure risk in kidney transplantation. *Transpl Int*, 2010 May 1; **23**(5): p. 461-2.
 13. Chen, R., Sigdel TK., Li L., Kambham N., Dudley JT., Hsieh SC, Klassen RB, Chen A, Caohuu T., Morgan AA, Valentine HA, Khush KK, Sarwal MM, Butte AJ. Differentially expressed RNA from public microarray data identifies serum protein biomarkers for cross-organ transplant rejection and other conditions. *PLoS Comput Bio*, 2010 Sep 23; **6**(9).
 14. Cruickshank SM, Southgate J, Wyatt JI, Selby PJ, Trejdosiewicz LK. Expression of CD44 on bile ducts in primary sclerosing cholangitis and primary biliary cirrhosis. *J Clin Pathol* 1999 Oct;52 (10):730-734.
 15. Denning TL, Wang YC, Patel SR, Williams IR, Pulendran B. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat Immun*, 2007 Oct; 8 (10): 1086–1094
 16. Drebber, U., Torbenson M, Wedemeyer I, Dienes HP. [Current aspects of liver allograft pathology]. *Pathologe*, 2011 Mar. 32(2): p. 113-23.
 17. Eksteen, B. and J.M. Neuberger. Mechanisms of disease: the evolving understanding of liver allograft rejection. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 2008 Apr; 5(4): p. 209-19.
 18. Falleti E, Pirisi M, Fabris C, Bortolotti N, Soardo G, Gonano F, Bartoli E. Circulating standard CD44 isoform in patients with liver disease: relationship with other adhesion soluble ion molecules and evaluation of diagnostic usefulness. *Clin Biochem*, 1997 Feb; 30(1):69-73.
 19. Friedman, B.H., Wolf JH, Wang L, Putt ME, Shaked A, Christie JD, Hancock WW, Olthoff KM. Serum cytokine profiles associated with early allograft

- dysfunction in patients undergoing liver transplantation. *Liver Transplant*, 2012 Feb; 18(2): p. 166-76.
20. Gierej, B., Kobryn K, Gierej P, Górnika B. C4d in acute rejection after liver transplantation and its usefulness in differential diagnosis between acute liver rejection and hepatitis C recurrence. *Ann Transplant*, 2014 Aug 1; 19: p. 373-81.
 21. Haga H, Egawa H, Fujimoto Y., Ueda M, Miyagawa-Hayashino A., Sakurai T., Okuno T., Koyanagi I., Takada Y., Manabe T. Acute humoral rejection and C4d immunostaining in ABO blood type-incompatible liver transplantation. *Liver Transpl*, 2006 Mar;12(3):457–464.
 22. Haga H, Egawa H, Shirase T., Miyagawa A., Sakurai T., Minamiguchi S., Yamabe H., Manabe T., Tanaka K. Periportal edema and necrosis as diagnostic histological features of early humoral rejection in ABO-incompatible liver transplantation. *Liver Transpl*, 2004 Jan ;10 (1):16–27
 23. Hamilton G., Vogel S., Fuegger R., Gnant FX. Mechanism of Tumor necrosis factor- α and Interleukin-6 induction during human liver transplantation. *Mediators Inflamm*.1993; 2 (4): 303-307.
 24. He, Q., Fan H. Li JQ, Qi HZ. Decreased circulating CD4+CD25highFoxp3+ T cells during acute rejection in liver transplant patients. *Transplant Proc*, 2011 Jun; 43(5): p. 1696-700.
 25. Heidt S, Shankar S, Muthusamy AS, San Segundo D, Wood KJ. Pretransplant serum CXCL9 and CXCL10 levels fail to predict acute rejection in kidney transplant recipients receiving induction therapy. *Transplantation* 2011 Apr 27;91(8):e59-61.
 26. Herrera OB, Golshayan D., Tibbott R., Salcido Ochoa F., James MJ, Marelli-Berg FM, Lechler RI. A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J Immun*, 2004 Oct 15; 173 (8): 4828–4837.
 27. Hochst, B., Schildberg FA, Sauerborn P, Gäbel YA, Gevensleben H. Goltz D., Heukamp LC, Türler A., Ballmaier M., Gieseke F., Müller I., Kalff J., Kurts C., Knolle PA, Diehel L. Activated human hepatic stellate cells induce myeloid derived suppressor cells from peripheral blood monocytes in a CD44-dependent fashion. *J Hepatol*, 2013 Sep; 59(3): p. 528-35.

28. Hoechst B, Gamrekelashvili J, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Plasticity of human Th17 cells and iTregs is orchestrated by different subsets of myeloid cells. *Blood* 2011 Jun 16; 117 (24):6532–6541.
29. Hoechst B, Ormandy LA, Ballmaier M, Lehner F, Kruger C, Manns MP, Greten TF, Korangy F. A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. *Gastroenterology* 2008 Jul; 135 (1):234–243.
30. Hricik DE, Nickerson P, Formica RN, Poggio ED, Rush D., Newell KA., Goebel J., Gibson IW, Fairchild RL., Riggs M., Spain K., Ikle D., Bridges ND, Heeger PS. Multicenter validation of urinary CXCL9 as a risk of stratifying biomarker for kidney transplant injury. *Am J Transplant.* 2013 Oct; 13 (10):2634-2644.
31. Hubscher SG, Buckels JA, Elias E. McMaster P, Neuberger J. Vanishing bile-duct syndrome following liver transplantation – is it reversible?. *Transplantation* 1991 May; 51 (5):1004–1010.
32. Karason, K., Jernas M, Hägg DA., Svensson PA. *Evaluation of CXCL9 and CXCL10 as circulating biomarkers of human cardiac allograft rejection.* *BMC Cardiovascular Disorder*, 2006 Jun 19; 6: p. 29.
33. Karimi, M.H., Daneshmandi S., Pourfathollah AA., Geramizadeh B., Malekhosseini SA, Nikeghbalian S., Yaghobi R., Bolandparvaz S., Association of IL-6 promoter and IFN-gamma gene polymorphisms with acute rejection of liver transplantation. *Mol Biol Rep*, 2011 Oct;38(7): p. 4437-43.
34. Katoh S, McCarthy JB, Kincade PW. Characterization of soluble CD44 in the circulation of mice. Levels are affected by immune activity and tumor growth. *J Immun* 1994 Oct 15;153 (8):3440-3449.
35. Kita Y, Iwaki Y, Demetris AJ, Starzl TE. Evaluation of sequential serum interleukin-6 levels in liver allograft recipients. *Transplantation* 1994 Apr 15; 57(7):1037-1041.
36. Klugewitz K., Blumental-Barby F., Schrage A., Knolle PA., Hamann A., Crispe IN. Immunomodulatory effects of the liver: deletion of activated CD4⁺ effector cells and suppression of IFN-gamma-producing cells after

- intravenous protein immunization *J Immunol*, 2002 Sep 1; 169 (5): 2407–2413.
37. Knechtle, S.J. and J. Kwun. Unique aspects of rejection and tolerance in liver transplantation. *Semin Liver Dis*, 2009 Feb; 29(1): p. 91-101.
 38. Kobayashi, S., Nagano H., Marubashi S., Hama N., Eguchi TA., Takeda Y., Tanemura M., Doki Y., Mori M. Guanylate-binding protein 2 mRNA in peripheral blood leukocytes of liver transplant recipients as a marker for acute cellular rejection. *Transpl Int*, 2010 Apr 1. 23(4): p. 390-6.
 39. Lacotte, S., Brun S., Muller S., Dumortier H. CXCR3, inflammation, and autoimmune diseases. *Ann NY Acad Sci*, 2009 Sep; 1173: p. 310-7.
 40. Lang T, Krams SM, Berquist W, Cox KL, Esquivel CO, Martinez OM. Elevated biliary interleukin 5 as an indicator of liver allograft rejection. *Transpl Immunol*. 1995 Dec;3(4):291-8.
 41. Li W, Lu L., Wang Z., Wang L., Fung JJ., Thomson AW, Qian S. IL-12 antagonism enhances apoptotic death of T cells within hepatic allografts from Flt3 ligand-treated donors and promotes graft acceptance. *J Immunol*, 2001 May 1; 166 (9): 5619–5628.
 42. Limaye R., Lisa R., Dixon and Roberto J. Firpi. Liver Biopsy after Liver Transplantation . INTECH, 2012; Chapter 9: 189-206
 43. Limmer A. Ohl J., Wingender G., Berg M., Jüngerkes F., Schumak B., Djandji D., Scholz K., Klevenz A, Hegenbarth S., Momburg F., Hämmerling GJ., Arnold B., Knolle PA. Cross-presentation of oral antigens by liver sinusoidal endothelial cells leads to CD8 T cell tolerance. *Eur J Immunol*, 2005 Oct; 35 (10): 2970–2981.
 44. Lo D.J., B. Kaplan, and A.D. Kirk. Biomarkers for kidney transplant rejection. *Nat Rev Nephrol*, 2014 Apr; 10(4): p. 215-25.
 45. Lo D.J., Weaver TA, Kleiner DE., Mannon RB., Jacobson LM, Becker BN., Swanson SJ., Hale DA., Kirk DA. Chemokines and their receptors in human renal allotransplantation. *Transplantation*, 2011 Jan 15; 91(1): p. 70-7.
 46. López-Álvarez MR, Campillo JA, Legaz I, Blanco-García RM, Salgado-Cecilia G, Bolarín JM, Gimeno L, Gil J, García-Alonso AM, Muro M, Alvarez-López MR, Miras M, Minguela A. Divergences in KIR2D+ natural killer and KIR2D+CD8+ T-cell reconstitution following liver transplantation. *Hum Immunol*. 2011 Mar; 72(3):229-37.

47. Massoud, O., Heimbach J., Viker K., Krishnan A., Poterucha J., Sanchez W., Watt K., Wiesner R., Charlton M. Noninvasive diagnosis of acute cellular rejection in liver transplant recipients: a proteomic signature validated by enzyme-linked immunosorbent assay. *Liver Transpl*, 2011 Jun; **17**(6): p. 723-32.
48. Millán, O., Benitez C., Guillén D., López A., Rimola A., Sánchez-Fueyo A., Brunet M. Biomarkers of immunoregulatory status in stable liver transplant recipients undergoing weaning of immunosuppressive therapy. *Clin Immunol*, 2010 Dec; **137**(3): p. 337-46.
49. Millán, O., Rafael-Valdivia L., Torrademé E., López A., Fortuna V., Sánchez-Cabus S., López-Púa Y., Rimola A., Brunet M. Intracellular IFN-gamma and IL-2 expression monitoring as surrogate markers of the risk of acute rejection and personal drug response in de novo liver transplant recipients. *Cytokine*, 2013 Feb; **61**(2): p. 556-64.
50. Millán, O., Rafael-Valdivia L., San Segundo D., Boix F., Castro-Panete MJ., López-Hoyos M., Muro M., Valero-Hervás D., Rimola A., Navasa M., Munoz P., Miras M., Andrés A., Guirado L, Pascual J., Brunet M. Should IFN- γ , IL-17 and IL-2 be considered predictive biomarkers of acute rejection in liver and kidney transplant? Results of a multicentric study. *Clin Immunol*, 2014 Oct; **154** (2),141-154.
51. Musat, A.I., Pigott CM., Ellis TM., Agni RM., Levenson GE., Powell AJ., Richards KR., D'Alessandro AM., Lucey MR. Pretransplant donor-specific anti-HLA antibodies as predictors of early allograft rejection in ABO-compatible liver transplantation. *Liver Transpl*, 2013 Oct; **19**(10): p. 1132-41.
52. Nakagiri, T., inoues M., Minami M., Shintani Y., Okumura M., *Immunology mini-review: the basics of T(H)17 and interleukin-6 in transplantation*. *Transplant Proc*, 2012 May; **44**(4): p. 1035-40.
53. Naor D, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L, Faitelson Y. CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2002 Nov; **39** (6):527-579.
54. Nayoung Kim, Young-In Yoon, Hyun Ju Yoo, Eunyoung Tak, Ahn CS, Song GW., Lee SG., Hwang S. Combined detection of Serum IL-10, IL-17 and CXCL10 predicts acute rejection following adult liver transplantation. *Mol Cells* 2016 Aug 31; **39** (8): 639-644.

55. Olofsson, B., H. Porsch, and P. Heldin. Knock-down of CD44 regulates endothelial cell differentiation via NFkappaB-mediated chemokine production. *PLoS One*, 2014 Mar 10; 9(3): p. e90921.
56. Padbury RT, Gunson BK, Dousset B., Hubscher SG., Buckels JA., Neuberger JM., Elias E., McMaster P. Steroid withdrawal from long-term immunosuppression in liver allograft recipients. *Transplantation*, 1993 Apr; 55 (4):789–794
57. Perrella O, Sbreglia C, Arenga G., Perella A., Ferrara A., D'Antonio A., Di Conzanzo G. Atripadi L., Alone C., Sciano D., Cuomo O. Acute rejection after liver transplantation: Is there a specific immunological pattern?. *Transplant Proc*, 2006 Dec; 38 (10):3594–3596.
58. Randow F., Syrbe U., Meisel C., Krausch D., Zuckermann H., Platzer C., Volk HD. Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. *J Exp Med*, 1995 May; 181 (5): 1887–1892
59. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. *Duale Reihe Biochemie*. Georg Thieme Verlag, 2008 ; p. 543.
60. Regev VA., Molina E., Moura R., Bejarano PA., Khaled A., Ruiz P., Arheart K., Berho M., Drachenberg CB., Mendez P., O'Brien C., Jeffers L., Tzakis A., Schiff ER. Reliability of histopathologic assessment for the differentiation of recurrent hepatitis C from acute rejection after liver transplantation. *Liver Transpl*, 2004 Oct;10(10): p. 1233-9.
61. Roedder S, Vitalone M, Khatri P, Sarwal MM. Biomarkers in solid organ transplantation: establishing personalized transplantation medicine. *Genome Medicine*, 2011;3:37.
62. Rook M, Rand E. Predictors of long-term outcome after liver transplant. *Curr Opin Organ Transplant*, 2011 Oct;16 (5):499-504.
63. Rosenblum, J.M., Shimoda N., Schenk N., Schenk AD., Zhang H., Kish DD., Keslar K., Farber JM., Fairchild RL. CXC chemokine ligand (CXCL) 9 and CXCL10 are antagonistic costimulation molecules during the priming of alloreactive T cell effectors. *J Immunol*, 2010 Apr 1; 184(7): p. 3450-60.
64. Rostaing L, Saliba F, Calmus Y, Dharancy S, Boillot O. Review article: use of induction therapy in liver transplantation. *Transplant Rev (Orlando)*, 2012 Oct; 26(4):246-260.

65. Rotondi, M., Netti GS., Lazzeri E., Stallone G., Bertoni E., Chiovato L., Grandaliano G., Gesualdo L., Salvadori M., Schena FP., Romagnani P., Serio M. High pretransplant serum levels of CXCL9 are associated with increased risk of acute rejection and graft failure in kidney graft recipients. *Transpl Int*, 2010 May 1; 23(5): p. 465-75.
66. Rouschop, K.M., Roelofs JJ., Rowshani AT., Leemans JC., van der Poll T., Ten Berge IJ., Weening JJ., Florquin S. Pre-transplant plasma and cellular levels of CD44 correlate with acute renal allograft rejection. *Nephrol Dial Transplant*, 2005 Oct; 20(10): p. 2248-54.
67. Rouschop, K.M., Roelofs JJ., Sylva M., Rowshani AT., Ten Berge IJ., Weening JJ., Florquin S. Renal expression of CD44 correlates with acute renal allograft rejection. *Kidney Int*, 2006 Sep; 70(6): p. 1127-34.
68. Schmidt, J., Müller SA., Mehrabi A., Schemmer P., Büchler MW. [Orthotopic liver transplantation. Techniques and results]. *Chirurg*, 2008; 79(2): p. 112-20.
69. Testro, A.G., Vishvanathan K., Skinner N., Markovska V., Crowley P., Angus PW., Gow PJ. Acute allograft rejection in human liver transplant recipients is associated with signaling through toll-like receptor 4. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011 Jan; 26(1): p. 155-63.
70. Théry C., Duban L., Segura E., Véron P., Lantz O., Amigorena S. Indirect activation of naive CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol*, 2002 Dec; 3(12): 1156–1162.
71. Thomson AW., Lu L., Wan Y., Qian S., Larsen CP., Starzl TE. Identification of donor-derived dendritic cell progenitors in bone marrow of spontaneously tolerant liver allograft recipients. *Transplantation*, 1995 Dec 27 ; 60(12): 1555–1559.
72. Warlé MC, Metselaar HJ, Hop WC, Tilanus HW. Cytokine gene polymorphisms and acute liver graft rejection: a meta-analysis. *Liver Transpl*. 2005 Jan;11(1):19-26.
73. Werner, J.M., Lang C., Scherer MN., Farkas SA., Geissler EK., Schlitt HK., Hornung M. Distribution of intrahepatic T, NK and CD3(+)CD56(+)NKT cells alters after liver transplantation: Shift from innate to adaptive immunity?

Transpl Immunol, 2011 Jul; 25(1): p. 27-33.

74. Zea AH, Rodriguez PC, Atkins MB, Hernandez C, Signoretti S, Zabaleta J, McDermott D., Quiceno D., Youmans A., O'Neill A., Mier J., Ochoa AC. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res* 2005 Apr;65(8):3044-8.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, [Kukuh Aji Prabowo], versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [CXCL9 und CD44 als Serumproteinbiomarker zur Diagnostik der akuten zellulären Rejektion nach Lebertransplantation] selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

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

Datum:

Unterschrift

Anteilerklärung

[Kukuh Aji Prabowo] hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Raschzok, N., Reutzel-Selke, A., Schmuck, R. B., Morgul, M. H., Gauger, U., **Prabowo, K. A.**, Tannus, L. M., Leder, A., Struecker, B., Boas-Knoop, S., Bartels, M., Jonas, S., Lojewski, C., Puhl, G., Seehofer, D., Bahra, M., Pascher, A., Pratschke, J., Sauer, I. M., *CD44 and CXCL9 serum protein levels predict the risk clinically significant allograft rejection after liver transplantation*. Liver Transpl, 2015

Beitrag im Einzelnen: Aus meiner Labortätigkeit bei der Aufarbeitung der Proben und den ELISA-Messungen und meiner statistischen Auswertung sind alle Graphiken und Tabellen in meiner Dissertation entstanden.

Datum:

Unterschrift

Lebenslauf

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

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinen Eltern für den stetigen Rückhalt nicht nur während Studium und Promotion danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Sauer, Leiter der Arbeitsgruppe Experimentelle Chirurgie und Regenerative Medizin Charité Universitätsmedizin Berlin für die Vergabe des Themas sowie den großen Freiraum den er mir bei Planung und Durchführung der Arbeit einräumte und seiner steten Ansprechbarkeit und tatkräftigen Unterstützung bei der Umsetzung.

Besonders danken möchte ich PD Dr. med Nathanael Raschzok, Experimentelle Chirurgie und Regenerative Medizin Charité Universitätsmedizin Berlin für die stetige Unterstützung bei der Umsetzung der Studie und Dr. Anja-Reutzel Selke, Experimentelle Chirurgie Charité Universitätsmedizin Berlin, für die tatkräftige Unterstützung bei der statistischen Analyse und Methodik der ELISA der Serumproben.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. rer.medic. Anne Katrin Leder, Herrn Steffen Lippert, und Herrn Peter Tang, Experimentelle Chirurgie Charité Berlin für die Geduld und stetige Unterstützung beim Erlernen der Methodik von ELISA, PCR und Western Blot und allen Mitarbeitern sowie Doktoranden der Experimentelle Chirurgie für die Unterstützung bei der Sammlung aller Proben während der Studie. Außerdem gilt mein besonderer Dank an die Kollegen in der Universitätsklinik Leipzig für die Unterstützung und Zusammenarbeit während der Studie.

Abschließend möchte ich allen Krankenpflegern sowie Stationsärzten der chirurgischen Station, Charité Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie für die Unterstützung während der Studie und ihre stetige Ansprechbarkeit danken.