

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie

Prof. Dr. med. Lutz Fischer
Direktor (komm.)

Die Bedeutung von CD73-Genpolymorphismen für die akute zelluläre Abstoßung nach Lebertransplantation

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Lena Elisabeth Onken
aus Varel (Oldenburg)

Hamburg 2018

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 29.10.2018

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Martina Koch

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter: Prof. Dr. Linda Diehl

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Lebertransplantation	1
1.1.1	Therapie nach Transplantation	1
1.1.2	Komplikationen bei Transplantation	2
1.1.2.1	Transplantatabstoßung und HLA-Antigene	2
1.1.2.1.1	Erkennung von Alloantigenen	3
1.1.2.2	Akute Abstoßung	5
1.2	Verstärkung der Immunantwort akuter zellulärer Abstoßungen durch ATP	6
1.3	Der CD39-/CD73-Pathway	7
1.3.1	Signalkaskade des CD39-/CD73-Pathway	7
1.3.2	Die 5' Ektonukleotidase CD73	8
1.3.3	Adenosin	9
1.3.4	Adenosin als Mechanismus der Immunregulation von T _{regs}	12
1.4	Ischämie und Reperfusion als Schädigungsmechanismen	13
1.5	Biomarker	14
1.6	Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs)	15
1.6.1	SNPs des Enzyms CD73	15
1.6.1.1	SNP rs9450279	15
1.6.1.2	SNP rs4458647	16
1.6.1.3	SNP rs6922	16
2	FRAGESTELLUNG	17
3	MATERIAL UND METHODEN	19
3.1	Material	19
3.1.1	Geräte	19
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	20
3.1.3	Reagenzien	20
3.1.4	Programme	21
3.2	Methoden	21
3.2.1	Studiendesign	21

3.2.2	Einschlusskriterien	21
3.3	Ethikvotum	23
3.3.1.1	DNA-Proben.....	23
3.3.2	Endpunktgenotypisierung.....	23
3.3.2.1	TaqMan®-Master Mix	24
3.3.2.2	SNP Genotyping Assay Mix.....	24
3.3.2.3	Durchführung	27
3.3.2.4	Festlegung von Versuchsbedingungen und Auswählen von Standards	28
3.3.2.5	Auswertung	29
3.3.3	Statistische Tests	29
3.3.3.1	Statistische Methoden für die Gegenüberstellung des Patientenkollektivs.....	30
3.3.3.2	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	30
3.3.3.3	Vererbungsmodelle	30
3.3.3.4	Binär logistische Regression.....	31
4	ERGEBNISSE	32
4.1	Patientenkollektiv	32
4.2	Verteilung der SNPs	36
4.2.1	Anzahl der nicht typisierten SNPs.....	36
4.2.2	Hardy-Weinberg	36
4.2.3	Ergebnisse der SNP-Verteilung	37
4.2.4	Frequenzvergleich.....	39
4.2.5	Explorative Analyse.....	40
4.2.5.1	rs9450279	41
4.2.5.2	rs4458647	42
4.2.5.3	rs6922	42
5	DISKUSSION	44
5.1	CD73.....	44
5.1.1	rs6922	45
5.1.2	rs9450279, rs4458647	47
5.2	Das Patientenkollektiv.....	49
5.2.1	Ursachen für ergebnislose Endpunktgenotypisierungen.....	49
5.2.2	Empfängeralter.....	50
5.2.3	Grunderkrankungen	50
5.2.4	Das Spenderalter	50

5.3	Weitere Einflussfaktoren.....	51
5.3.1	Ischämie und Reperfusion als Schädigungsmechanismus.....	51
6	FAZIT UND AUSBLICK.....	52
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	54
8	SUMMARY.....	55
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	56
10	LITERATURVERZEICHNIS.....	57
11	DANKSAGUNG.....	67
12	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	68

1 Einleitung

1.1 Lebertransplantation

Bei Lebererkrankungen ist die Transplantation in vielen Fällen die einzige kurative Behandlungsmethode. Die rechtliche Grundlage zur Spende und Übertragung von Organen bildet dabei das Transplantationsgesetz (DSO 2014b). Eine Warteliste wird von Eurotransplant in Leiden (Niederlande) geführt (DSO 2015a). Dort werden die Daten der Patienten aus Deutschland, den Niederlanden, Belgien, Luxemburg, Österreich, Slowenien, Kroatien und Ungarn verwaltet, um eine möglichst große Chance und geringe Wartezeit bis zum Erhalt des passenden Organs zu ermöglichen.

Für die Evaluation zur Transplantation gibt es für jedes Organ standardisierte Kriterien. Fällt die Entscheidung daraufhin auf die Notwendigkeit einer Transplantation, wird der Patient bei Eurotransplant gelistet und ein Organ nach festgelegten Richtlinien vergeben.

Es finden weltweit täglich Organtransplantationen statt. In Deutschland wurden 2014 2.989 Organe entnommen und sowohl in Deutschland als auch im Ausland transplantiert (DSO 2015b). Nach der Niere ist die Leber das am zweithäufigsten transplantierte Organ (DSO 2014b). 2014 wurden 879 transplantierte Lebern nach postmortaler Spende verzeichnet, wobei 67 davon am Uniklinikum Hamburg durchgeführt wurden (DSO 2014a).

Eine der häufigsten Indikationen zur Transplantation ist die ethyltoxische oder virusbedingte Leberzirrhose (Göke & Auernhammer 2006, p.141).

1.1.1 Therapie nach Transplantation

Durch das Immunsystem des Transplantatempfängers wird das Organ in der Regel als fremd erkannt. Um Abstoßungsreaktionen zu verhindern, ist für jeden Patienten eine lebenslange immunsuppressive Therapie nötig. Diese bringt allerdings häufig schwere Nebenwirkungen und ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung opportunistischer Infektionen und Neoplasien mit sich (Pillai & Levitsky 2009). Dabei ist es Aufgabe eine Immunsuppression so zu wählen, dass eine Abstoßung verhindert wird, gleichzeitig Infektionen kontrollierbar und Nebenwirkungen nicht zu stark sind (Pillai & Levitsky 2009; ASTS 2003).

Die klinische Praxis hat gezeigt, dass Patienten eine sehr unterschiedliche Prädisposition für die Entwicklung einer akuten Abstoßungsreaktion zeigen (Mazariegos et al. 1997). Da es

aber bisher keine Marker gibt, um das Risiko präoperativ zu bestimmen, werden aktuell mehr oder weniger Standardprotokolle für die Therapie nach Lebertransplantation verwendet (Charlton 2013).

In der Regel wird mit einer hochdosierten Induktionstherapie begonnen, die im weiteren Verlauf reduziert wird (Sanchez-Fueyo & Strom 2011). Damit soll die Entzündungsreaktion, die unter anderem durch das perioperative chirurgische Trauma und die Ischämiezeit (Kapitel 1.4) hervorgerufen wird, unterdrückt werden. Im Normalfall werden die Patienten mit einer dualen Therapie aus Kortison und einem Calcineurin-Inhibitor (CNI) behandelt (Pillai & Levitsky 2009).

1.1.2 Komplikationen bei Transplantation

1.1.2.1 Transplantatabstoßung und HLA-Antigene

Bei der Abstoßungsreaktion wird das Transplantat als fremd erkannt. Dies beruht auf bestimmten Antigenen, den Alloantigenen (Vollmar et al. 2013, p.128 f.). Sie sind bei verschiedenen Individuen einer Spezies unterschiedlich. Die Alloantigene, die die stärkste Immunantwort auslösen sind die HLA-Antigene, die zum Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, major histocompatibility complex) gehören.

Unterschieden werden HLA-Antigene der Klasse I und der Klasse II. HLA-Klasse I-Antigene befinden sich auf allen kernhaltigen Zellen und Thrombozyten (Kruse et al. 2015, p.179 ff.). Es gibt mehrere Gene für HLA-Klasse I-Antigene. Diese befinden sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 6. Die drei häufigsten HLA-Klasse I-Antigene sind HLA-A, HLA-B und HLA-C. HLA-Klasse II-Antigene werden von antigenpräsentierenden Zellen (APC) exprimiert. Dazu gehören unter anderem B-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen. Die HLA-Klasse II-Antigene unterteilen sich in HLA-DR-, HLA-DQ- und HLA-DP-Antigene.

Sowohl diese Polygenie, als auch Polymorphismen tragen zur Diversität von HLA-Antigenen bei (Kruse et al. 2015, p.179). Die Anzahl der Polymorphismen bei HLA-Antigenen ist sehr groß. Diese Diversität bietet große Vorteile bei der Abwehr von Krankheitserregern, macht die Übereinstimmung der HLA-Typen zwischen zwei Individuen aber sehr unwahrscheinlich. Je kleiner die Übereinstimmung bei Empfänger und Spender jedoch ist, desto größer die Wahrscheinlichkeit einer Transplantatabstoßung (Kruse et al. 2015, p.179 ff.).

1.1.2.1.1 Erkennung von Alloantigenen

Es werden prinzipiell zwei verschiedene Mechanismen der Antigenerkennung unterschieden:

1. Die direkte Erkennung

Bei der direkten Erkennung spielen T-Zellen eine entscheidende Rolle. T-Zellen lassen sich in zwei Gruppen einteilen, die T-Helferzellen (T_H -Zellen) und die zytotoxischen T-Zellen (T_C -Zellen). T_C -Zellen tragen das CD8-Antigen auf der Oberfläche und erkennen über den T-Zell-Rezeptor HLA-Klasse I-Antigene. T_H -Zellen tragen das CD4-Antigen und werden durch HLA-Klasse II-Antigene stimuliert. T_H -Zellen lassen sich funktionell in Gruppen teilen: T_H1 -, T_H2 -, T_H17 - und regulatorische T-Zellen (T_{reg}) (Vollmar et al. 2013; Prezzemolo et al. 2014).

T_H -Zellen differenzieren sich unter Stimulation von IL-12, welches antigenpräsentierende Zellen sezernieren, zu T_H1 -Zellen (Vollmar et al. 2013, p.34 ff.). Sie regulieren Entzündungsreaktionen und bekämpfen intrazelluläre Erreger wie Bakterien. Über den T-Zell-Rezeptor werden sie durch das HLA-Klasse II-Antigen aktiviert und zur Sekretion von IFN- γ , TNF- α und IL-2 angeregt. Über diese Zytokine kommt es zur Rekrutierung weiterer Immunzellen, wie zum Beispiel Makrophagen, sowie zur Verstärkung der Aktivierung von T_C -Zellen.

T_H2 -Zellen produzieren die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 (Vollmar et al. 2013, p.34). Über diese können sie B-Zellen oder eosinophile Granulozyten aktivieren.

T_H17 -Zellen produzieren IL-17A, IL-17F, IL-21 und IL-22 (Zhu et al. 2010). Sie spielen eine Rolle im Entzündungsprozess und bei der Abwehr extrazellulärer Bakterien.

T_{regs} sind CD4/CD25-positive Zellen, die durch den Transkriptionsfaktor FoxP3 (Forkhead-Box-Protein) charakterisiert sind (Vollmar et al. 2013, p.35). Sie sezernieren immunsuppressive Zytokine wie IL-10 und TGF- β und sind darüber in der Lage Immunantworten zu inhibieren. Unter Punkt 1.3.4 wird genauer auf T_{regs} eingegangen.

Beim Mechanismus der direkten Erkennung werden antigenpräsentierende Zellen des Spenders in die Lymphbahnen geschwemmt und gelangen in die T-Zell-Region von Lymphknoten (Vollmar et al. 2013, p.129). Sie werden als „Passagierleukozyten“ bezeichnet. Im Lymphknoten präsentieren sie Peptide über HLA-Klasse I- und HLA-Klasse II-Antigene, die von T-Zellen des Organempfängers erkannt werden. Diese werden daraufhin unter Beteiligung von kostimulatorischen Faktoren aktiviert und zur

Proliferation angeregt. CD4⁺-T-Zellen im Lymphknoten erkennen sowohl das HLA-Klasse II-Antigen als fremd als auch die Peptide, die dort präsentiert werden. Die unreife Th₀-Zelle differenziert sich unter Kostimulation von IL-12 des „Passagierleukozyten“ zur Th₁-Zelle und wird aktiviert.

Durch die HLA-Klasse I-Antigene werden CD8⁺-Zellen (T_c-Zellen) aktiviert (Sanchez-Fueyo & Strom 2011). Diese Aktivierung wird durch IL-2 verstärkt, welches von den aktivierten Th₁-Zellen freigesetzt wird.

Die aktivierten zytotoxischen T-Zellen gelangen zum Transplantat (Vollmar et al. 2013, p.129 f.). Th₁-Zellen produzieren neben dem IL-2 das proinflammatorische IFN-γ und TNF-α und induzieren auf diese Weise eine Entzündungsreaktion durch Stimulation weiterer Entzündungszellen wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Die T_c-Zellen zerstören das Leberparenchym durch Granzyme und Perforine sowie über die FAS/FAS-Ligand Interaktion (Abbildung 1) (Vollmar et al. 2013, p.129 f. & Nagata 1999). Neben diesen Mechanismen bilden sich zusätzlich T-Gedächtniszellen (Sanchez-Fueyo & Strom 2011). Bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Antigen läuft die Immunantwort so schneller und effektiver ab.

Die direkte Antigenpräsentation ist die Grundlage für die Ausprägung einer akuten zellulären Abstoßungsreaktion.

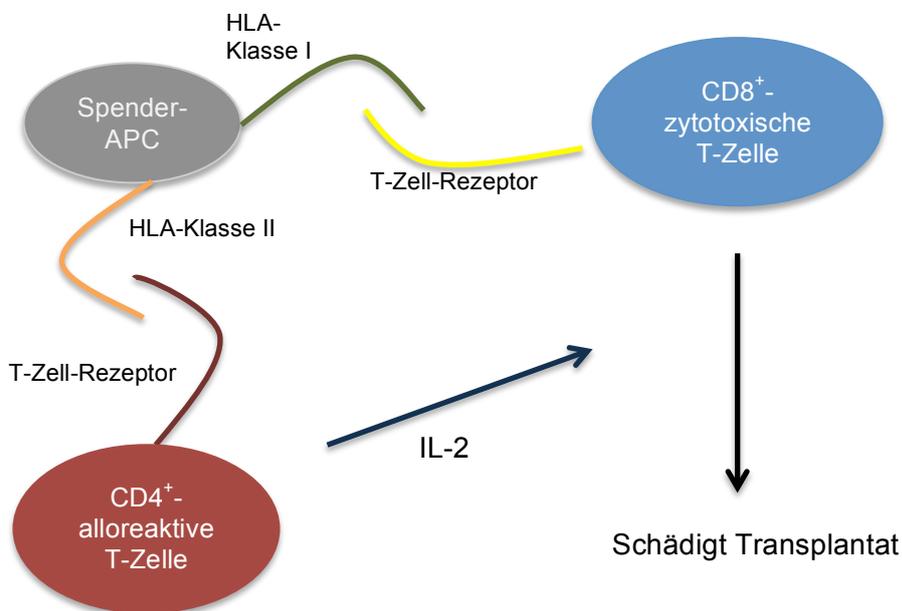


Abbildung 1: Der direkte Weg der Allogenerkennung (Quelle: Vollmar et al. 2013, pp.130, Abb. 5.29, modifiziert)

2. Die indirekte Erkennung

Bei der indirekten Erkennung präsentieren APC des Empfängers über HLA-Klasse II-Antigene Peptide von Proteinen aus dem Transplantat (Vollmar et al. 2013, p.129 f.). Unterscheiden sich Organspender und Organempfänger in der Aminosäuresequenz dieser Peptide, so wird das Peptid von der CD4-T-Zelle des Organempfängers als fremd erkannt. Die Peptide aktivieren dann diese CD4⁺-Zellen zur Zytokinausschüttung, wodurch Plasmazellen entstehen, die Antikörper gegen das Transplantat synthetisieren.

Die indirekte Erkennung spielt somit vor allem für die Ausprägung einer humoralen Abstoßung eine Rolle.

1.1.2.2 Akute Abstoßung

Die Inzidenz der akuten Abstoßung liegt bei immunsupprimierten Patienten bei ca. 30-50% (Gómez-Manero et al. 2001; Ziolkowski et al. 2003; Shaked et al. 2009; Dousset et al. 1998). Sie tritt Tage bis Wochen nach einer Transplantation auf (Stift & Dienes 2014). Späte akute Abstoßungen können bis ein Jahr nach einer Transplantation auftreten. Eine einzelne akute Abstoßung ist gut therapierbar. Es ist aber bekannt, dass wiederholte Abstoßungsreaktionen langfristig zu Schäden am Organ führen und das Risiko für eine chronische Abstoßung erhöhen (Dousset et al. 1998).

Eine Abstoßungsreaktion geht oft mit Fieber, Hepatomegalie und vermindertem Gallefluss einher (Stift & Dienes 2014). Späte akute Abstoßungen können sich auch asymptomatisch präsentieren.

Bekannte Risikofaktoren für eine akute Abstoßungsreaktion sind ein jüngeres Alter der Empfänger, ein Spenderalter >30 Jahre, Kreatinin-Level >2,0mg/dL ohne Dialyse, AST-Level >200 U/L, Spender/Empfänger HLA-Mismatche sowie eine lange Ischämiezeit (Wang et al. 2016; Charlton 2013; Wiesner et al. 2003).

Bei der akuten Abstoßung unterscheidet man zwischen der akuten humoralen und der akuten zellulären Abstoßungsreaktion.

Die akute humorale Abstoßungsreaktion wird durch donorspezifische Antikörper vermittelt (Denk 2000, p.817). Diese können entweder, genauso wie bei der hyperakuten Abstoßungsreaktion, schon im Organismus vorhanden sein oder sie entwickeln sich nach der Transplantation. Sie können gegen HLA-Antigene, Blutgruppenantigene oder andere Antigene z.B. auf Endothelzellen gerichtet sein. Wie schon zuvor beschrieben kommt es

auch hier zu Endothelschäden mit Thrombenbildung und Blutungen. Diese antikörpervermittelte Abstoßung wird bei Transplantationen nach Nieren-, Herz- und Lungentransplantationen oft beobachtet. Die Leber scheint gegen diese Form der Abstoßung sehr robust zu sein, sodass die akute zelluläre Abstoßungsreaktion eine größere Rolle spielt (Sanchez-Fueyo & Strom 2011). Aus diesem Grund wird in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf die akute zelluläre Abstoßung gelegt.

Die akute zelluläre Abstoßungsreaktion beruht, wie bereits erwähnt, vor allem auf dem Mechanismus der direkten Antigenerkennung (1.1.2.1.1) (Vollmar et al. 2013, p.129 f.). Zum Einen kommt es zur Zerstörung des Gewebes durch T_C -Zellen, zum Anderen wird durch die $CD4^+$ -Zellen eine Entzündungsreaktion ausgelöst und weitere Immunzellen werden angelockt.

Die Behandlung der akuten Abstoßung erfolgt mit Kortison (Pillai & Levitsky 2009). Ist die Therapie mit Kortison nicht erfolgreich werden andere Medikamente in Form von poly- oder monoklonalen Antikörpern angewandt. Eine akute Abstoßungsreaktion kann somit in der Regel gut therapiert werden.

1.2 Verstärkung der Immunantwort akuter zellulärer Abstoßungen durch ATP

Die intrazelluläre ATP-Konzentration ist im Gegensatz zur extrazellulären ATP-Konzentration sehr hoch (Borsellino et al. 2007). Sie liegt bei etwa 3-5 mmol/L. Bei einer Zerstörung der Leberparenchymzellen durch die T_C -Zellen, wie im Verlauf der akuten zellulären Abstoßungsreaktion, wird ATP freigesetzt und die extrazelluläre ATP-Konzentration steigt (Roberts et al. 2014). Extrazelluläres ATP wirkt auf verschiedenen Wegen proinflammatorisch:

Zum Einen wirkt es als Damage associated molecular pattern (DAMP), als sogenanntes „find me signal“ (Vaughn et al. 2014). Es werden Immunzellen wie Eosinophile, Neutrophile, Makrophagen, dendritische Zellen, Monozyten und T-Zellen zum Ort der Läsion gelockt. Diese verstärken über die Bildung weiterer proinflammatorischer Zytokine die Immunantwort (Borsellino et al. 2007; Trautmann 2009; Prezzemolo et al. 2014). Es ist bekannt, dass ATP speziell auf Monozyten zur verstärkten Sekretion von IL-1 β führt, wodurch bei dendritischen Zellen die Reifung gefördert wird (Borsellino et al. 2007).

Zum Anderen kann ATP als Ligand der P2-Rezeptorgruppe wirken. Dabei bindet es an die Rezeptoren P2X und P2Y und aktiviert auf diese Weise weitere Immunzellen. Beide Rezeptortypen sind auf Immun- und Epithelzellen hoch exprimiert. P2X-Rezeptoren werden fast ausschließlich von ATP stimuliert, wobei die ATP-Konzentration, wie bei Zellschädigung,

sehr hoch sein muss. P2Y-Rezeptoren können auch durch andere Nukleotide aktiviert werden (Jacobson 2010; Trautmann 2009).

Bei den Rezeptoren der P2X-Familie handelt es sich um ligandengesteuerte Ionenkanäle. Die Aktivierung führt zu einer erhöhten Permeabilität für Natrium und Calcium (Ca^{2+}) mit nachfolgender Depolarisation der Zelle (Jacobson 2010; Vaughn et al. 2014). Die P2Y-Rezeptor-Familie sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren und verursachen über eine Phospholipase einen Ca^{2+} -Anstieg (Trautmann 2009).

Eine Stimulation durch ATP führt zum größten Teil zu proinflammatorischen Antworten (Borsellino et al. 2007).

Bei einer akuten zellulären Abstoßungsreaktion, die zur Zellschädigung und ATP-Freisetzung führt, kann auf diesen beiden Wegen eine Entzündungsreaktion hervorgerufen werden (Abbildung 2).

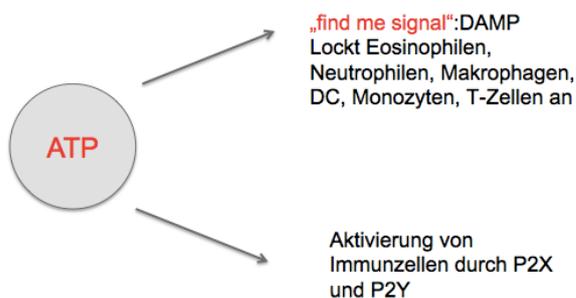


Abbildung 2: Verstärkung der Immunantwort durch ATP

1.3 Der CD39-/CD73-Pathway

1.3.1 Signalkaskade des CD39-/CD73-Pathway

Die extrazelluläre ATP-Konzentration ist sehr gering ($\sim 10\text{nM}$) (Trautmann 2009). Dies wird als Folge der Aktivierung von Ektonukleotidasen angesehen, welche ATP abbauen. Kommt es durch einen Zellschaden zu plötzlich sehr hohen extrazellulären ATP-Konzentrationen, so wird das proinflammatorische ATP ebenfalls durch Ektonukleotidasen zu AMP und Adenosin abgebaut. Die Ektonukleotidasen CD39 und CD73 spielen dabei eine besonders große Rolle (Roberts et al. 2014). CD39 hydrolysiert ATP zu AMP. Adenosin entsteht durch die 5' Ektonukleotidase CD73 aus AMP (Abbildung 3). Die beiden Enzyme sind sowohl auf B-Zellen als auch auf T_{regs} koexprimiert.



Abbildung 3: CD39-/CD73-Pathway

Der CD39-/CD73-Pathway wurde schon in diverser Hinsicht untersucht und kann die Pathophysiologie verschiedener Systeme verändern, wie beispielsweise bei AIDS (Nikolova et al. 2011), Autoimmunerkrankungen (Deaglio & Robson 2011), Arteriosklerose (Yoshino et al. 2014), Ischemia-Reperfusion-Injury (Roberts et al. 2014), Neoplasien (Zhang 2012) und Infektionen (Deaglio & Robson 2011). Die zentrale Rolle von CD39 in Bezug auf akute Abstoßungsreaktion nach Lebertransplantation zeigten Yoshida et. al. (Yoshida et al. 2015). Spenderlebern ohne CD39 wurden in Mäuse transplantiert und zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Lebern signifikant vermehrte Zeichen einer akuten Abstoßung in Form von erhöhten Leberenzymen und histopathologischen Entzündungszeichen nach dem Banff-Schema. Ein so konkreter Nachweis für den Zusammenhang mit der akuten Abstoßung nach Lebertransplantation existiert für die Ectonukleotidase CD73 nicht, lässt sich aus den geschilderten Zusammenhängen jedoch vermuten.

1.3.2 Die 5' Ectonukleotidase CD73

Die 5'-Ectonukleotidase CD73, die auch als NT5E (5'-Nucleotidase ecto) bezeichnet wird, weist ein Molekulargewicht von 70kDa auf und hydrolysiert das durch CD39 entstandene AMP zu Adenosin (Romio 2010). Somit ist sie das letzte Glied im Abbau von ATP zu Adenosin (Abbildung 3).

Sie kann in einer löslichen oder membrangebundenen Form vorliegen. Ihr Aufbau entspricht einem dimerischen extrazellulären Glykoprotein, das durch einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker in der Plasmamembran befestigt ist (Longhi et al. 2013; Deaglio et al. 2007). Sie ist auf Endothelzellen, ruhenden B-Zellen, T-Zellen inklusive T_{regs}, Neutrophilen, NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen und auch dem Leberparenchym exprimiert (Roberts et al. 2014; Kobie et al. 2006). Die Expression von CD73 wird hochreguliert bei Hypoxie, sowie durch die Zytokine TGF-β und IFN-α (Volmer et al. 2006).

Durch die Züchtung von CD73-knock out-Mäusen in Laboren, ergeben sich zunehmend Hinweise über die Funktion des Enzyms in vielen biologischen Funktionen. Unter hypoxischen Bedingungen zeigten CD73-knock out-Mäuse vor allem in der Lunge eine erhöhte Gefäßpermeabilität mit nachfolgenden Ödemen und entzündlichen Infiltraten (Thompson 2004). Eine Assoziation mit einem prothrombotischen, proinflammatorischen Phänotyp wurde in Gefäßen gesehen (Koszalka et al. 2004; Zerneck et al. 2006). In

Autoimmunerkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis war bei CD73-knock out-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp ein ausgeprägteres Krankheitsbild mit erhöhter Expression proinflammatorischer Zytokine ebenso wie einer verstärkten Th1-Zell-Antwort zu sehen (Chrobak et al. 2015). Blume et al zeigten bei langfristiger CD73-Defizienz eine verringerte Nierenfunktion durch eine autoimmun-induzierte Entzündungsreaktion (Blume et al. 2012). Die zentrale Rolle von CD73 in der Immunregulation zeigten Volmer et. al. in einer Studie mit CD73-knock out-Mäusen, die signifikant weniger Adenosin produzierten als die Wildtyp-Vergleichsgruppe und daraufhin stärkere Entzündungsreaktionen als Antwort auf Bleomycin-induzierten Zellschaden entwickelten (Volmer et al. 2006).

Ein direkter Nachweis eines Zusammenhangs mit akuter zellulären Abstoßung nach Lebertransplantation besteht bisher nicht. Es ist aber bekannt, dass bei der Abstoßungsreaktion ATP frei wird, welches potentiell proinflammatorisch wirkt. Eine Entzündungsreaktion kann dann über CD73 und die Produktion von Adenosin reguliert werden (Longhi et al. 2013). Bei einem Defizit von CD73 ist diese Funktion eingeschränkt.

1.3.3 Adenosin

Das durch CD73 entstandene Adenosin ist ein Nukleosid, das aus dem Purin Adenin besteht und über eine N-glykosidische Bindung an ein Ribosezuckermolekül gebunden ist (Abbildung 4) (Romio 2010).

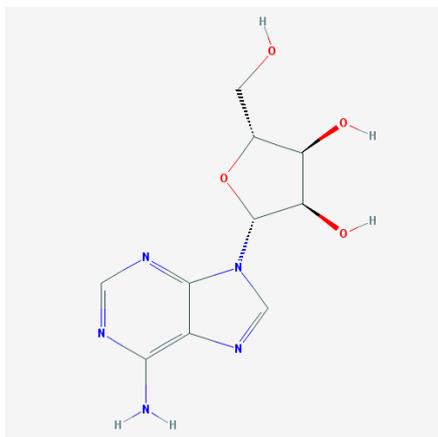


Abbildung 4: Struktur von Adenosin (PubChem 2017)

Adenosin wirkt über verschiedene Rezeptoren der P1-Rezeptor-Familie (Roberts et al. 2014). Dazu gehören die vier G-Protein gekoppelte Rezeptoren A_1 , A_{2A} , A_{2B} und A_3 (Abbildung 5).

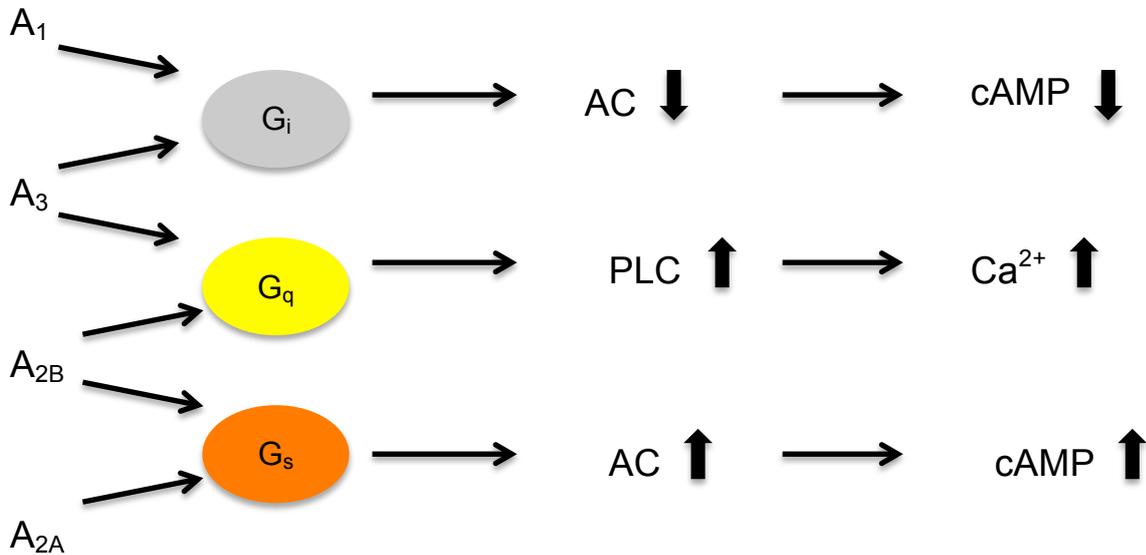


Abbildung 5: Molekulare Wirkung der Adenosinrezeptoren

Sowohl der A_1 -, als auch der A_3 -Rezeptor wirken über ein G_i -Protein, was zum Abfall der Aktivität der Adenylatzyklase und daraufhin verringerter cAMP-Konzentration führt. Cronstein et al. haben gezeigt, dass der A_1 -Rezeptor proinflammatorische Wirkung hat und die Chemotaxis und Adhäsion Neutrophiler ans Endothel fördert (Cronstein et al. 1992). Der A_3 -Rezeptor zeigt über das G_i -Protein antiinflammatorische Effekte. Er inhibiert die Chemotaxis eosinophiler Leukozyten und die Degranulation neutrophiler Granulozyten (Bouma et al. 1997; Knight et al. 1997).

Durch die Aktivierung der Phospholipase C und Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration über ein G_q -Protein wurde sowohl durch den A_3 -Rezeptor als auch durch den A_{2B} -Rezeptor eine Aktivierung von Lymphozyten gezeigt (Quintana et al. 2011).

A_{2A} - und A_{2B} -Rezeptor wirken beide über ein G_s -Protein, was in einer Erhöhung der cAMP-Konzentration resultiert (Roberts et al. 2014). Darüber verhindern beide Rezeptoren u.a. einen oxidativen Burst neutrophiler Granulozyten (Bouma et al. 1997).

Auch wenn Adenosin unspezifisch an alle Rezeptoren bindet und somit anti- und proinflammatorische Wirkungen entfalten kann, haben pharmakologische Studien gezeigt, dass die antiinflammatorischen Effekte des Adenosins im Immunsystem überwiegen. Adenosin konnte in verschiedenen Organen wie Leber, Lunge, Niere, Herz und Gastrointestinal-Trakt Entzündungen hemmen (Ohta & Sitkovsky 2014; Eltzschig et al.

2012). Dies steht vor allem im Zusammenhang mit dem A_{2A} -Rezeptor, welcher für die Modulation der Entzündung verantwortlich ist und sich auf nahezu allen Immunzellen findet (Jones & Kang 2015). Die wichtige antiinflammatorische Funktion wurde von Ohta et al. gezeigt, die eine signifikant stärker ausgeprägte Entzündungsreaktion bei A_{2A} -Rezeptor-knock out-Mäusen als beim Wildtyp nach Infektion mit Hepatitis zeigte (Ohta & Sitkovsky 2001). Odashima et al. zeigten sowohl bei Mäusen mit spontaner Ileitis als auch bei Kaninchen mit Colitis einen Rückgang der Entzündungsreaktion durch Behandlung mit A_{2A} -Rezeptor-Agonisten (Odashima et al. 2005).

Der A_{2A} -Rezeptor ist auf dendritischen Zellen, Makrophagen, Neutrophilen, Mastzellen, T-Zellen und NK-Zellen exprimiert (Ohta & Sitkovsky 2014). Damit ist er der einzige auf T-Zellen exprimierte Adenosin-Rezeptor und der am meisten exprimierte Rezeptor auf Immunzellen mit sehr hoher Affinität zu Adenosin (Eltzschig et al. 2012; Kobie et al. 2006).

Bei Aktivierung des A_{2A} -Rezeptors findet über ein G_s -Protein eine Stimulation der Adenylatzyklase statt (Wen et al. 2010). Es kommt zur erhöhten cAMP-Konzentration wodurch die Proteinkinase A

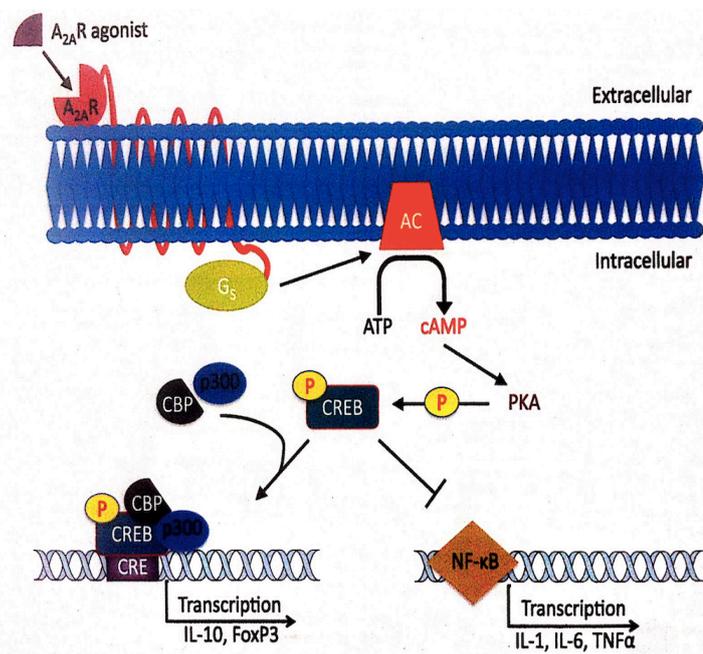


Abbildung 6: Signalweg des A_{2A} -Rezeptors (Quelle: Jones & Kang 2015)

aktiviert wird und den Transkriptionsfaktor CREB phosphoryliert. Abhängig von der Zelle induziert der phosphorylierte Transkriptionsfaktor CREB die Transkription verschiedener Zytokine. Eine Hemmung findet über den NF- κ B-Komplex statt.

- Die Transkription proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-6, IL-12 sowie TNF- α bei Makrophagen wird herunterreguliert. Es findet dagegen eine Hochregulation der IL-10 Produktion statt (Belikoff et al. 2010).
- Auch bei Monozyten wird die IL-12-Produktion gehemmt, die IL-10-Produktion gesteigert (Kobie et al. 2006).
- Bei den T_{reg} s wird die IL-10-, genauso wie die TGF- β - Produktion induziert. Weiterhin konnte eine steigende T_{reg} -Population durch A_{2A} -Aktivierung beobachtet werden. Bei aktivierten T-Effektor-Zellen findet nach A_{2A} -Rezeptor-Aktivierung eine verringerte

TNF- α , IFN- γ und IL-2-Produktion statt (Belikoff et al. 2010; Jones & Kang 2015; Kobie et al. 2006; Ohta et al. 2012).

- Die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten wird gehemmt (Belikoff et al. 2010).

1.3.4 Adenosin als Mechanismus der Immunregulation von T_{regs}

Studien haben gezeigt, dass die T_{regs} in der Leber eine besonders große Rolle spielen und deren Aktivierung unter Kontrolle von extrazellulärem Adenosin fällt. Bei A_{2A}-Rezeptor-Fehlfunktion oder unter Anwesenheit von A_{2A}-Rezeptor-Antagonisten ist der immunmodulatorische Effekt der T_{regs} weniger effizient (Deaglio et al. 2007; Mandapathil et al. 2010). Hinzu kommt außerdem eine steigende Anzahl von T_{regs} unter Einfluss von Adenosin und A_{2A}-Rezeptor Stimulation (Ohta et al. 2012).

T_{regs} werden als Modulatoren der immunologischen Toleranz bezeichnet. Eine wichtige Aufgabe der T_{regs} besteht darin, in Entzündungsregionen zu gelangen und dort die Funktion verschiedener Lymphozyten, vor allem T_H-Zellen, zu modulieren, um Gewebeschaden zu vermeiden (Chaudhry et al. 2009; Ohkura et al. 2013).

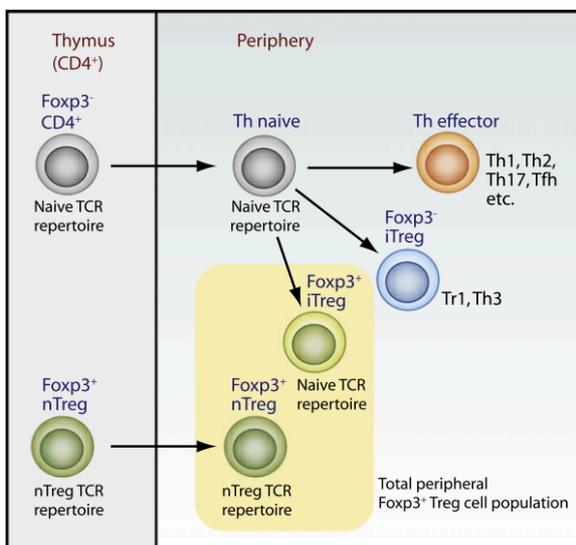


Abbildung 7: Population regulatorischer T-Zellen (Quelle: Curotto de Lafaille & Lafaille 2009)

Bei den T_{regs} unterscheidet man natural T_{regs} (nT_{regs}) und inducible/adaptive T_{regs} (iT_{regs}/aT_{regs}). Die nT_{reg} sind definiert als CD4⁺ FoxP3⁺ CD25⁺ Zellen, die im Thymus heranreifen und dort selektiert werden. FoxP3 ist ein für die regulatorische Funktion essentieller Transkriptionsfaktor (Curotto de Lafaille & Lafaille 2009). Er reguliert die Expression von CD25 hoch, der α -Kette des IL-2-Rezeptors (Camperio et al. 2012).

iT_{regs} können nach Antigenkontakt während der Immunantwort aus peripheren $CD4^+$ und $CD25^-$ T-Zellen in den sekundär lymphatischen Organen entstehen (Bluestone & Tang 2005; Mandapathil et al. 2010). Dabei entstehen iT_{regs} , die den Transkriptionsfaktor FoxP3 exprimieren und solche, die FoxP3 negativ bleiben. Es ist bekannt, dass mindestens eine TCR-Stimulation und die Anwesenheit der Zytokine TGF- β und IL-2 für die Differenzierung einer $CD4^+$ $CD25^-$ zu einer $CD4^+$ $CD25^+$ - iT_{reg} -Zelle vorhanden sein müssen (Curotto de Lafaille & Lafaille 2009; Fantini et al. 2004). Interessanterweise induziert TGF- β auch eine erhöhte Expression von CD73 auf iT_{regs} (Ohta & Sitkovsky 2014). Alle FoxP3 $^+$ T_{regs} exprimieren hohe Raten an CD39 und CD73. Die Adenosin-Desaminase hingegen, die Adenosin abbauen kann, ist auf FoxP3 $^+$ T_{regs} nur mit sehr niedrigen Levels vorhanden (Mandapathil et al. 2010).

Bei Gabe von Inhibitoren von CD39 und CD73 ist die immunmodulatorische Fähigkeit der FoxP3 $^+$ T_{regs} vermindert. Das von CD73 auf den FoxP3 $^+$ T_{regs} produzierte Adenosin muss also eine Rolle im immunmodulatorischen Mechanismus spielen, der, wie oben genannt, mit der Wirkung über den A_{2A} -Rezeptor zusammenhängt (Ohta & Sitkovsky 2014; Deaglio et al. 2007).

Somit dient der CD39-/CD73-Pathway nicht nur dazu, das proinflammatorische ATP abzubauen und damit eine Aktivierung weiterer Immunzellen zu verhindern. Das Enzym CD73 produziert ebenfalls Adenosin, welches zum Einen direkt über den A_{2A} -Rezeptor Immunzellen in ihrer Aktivität herunterreguliert. Zum Anderen führt Adenosin zur Aktivierung von T_{regs} , die aktiv das Immunsystem herunterregeln können. CD73 kann somit eine zentrale Rolle in der Regulation einer Entzündungsreaktion im Zuge der akuten zellulären Abstoßung nach Lebertransplantation spielen.

1.4 Ischämie und Reperfusion als Schädigungsmechanismen

Es ist bekannt, dass die Phase direkt nach der Transplantation mitentscheidend für die Immunisierung gegen Alloantigene ist (Kruse et al. 2015, p.179). In der Zeit zwischen Entnahme beim Spender und Reperfusion beim Empfänger ist das Organ von der Blutversorgung abgeschnitten. Diese Zeit wird als Ischämiezeit bezeichnet. Sowohl durch die Ischämie und den dadurch bedingten Sauerstoffmangel als auch durch die darauf folgende Reperfusion kommt es zu Mechanismen, die die Leber schädigen können. Beispielsweise kommt es zur Freisetzung von Molekülen wie z.B. dem Hitzeschockprotein 70, welches den Toll-like-Rezeptor aktiviert. Zusammen mit dem chirurgischen Trauma werden Entzündungsmediatoren ausgeschüttet und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies gefördert

(Kruse et al. 2015, p.179 ff.). Durch den Zellzerfall wird auch ATP frei, welches wie bereits erwähnt proinflammatorisch wirkt. Das Immunsystem wird aktiviert. Es kann zur Reifung von dendritischen Zellen kommen, welche durch Zytokine ein kostimulatorisches Signal bei der Erkennung von Alloantigenen liefern (Zhai & Busuttill 2011). Es ist bekannt, dass eine starke Schädigung der Leber in Folge von Ischämie und Reperfusion ein wichtiger Risikofaktor für das Vorkommen akuter Abstoßungen nach Lebertransplantation darstellt (Kupiec-Weglinski & Busuttill 2005).

Darüber hinaus spielt der Faktor der Ischämie und Reperfusion in Zusammenhang mit dem Enzym CD73 eine besondere Rolle. Bei Freiwerden von ATP durch Zellzerfall wird CD73 aktiviert und produziert Adenosin. Dieses wirkt wie, oben beschrieben, über den A_{2A} -Rezeptor antiinflammatorisch und die durch Ischämie und Reperfusion induzierte Reaktion wird gehemmt (Volmer et al. 2006). Dies konnte durch den Einsatz von A_{2A} -Rezeptor Agonisten während der Reperfusion nach längerer Ischämiezeit bestätigt werden. Der Leberschaden unter Einsatz der Agonisten zeigte sich deutlich geringer (Day et al. 2004).

1.5 Biomarker

In der Transplantationsmedizin wird versucht von Standardprotokollen zu einer individualisierten Immunsuppression überzugehen. Um dafür das individuelle Abstoßungsrisiko einschätzen zu können, wird die Suche nach Biomarkern mit dem Ziel einer personalisierten Medizin stark vorangetrieben (Strecker 2011).

Biomarker sind definiert als charakteristische biologische Merkmale, die objektiv messbar sind. Sie können auf einen normalen oder krankhaften Prozess im Körper hinweisen und einen Ausgangspunkt für die Entwicklung einer neuen Therapieform darstellen. Bei Biomarkern kann es sich um Zellen, Gene, Genpolymorphismen, Enzyme oder Hormone handeln (Schlitt et al. 2011; Gudenus & Granzer 2010).

Bekannte gängige Biomarker sind Rheumafaktoren, Kreatinkinase- und Troponinfaktoren in der Herzinfarkt Diagnostik oder Tumormarker wie CA 15-3 beim Mamma-Karzinom oder CA 19-9 bei Pankreas- und Gallengangskarzinom (GfBK 2015).

Man unterscheidet zwischen krankheitsbezogenen und arzneimittelbezogenen Biomarkern.

- Krankheitsbezogene Biomarker fungieren als diagnostische oder prognostische Biomarker, indem sie Informationen darüber geben, ob eine Krankheit bereits besteht, droht oder wie wahrscheinlich sich eine Erkrankung entwickeln wird.
- Arzneimittelbezogene Biomarker geben einen Hinweis darauf wie ein Medikament im Organismus eines bestimmten Menschen wirken wird (Siegmond-Schultze 2012).

Unter den krankheitsbezogenen Biomarkern kann man zwischen Trait- und Statemarkern unterscheiden (Strecker 2011). Statemarken dienen zur Verlaufskontrolle einer Erkrankung und können in Form von Enzym- oder Ionenkonzentrationen gemessen werden. Traitmarker können die Wahrscheinlichkeit oder das Risiko einer zukünftigen Erkrankung anzeigen und werden meist in Form von Mutationen im Genom genutzt. Da Gene stabil und unveränderlich sind, eignen sich Genpolymorphismen als Biomarker sehr gut. In den meisten Fällen führen Polymorphismen zu Fehlfunktionen von Proteinen, sie können aber auch zu gesteigerter Aktivität führen. Zu den Genpolymorphismen zählen unter anderem SNPs (Efferth 2006, p.262).

1.6 Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs)

SNPs bezeichnen den Austausch einer einzelnen Base in der DNA (Efferth 2006, p.262).

Beide Ausprägungen des SNP kommen in der Bevölkerung mit >1% vor, was sie von der einfachen Punktmutation unterscheidet (Thomas et al. 2011). SNPs stellen etwa 90% der genetischen Variation im menschlichen Genom dar. Die meisten SNPs haben keinen Einfluss auf die Genfunktion (Collins et al. 1998). Es wurden dennoch schon viele SNPs gefunden, die mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert sind (Dullin et al. 2015; Hill et al. 2010; Ichikawa et al. 2015; Maestrini et al. 2010; Vazgiourakis et al. 2011)

Da SNPs im Gen stabil und daher gut zu bestimmen sind, eignen sie sich besonders gut als prognostische Biomarker in der Medizin.

1.6.1 SNPs des Enzyms CD73

In Studien zu Arteriosklerose und dem Stoffwechsel von 6-Mercaptopurin wurden SNPs im Gen für das Enzym CD73 untersucht (Yoshino et al. 2014; Li et al. 2010). Unter den dort untersuchten SNPs wurden für diese Arbeit solche ausgewählt, die in der kaukasischen Bevölkerung Häufigkeiten von >10% aufweisen und nachweislich die Expressionsrate beeinflussen (NCBI-Datenbank 2017c; NCBI-Datenbank 2017a; NCBI-Datenbank 2017b).

1.6.1.1 SNP rs9450279

Bei dem SNP rs9450279 handelt es sich um eine C/T Transition. Sie liegt in der Promotorregion des Gens und beeinflusst die Expression von CD73. Li et al. zeigte, dass der

SNP rs9450279 die Expression von CD73 im Bezug auf den „Thiopurin pathway“ (Li et al. 2010) modifiziert.

Nach Berechnungen der NCBI-Datenbank liegt die Häufigkeit des Allels mit T in der kaukasischen Bevölkerung bei 14%, die des Allels mit C bei 86% (NCBI-Datenbank 2017c).

1.6.1.2 SNP rs4458647

Der SNP rs4458647 repräsentiert ebenfalls eine C/T Transition. Der SNP liegt in der Promotorregion des Gens und modifiziert die Expression von CD73 (Li et al. 2010). Nach Angaben der NCBI-Datenbank liegt die Häufigkeit des SNP mit dem Allel C in der kaukasischen Bevölkerung bei 14%, die des Allels T bei 86% (NCBI-Datenbank 2017a).

1.6.1.3 SNP rs6922

Der SNP rs6922 beschreibt eine G/T Transversion. Der SNP liegt in der 3`untranslatierten Region des Gens und kann somit die mRNA-Stabilität beeinflussen. In einer Studie in der die koronare Mikrozirkulation untersucht wurde, zeigte der SNP rs6922 bei Männern ein signifikant erhöhtes Risiko für eine Kalzifizierung, was mit einer geringeren Expression von CD73 einhergeht (Yoshino et al. 2014).

Nach Angaben der NCBI-Datenbank liegt die Häufigkeit des Allels T in der kaukasischen Bevölkerung bei 33%, die des Allels G bei 67% (NCBI-Datenbank 2017b).

2 Fragestellung

Wie oben beschrieben werden bei der akuten zellulären Abstoßungsreaktion über den direkten Erkennungsweg CD8⁺-T-Zellen über APC aktiviert und durch das IL-2 der aktivierten CD4⁺-T-Zellen verstärkt. Es kommt zur Zerstörung von Leberzellen über Granzyme und Perforine sowie die FAS/FAS-Ligand-Interaktion mit nachfolgendem Konzentrationsanstieg von extrazellulärem ATP. ATP wirkt als DAMP, lockt weitere Immunzellen an und führt auf diese Weise zur Initiation einer Entzündungsreaktion. Nach dem Abbau von ATP zu AMP stellt die Ektonukleotidase CD73 aus AMP Adenosin her. Adenosin führt zur Hemmung der Entzündungszellen und zusätzlich zur Aktivierung von T_{regs}, die ebenfalls das Immunsystem schwächen können. Der Körper verfügt somit über einen terminierenden Regulationsmechanismus für Abstoßungsreaktionen, in dem das Enzym CD73 und dessen Expressionsausmaß eine zentrale Rolle spielt (Abbildung 8).

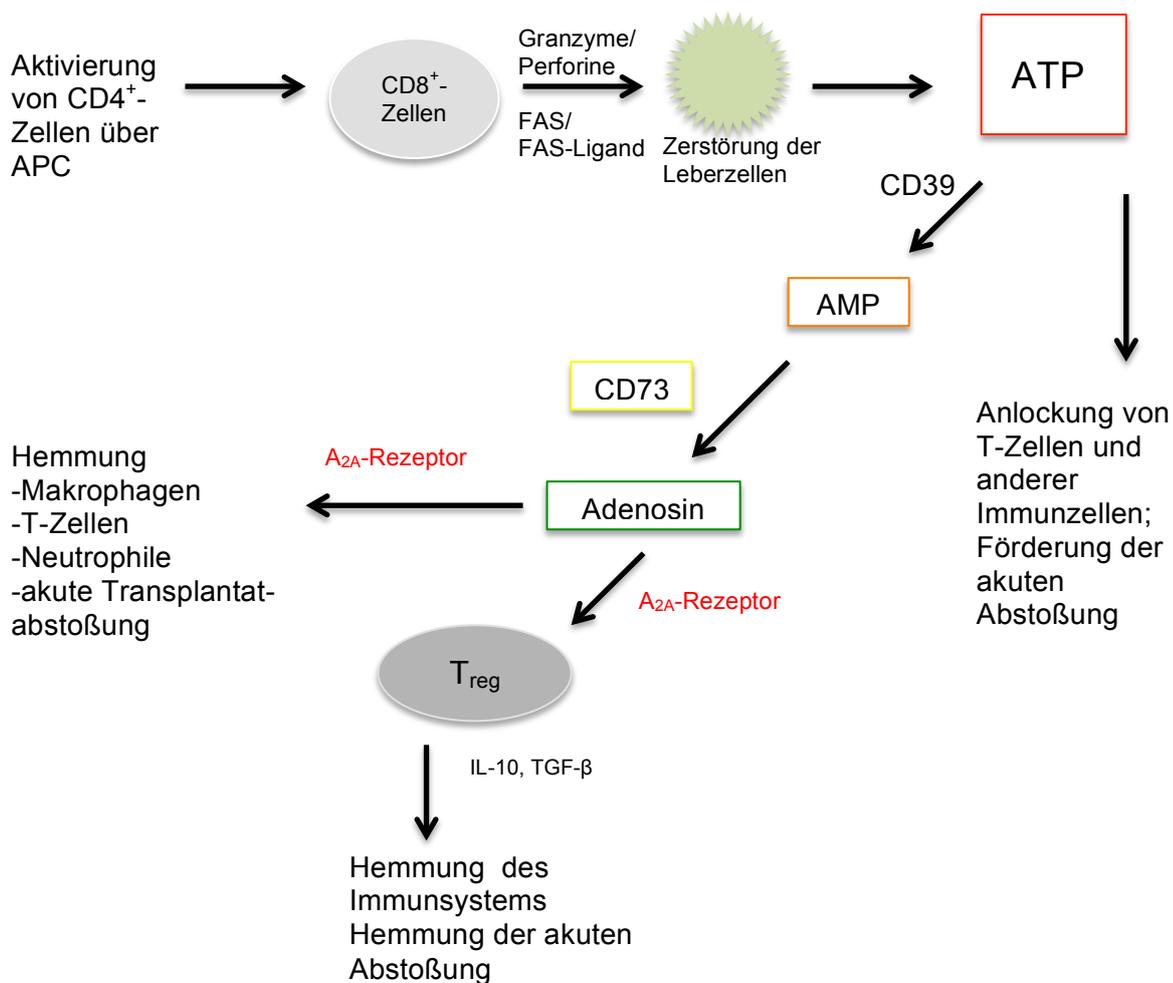


Abbildung 8: Übersicht

Da die SNPs rs9450279 und rs4458647 im CD73-Gen die Expression von CD73 modifizieren und es Hinweise gibt, dass dies auch für den rs6922 im CD73-Gen gilt, wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese SNPs mit der akuten zellulären Abstoßung nach Lebertransplantation assoziiert sind. In dieser Arbeit soll deshalb geprüft werden, ob zwischen den ausgewählten SNPs und der akuten zellulären Abstoßung nach Lebertransplantation eine Assoziation besteht. Bei der Überprüfung wurde für die SNPs ein dominanter, ein rezessiver oder aber ein kodominanter Erbgang angenommen.

Eine Assoziation könnte einen Hinweis geben, dass diese SNPs prädisponierend für die akute zelluläre Abstoßungsreaktion nach Lebertransplantation sind und als genetische Biomarker für dieses Ereignis gewertet werden können. Solche Biomarker wären eine Basis um individualisierte immunsuppressive Therapieprotokolle zu etablieren, wodurch für manche Patienten die zum Teil schweren Nebenwirkungen reduziert werden können.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Crusheisbereiter FM-120DE-50	Hoshizaki Europa B.V. Amsterdam, Niederlande
Kühlschrank Siemens	Siemens-Elektrogeräte Gmbh München, Deutschland
Gefrierschrank Liebherr	Liebherr-International Deutschland GmbH Biberbach an der Riß, Deutschland
MS2 Minishaker	IKA® Staufen, Deutschland
Centrifuge 5810	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5424 R	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Lightcycler® 480 II Serien-Nr. 26927	Roche Diagnostics Gmbh Rotkreuz, Schweiz
Pipette Research Plus 100-1000µl 10-100µl 1-10µl 0,1-2,5µl	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Safe Lock Tubes 0,5µl 1,5µl 2,0µl	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Pipettenspitze Biosphere [®] farblos Filter Tip 2,5 Filter Tip 10 Filter Tip 100 Filter Tip 200	Sarstedt AG & Co Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitze Filter Tip 1000	nerbe plus GmbH Winsen (Luhe), Deutschland
LightCycler [®] 480 Multiwell Platte 96 white	Roche Diagnostics GmbH Rotkreuz, Schweiz

3.1.3 Reagenzien

Tabelle 3: Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
DNA-Isolation Kit innuPrep Blood DNA Mini Kit	Analytic Jena Jena, Deutschland
TaqMan [®] -Assays 1.rs9459279 2.rs4458647 3.rs6922	Thermo Fisher Scientific GmbH Waltham, Massachusetts, USA
TaqMan [®] Genotyping Master-Mix Part. No. 43713555	Applied Biosystems GmbH Foster City, Californien, USA
Tris-EDTA buffer solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Hamburg, Deutschland
Water, nuclease-free Lot 00306750	Thermo Fisher Scientific GmbH Waltham, Massachusetts, USA
RNase AWAY	Molecular Bio Products Inc San Diego, Californien, USA

3.1.4 Programme

Tabelle 4: Programme

Bezeichnung	Hersteller
LightCycler® 480 Software Release 1.5.0 SP3	Roche Diagnostics GmbH Rotkreuz, Schweiz
Microsoft Office Excel 14.6.1.	Microsoft Redmond, Washington, USA
IBM SPSS Statistics 23	IBM Deutschland GmbH Hamburg, Germany
Microsoft Office Word 14.6.1.	Microsoft Redmond, Washington, USA
Mendeley Reference Manager 1.15.2 Literaturverwaltungsprogramm	©Mendeley Ltd. Amsterdam, Niederlande
Hardy-Weinberg calculator	©Tufts University 2016 Medford, Massachusetts, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um ein retrospektives Studiendesign.

3.2.2 Einschlusskriterien

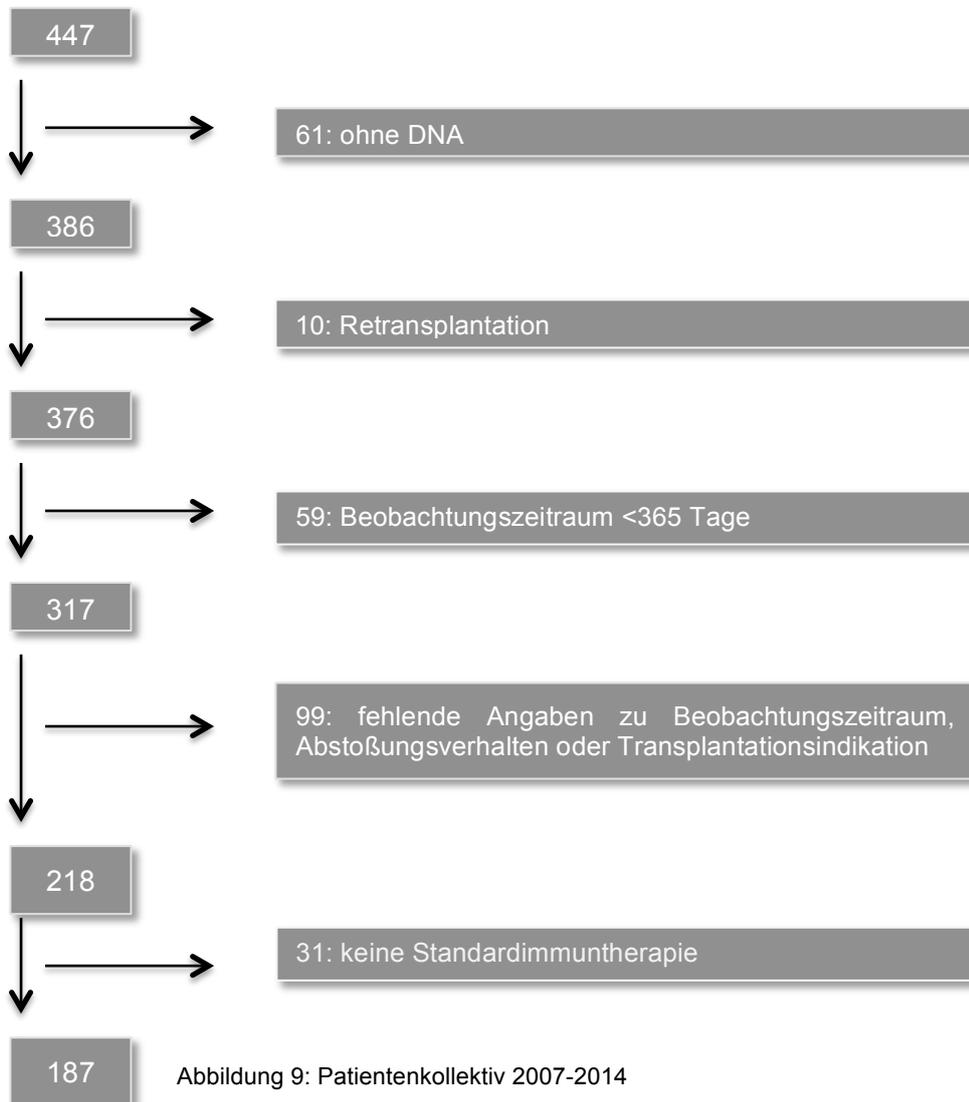
In die Studie wurden Patienten aufgenommen, die an der Klinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf lebertransplantiert wurden.

Die Patienten waren mindestens 18 Jahre alt und es handelte sich um die erste Lebertransplantation. Einschlusskriterium war der Erhalt einer Standardtherapie bei Entlassung. Unter Standardtherapie wird eine duale Therapie mit einem CNI (Tacrolimus oder Cyclosporin A) + Kortison sowie eine Tripeltherapie mit einem CNI + Kortison + eine antiproliferative Therapie gefasst. Eine antiproliferative Therapie kann aus Everolimus, Mycophenolat oder Azathioprin bestehen.

Die Patienten ohne Abstoßung waren mindestens 1 Jahr nach der Transplantation ohne Abstoßungszeichen.

Akute zelluläre Abstoßungen sind in dieser Arbeit definiert durch eine Erhöhung der Leberenzyme, einem histologischen Nachweis mit Berücksichtigung der Banff-Kriterien und einem Ansprechen auf Kortisontherapie. Es müssen alle drei Kriterien erfüllt sein.

Der Rekrutierungszeitraum lag zwischen dem 01.01.1995 und dem 31.12.2014. Vor dem 01.01.2007 wurden zusätzlich 27 Patienten mit erfüllten Einschlusskriterien ausgewählt. Ab 01.01.2007 bis 31.12.2014 wurden alle Patienten in die Studie aufgenommen, die die Einschlusskriterien erfüllten (Abbildung 9).



447 Patienten wurden zwischen dem 01.01.2007 und dem 31.12.2014 transplantiert. Bei 386 Patienten lag die DNA vor. Zehn Patienten wurden aus der Studie ausgeschlossen, da es sich nicht um eine Ersttransplantation im angegebenen Zeitraum handelte. Bei weiteren 59 Patienten war der Beobachtungszeitraum von 365 Tagen nicht gegeben. So wurden 28 dieser 59 Patienten innerhalb des ersten Jahres retransplantiert. Von den restlichen 317

Patienten fehlten bei 99 Patienten Angaben zum Beobachtungszeitraum, das Abstoßungsverhalten war nicht eindeutig dokumentiert oder die Indikation zur Transplantation war laut Aktenlage unklar. 31 Patienten mussten ausgeschlossen werden, da sie keine Standardtherapie erhielten. Letztendlich konnten zwischen 2007 und 2014 somit 187 Patienten in die Studie eingeschlossen werden. Mit den 27 Patienten, die vor 2007 in die Studie eingeschlossen wurden, ergab sich ein Patientenkollektiv von 214 Patienten. Bei 73 dieser Patienten fand eine akute Abstoßung statt, 141 Patienten verblieben ohne Abstoßung.

3.3 Ethikvotum

Das Ethikvotum hat die Nummer PV3248 der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg und trägt den Titel „Bedeutung von Genpolymorphismen und non HLA-Antikörpern für Abstoßungsreaktionen bei Nieren- Lebertransplantation.“

3.3.1.1 DNA-Proben

Die DNA wurde aus einer Vollblutprobe der Patienten gewonnen. Hierzu wurde der DNA-Isolations Kit immu-Prep Blood DNA verwendet. Die DNA-Isolierung wurde nach Herstellerangaben des Test-Kits durchgeführt. Diese Arbeiten sind bereits im Vorfeld durchgeführt worden, sodass für die Arbeit bereits fertig isolierte DNA vorlag. Sie war als Stammlösung bei -18°C tiefgefroren. Zur Nutzung wurden die gefrorenen DNA-Stammlösungen aufgetaut und Aliquots von $20\mu\text{l}$ in $50\mu\text{l}$ Eppendorf-Gefäße gefüllt. Die aliquotierten Proben werden im Kühlschrank bei ca. 6°C gelagert, die Stammlösungen wieder eingefroren.

3.3.2 Endpunktgenotypisierung

Aus der isolierten DNA der Patienten wurde eine Genotypisierungsanalyse durchgeführt. Sie besteht aus der Polymerasekettenreaktion (PCR)-Amplifikation und einer Endpunktanalyse der bestehenden Fluoreszenzen (Biosystems 2010a, chap.4). Dies ermöglicht die Analyse der SNPs. Durch fluorogene Sonden kann bestimmt werden, ob ein SNP homozygot für Allel 1, homozygot für Allel 2 oder heterozygot vorliegt. Jede Sonde ist dabei spezifisch für einen bestimmten SNP.

Für die Endpunktgenotypisierung aus der isolierten DNA werden folgende Komponenten benötigt

- TaqMan®-MasterMix
- SNP Genotyping Assay
- DNase und RNase freies Wasser

3.3.2.1 TaqMan®-Master Mix

Der TaqMan® Master Mix wird bei circa 6°C im Kühlschrank gelagert. Er enthält eine AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, Desoxyribonukleotid Triphosphate (dNTPs), eine ROX™ Referenz und Puffer Komponenten (Biosystems 2010b, p.2). Bei Raumtemperatur ist die Polymerase inaktiv (ThermoFisher 2015d). Sie wird erst während des Thermocyclingprozesses durch Hitze aktiv und arbeitet in 5' → 3'-Richtung. Die Taq-Polymerase besitzt eine 5`Nukleaseaktivität (Biosystems 2010a, p.Kap. 2 p.2). Die ROX™ Referenz ist ein firmeneigener Farbstoff, durch den die Genauigkeit der Fluoreszenzmessung erhöht wird (LifeTechnologies 2012).

3.3.2.2 SNP Genotyping Assay Mix

Es wurden die Genotyping Assay Mix für folgende SNPs im Gen für das Enzym CD73 angewendet (siehe Tabelle 5):

- rs9450279
- rs4458647
- rs6922

Tabelle 5: Sondensequenzen (Quelle: (ThermoFisher 2015c; ThermoFisher 2015a; ThermoFisher 2015b))

Sondensequenz rs9450279

5' TAGACTTCGTGCGTTCTCAACCCAA[C/T]AGGAAGCGTCACATCTCAGTGAGCT 3'

Sondensequenz rs4458647

5' GTGATGGGTATGTGGGAACCTCCCTT[C/T]ATTACCTTTGCAACTTTTCTGTAAG 3'

Sondensequenz rs6922

5' ATTGTACAAGGAAAATTAGAGAAAG[G/T]CACATTTAGGGTTTATTTTTTACAC 3'

188 µl des 40x SNP Genotyping Assay Mix wurden gefroren und lichtgeschützt geliefert. Durch Verdünnung mit der gleichen Menge EDTA-Puffer wird ein 20x Assay Mix hergestellt

und auf mehrere Eppendorf-Gefäße verteilt. Die aliquotierte Lösung wird wieder bei -18°C gelagert. Vor jeder Nutzung taut sie lichtgeschützt auf Eis auf. Der SNP Genotyping Assay Mix enthält Primer und fluorogene Minor-Groove-Binder (MGB)-Sonden (Biosystems 2010a). Die Sonde ist ein Oligonukleotid (Tabelle 5). Sie trägt am 5`-Ende einen fluoreszierenden Reporter-Farbstoff, am 3`-Ende einen nicht-fluoreszierenden Quencher, sowie einen Minor-Groove-Binder (MGB) (Biosystems 2010b, p.5). Durch den MGB wird die Schmelztemperatur der Sonde erhöht, ohne die Sonde dabei zu verlängern. Ein Design kürzerer Sonden wird dadurch ermöglicht (Afonina et al. 1997; Konrad & Busch 1991).

Es ist für jedes Allel eine spezifische Sonde enthalten. Die beiden Sonden enthalten verschiedene fluoreszierende Farbstoffe, damit die Allele unterschieden werden können.

- VIC[®]-Farbstoff an der Sonde für Allel 1.
- FAM[®]-Farbstoff an der Sonde für Allel 2.

Die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs wird durch die Nähe zum Quencher bei intakter Sonde unterdrückt. Dies beruht auf dem Fluoreszenzenergieübertragungs-Mechanismus (FRET) (Konrad & Busch 1991, p.37). Dabei handelt es sich um einen Prozess, bei dem ein durch Strahlung angeregtes Donor-Molekül strahlungslos Energie auf ein Akzeptor-Molekül überträgt, welches diese Energie durch strahlungslose Übergänge abgeben kann. Der FRET-Mechanismus ist abhängig vom Abstand der beiden Moleküle (Sapsford et al., 2006).

Während der Primerhybridisierung der PCR-Reaktion binden die Sonden an ihre komplementäre Zielsequenz (Biosystems, 2010a, Chapter 2 p.3). Trifft die Taq-Polymerase bei der Elongation auf die Sonde wird der fluoreszierende Reporter-Farbstoff durch die 5`-Nukleaseaktivität der Taq-Polymerase abgespalten. Dadurch wird der Abstand zwischen Reporter-Farbstoff und Quencher größer, sodass das Fluoreszenzsignal des Reporters steigt. Da die Sonde von der Zielsequenz getrennt wird, kann der DNA-Strang komplett vervollständigt werden.

Mit jedem PCR-Zyklus werden mehr Reportermoleküle von der Sonde getrennt, die Fluoreszenz verstärkt sich und wird nach Ablauf der PCR gemessen (Abbildung 10).

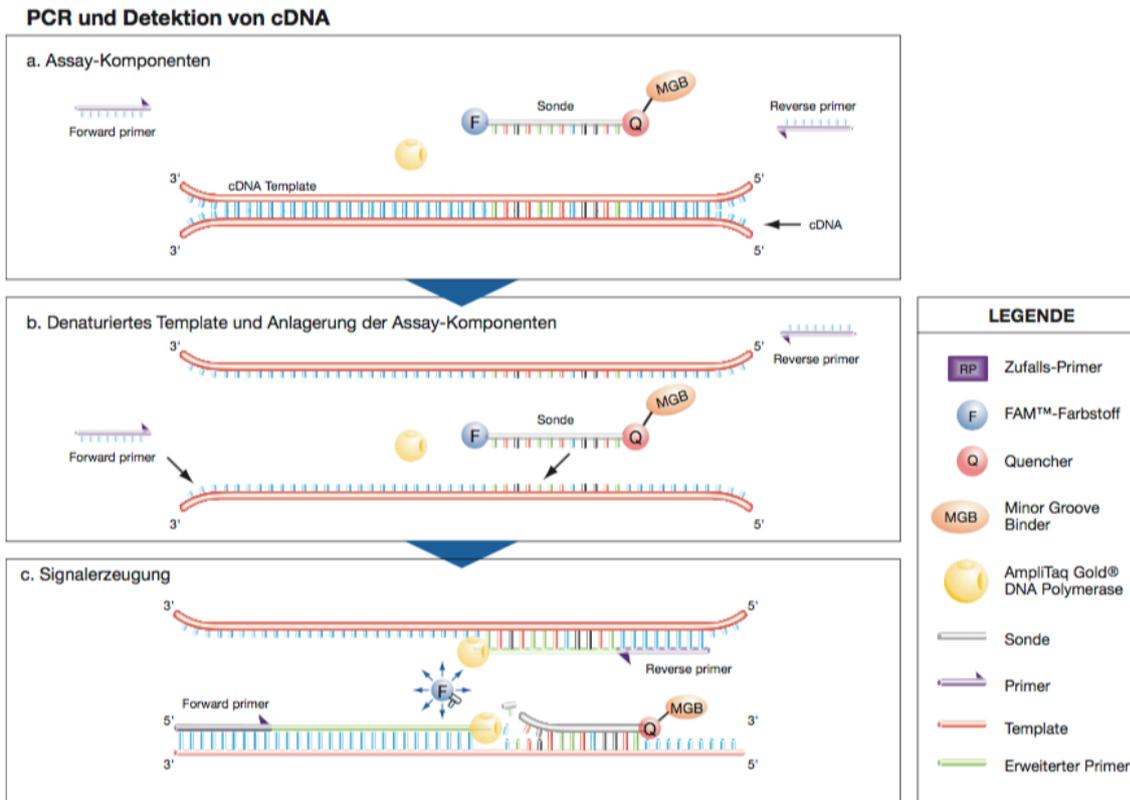


Abbildung 10: PCR und Detektion der Zielsequenz durch die Sonde (Quelle: Biosystems, 2010a, Chapter 2 p.6)

Lagert sich die Sonde an eine nicht vollständig komplementäre Sequenz des Allels, ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie von der Polymerase verdrängt wird größer als dass die Reportersequenz gespalten wird (Abbildung 11) (Biosystems, 2010a, Chapter 4 p.5).

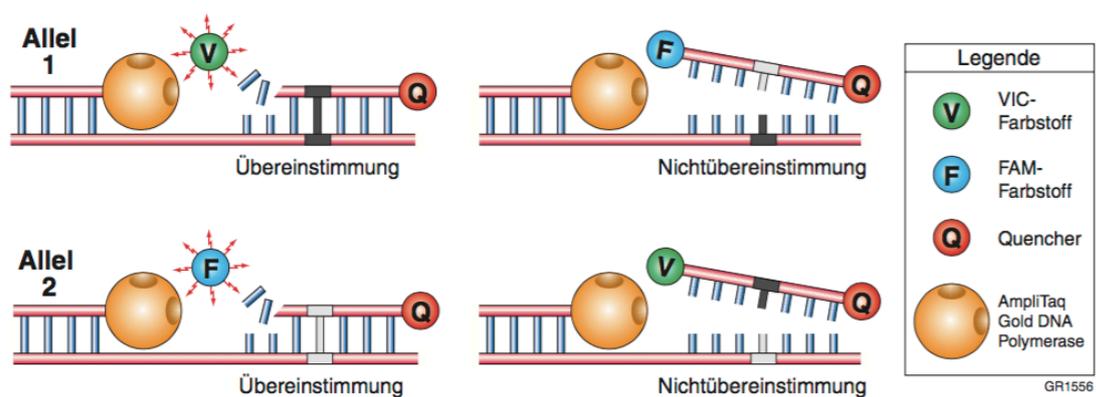


Abbildung 11: Perfekte Übereinstimmung und fehlerhafte Übereinstimmung von Sonde und Allel (Quelle: Biosystems, 2010a, Chapter 4 p.5)

3.3.2.3 Durchführung

Vor Versuchsbeginn wird ein Pipettierschema der 96-Well-Platte erstellt. Im Versuchsaufbau ist am Anfang und am Ende jeweils eine Negativkontrolle enthalten. Die Reaktionen erfolgen in einem 25µl Ansatz. Diese setzen sich aus 24µl Reaktionslösung und 1µl DNA (mit circa 10ng DNA pro Well) bzw. als Negativkontrolle DNase- und RNase- freiem Wasser zusammen.

Aus dem Pipettierschema ergibt sich die Menge der benötigten Reaktionslösung. Diese besteht aus 12,5µl des TaqMan MasterMix, 1,25 µl des TaqMan Assay und 10,25 µl DNase und RNase freiem Wasser pro DNA-Probe (Biosystems 2010b, p.23).

Zur Sicherheit wird bei der Menge der benötigten Reagenzien in jedem Ansatz zusätzlich zur Anzahl der DNA-Proben und Negativkontrollen mit zwei belegten Wells mehr gerechnet.

Tabelle 6: Zusammensetzung der Reaktionslösung

<p>1. 12.5µl TaqMan MasterMix x</p>	$\left. \begin{array}{l} \text{Anzahl DNA-Proben} \\ + \text{Anzahl Standards} \\ + \text{Anzahl Negativkontrollen} \\ + 2 \end{array} \right\} = \text{Gesamtsumme}$	
<p>2. 1.25µl TagMan MGB-Sonde x</p>		
<p>3. 10.25µl DNase- und RNase-freies Wasser x</p>		

In jedes zu belegende Well der 96-Well-Platte werden nun 24µl der Reaktionslösung pipettiert. Sind alle Wells belegt, wird die Platte mit einer Folie verschlossen und zwei Minuten bei 1500rpm zentrifugiert. Die DNA wird vor Gebrauch mit dem Vortexer gemischt und nach Pipettierschema jeweils 1µl in das jeweilige Well hinzugegeben. Dabei ist zu beachten, dass bei jeder DNA eine neue Pipettenspitze genutzt wird. Bei den Negativkontrollen wird entsprechend 1µl Wasser verwendet.

Im Lightcycler wird sowohl die PCR-Amplifikation als auch die Endpunktanalyse der Fluoreszenz durchgeführt. Für die Reaktionszyklen der PCR kann Temperatur und Dauer eingestellt werden. Bei den am Lightcycler eingestellten Versuchsbedingungen wird die Denaturierung 10 sec bei 95°C, die Hybridisierung 1 min bei 60°C und die Polymerisation 10

sec bei 72°C durchgeführt. Zuvor findet eine 10-minütige Aktivierung der Polymerase bei 95°C statt (Biosystems 2010b).

Tabelle 7: PCR-Standardprotokoll

	Temperatur (°C)	Dauer (hh:mm:ss)
Denaturierung	95	00:00:10
Hybridisierung	60	00:01:00
Polymerisation	72	00:00:10

Bei Verwendung des TaqMan[®] Assays mit der Nummer rs9450279 konnten mit den Standardversuchsbedingungen keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden.

Nach Umstellen der Hybridisierungstemperatur von 60°C auf 62°C ergab sich eine bessere Auftrennung der Fluoreszenzen, sodass der Versuch bei dieser Sonde mit einer Hybridisierungstemperatur von 62°C durchgeführt wird.

Tabelle 8: PCR-Protokoll der Sonde rs9450279

	Temperatur (°C)	Dauer (hh:mm:ss)
Denaturierung	95	00:00:10
Hybridisierung	62	00:01:00
Polymerisation	72	00:00:10

3.3.2.4 Festlegung von Versuchsbedingungen und Auswählen von Standards

Für jede Sonde wird der Versuch zunächst mit einer DNA-Kontrollgruppe gesunder Personen aus der laboreigenen Datenbank durchgeführt. Ist der Versuch unter diesen Versuchsbedingungen gut auswertbar, werden aus der Kontrollgruppe für folgende Versuche mit der zu testenden DNA drei Standards ausgewählt:

- Standard 1: Homozygotie für Allel 1
- Standard 2: Homozygotie für Allel 2
- Standard 3: Heterozygotie

Mithilfe dieser Standards ist der Genotyp automatisch zuzuordnen. Es findet immer eine persönliche Kontrolle der automatischen Ergebnisse statt.

3.3.2.5 Auswertung

Der Thermocycler erstellt nach jeder Endpunktgenotypisierung eine Tabelle sowie eine Grafik der Ergebnisse.

In der Tabelle erscheinen die Positionen auf der 96-Well-Platte, die zugeordnete Bezeichnung und die Endpunktfluoreszenz für beide Farbstoffe. Die anschaulichere Darstellung bietet die Grafik (Abbildung 12). Der Ausschlag der Fluoreszenz für den Farbstoff VIC™ für Allel 1 wird auf der x-Achse, für den Farbstoff FAM™ für Allel 2 auf der y-Achse angezeigt. Ist ein hoher Ausschlag auf der x-Achse, aber nahezu kein Ausschlag auf der y-Achse vorhanden, so liegt eine Homozygotie für das Allel 1 vor. Ist ein hoher Ausschlag auf der y-Achse, aber nahezu kein Ausschlag auf der x-Achse sichtbar, so liegt eine Homozygotie für das Allel 2 vor. Sind Ausschläge auf beiden Achsen sichtbar, so liegt eine Heterozygotie vor.

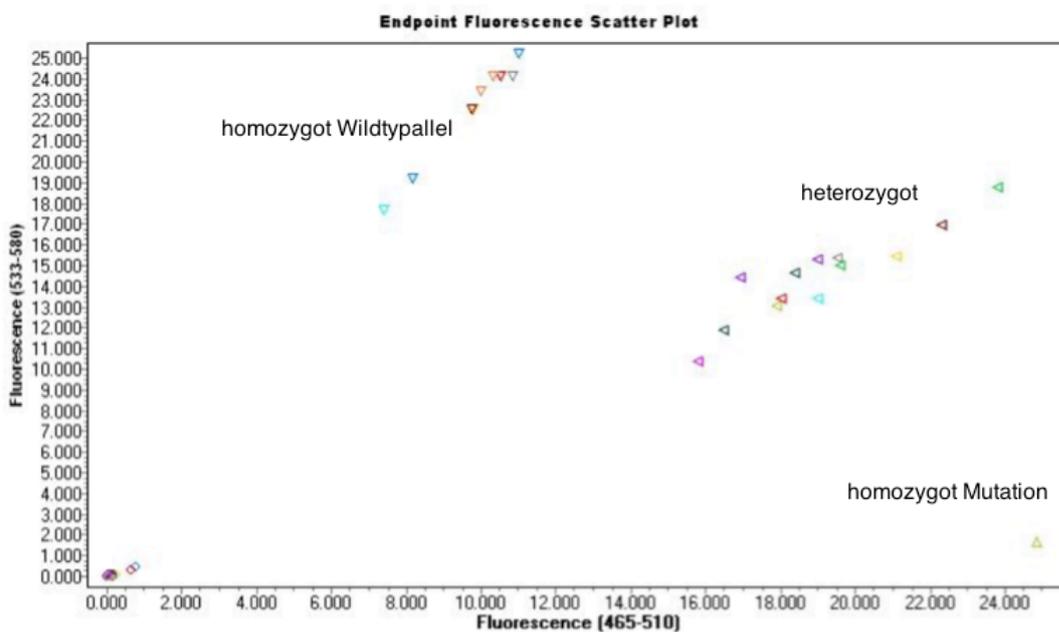


Abbildung 12: Grafische Darstellung der Fluoreszenzen

3.3.3 Statistische Tests

Bei allen statistischen Testverfahren wurde das Signifikanzniveau mit $p < 0,05$ festgelegt.

3.3.3.1 Statistische Methoden für die Gegenüberstellung des Patientenkollektivs

- Chi²-Test

Bei der Gegenüberstellung bezüglich Geschlecht, Grunderkrankungen und Therapie wurde zur Ermittlung des p-Werts der Chi²-Test anhand einer Kreuztabelle mithilfe von SPSS Statistics 23 durchgeführt.

- T-Test

Der T-Test ist ein Hypothesentest der t-Verteilung und vergleicht die Mittelwerte einer Größe mit den zu erwartenden Mittelwerten (McDonald 2009, p.118 ff.). Er kann verwendet werden, wenn eine nominale und eine metrische Variable vorliegt. Dies ist in dieser Arbeit beim Vergleich des Alters der Fall. Die nominale Variable darf zwei Ausprägungen haben, was mit „mit akuter Abstoßung“ und „ohne akute Abstoßung“ gegeben ist. Der T-Test wurde mithilfe von SPSS Statistics 23 durchgeführt.

3.3.3.2 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Weiterhin wurde geprüft, ob eine Vererbung nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht vorliegt. Es wurde der Excel-basierte Hardy-Weinberg-calculator der Tufts University verwendet.

3.3.3.3 Vererbungsmodelle

Für die anschließende statistische Auswertung der SNP Frequenzen wurden drei Vererbungsmodelle angenommen: das kodominante, das dominante und das rezessive Modell. Die Auswertung wurde für alle drei Modelle vorgenommen. Das Allel mit der höheren Frequenz wurde als Wildtypallel bezeichnet. Beim dominanten Erbgang wurde das Wildtypallel als dominant angenommen, beim rezessiven Erbgang wurde das Wildtypallel als rezessiv angenommen.

Am Beispiel des SNP rs9450279 C/T sind die Modelle erklärt (NCBI-Datenbank 2017c):

C-Allel (86%) = Wildtypallel

T-Allel (14%) = mutiertes Allel.

Daraus ergeben sich folgende Erbgänge:

+Dominant: TT vs. CC+CT

+Rezessiv: CC vs. CT+TT

+Der kodominante Erbweg ist ergänzt durch die Kombination:
CT vs. CC+TT.

3.3.3.4 Binär logistische Regression

Bei einem signifikanten Ergebnis für demographische oder klinische Variablen bei dem Patientenkollektiv, muss davon ausgegangen werden, dass auch diese Einfluss auf die Abstoßungswahrscheinlichkeit hat. Eine Korrektur erfolgte mithilfe der logistischen Regression. Für nominale abhängige Variablen mit zwei Ausprägungen kann die binär logistische Regression angewandt werden (Rohrlack 2007). Dies trifft in dieser Arbeit mit der Abstoßung als abhängige Variable zu.

Dabei müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

- keine Multikollinearität zwischen unabhängigen Variablen (Menard 2002, p.75 ff.)
- keine Autokorrelation (Rohrlack 2007, p.199)
- Fallzahl von $n > 100$ (Hosmer et al. 2013, p.339 ff.)
- Anzahl der Beobachtungen einer Kategorie der abhängigen Variable von $n > 25$ (Hosmer et al. 2013, p.339)

Bei der logistischen Regression soll der Parameter β der unabhängigen Variablen bestimmt werden, mit dem die unabhängigen Variablen die Ausprägung der abhängigen Variablen beeinflussen (Rohrlack 2007). Es handelt sich nicht um einen kausalen Zusammenhang.

Die Analyse erfolgt immer unter Berücksichtigung von Alter und Geschlecht (Empfehlung von Herrn Gerhard Schön aus dem Institut für Biometrie und Epidemiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf). Es wird eine Odds-Ratio und ein Konfidenzintervall ermittelt. Die Analysen finden als explorative Analysen mit dem Programm SPSS Statistics 23 statt. Die Berechnung und Auswertung der logistischen Regression erfolgten in Zusammenarbeit mit Herrn Gerhard Schön vom Institut für Biometrie und Epidemiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

4 Ergebnisse

4.1 Patientenkollektiv

Die Studie wird statistisch in einem Complete-Case-Datensatz ausgewertet. Bei Analyse der SNPs liegt bei insgesamt sechs Patienten nicht zu allen drei SNPs ein Ergebnis vor. Es ergibt sich ein Complete-Case-Datensatz von 208 Patienten. Zur genauen Analyse des Patientenkollektivs werden demographische und klinische Parameter gegenübergestellt (Tabelle 9). Dabei werden vor allem Faktoren betrachtet, für die ein Einfluss auf die akute Abstoßung erwartet wird, beispielsweise das Empfängeralter und zugrundeliegende Autoimmunerkrankungen.

Tabelle 9: Darstellung des Complete-Case-Datensatz von n=208

	Keine Abstoßung n=138	Akute Abstoßung n=70	p-Wert
Geschlecht (m/w)			0,405
Männlich n=130 (62,5%)	89 (64,5%)	41 (58,6%)	
Weiblich n=78 (37,5%)	49 (35,5%)	29 (41,4%)	
Empfängeralter (Mittelwert +/- Standardabweichung)	55,73 +/- 11,294	50,07 +/-12,682	0,001
Grunderkrankung LTx			
Akutes Leberversagen	5 (3,6%)	3 (4,3%)	0,814
Alkoholische Leberzirrhose	42 (30,4%)	22 (31,4%)	0,883
Autoimmunhepatitis	10 (7,2%)	3 (4,3%)	0,405
PBC	4 (2,9%)	4 (5,7%)	0,318
Zirrhose nach HCV- Infektion	26 (18,8%)	15 (21,4%)	0,658
Zirrhose nach HBV- Infektion	17 (12,3%)	7 (10,0%)	0,621
PSC	11 (8,0%)	7 (10,0%)	0,623
Karzinom	43 (31,2%)	19 (27,1%)	0,550
Budd-Chiari-Syndrom	2 (1,4%)	3 (4,3%)	0,207
andere	40 (29,0%)	12 (17,1%)	0,062
Autoimmunerkrankung	19 (13,8%)	13 (18,6%)	0,364
Infektion	41 (29,7%)	22 (31,4%)	0,799
Immunsuppression			
Dual n=62 (29,8%)	41 (29,7%)	21 (30,0%)	0,884
Tripel n=144 (69,2%)	96 (69,6%)	48 (68,6%)	
Andere n=2 (1,0%)	1 (0,7%)	1 (1,4%)	

Das Patientenkollektiv wird anhand der Variable „Akute Abstoßung“ und „Keine Abstoßung“ dargestellt.

Die Inzidenz der akuten Abstoßung beträgt 33,7%. Es ergibt sich für das Empfängeralter mit $p=0,001$ ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Das Kollektiv ohne Abstoßung ist in diesem Vergleich signifikant älter (55,73 +/- 11,294 zu 50,07 +/-12,682).

Bei den Grunderkrankungen sind Mehrfachzählungen eines Patienten möglich. Bei keiner der aufgeführten Grunderkrankungen ergibt sich ein signifikantes Ergebnis hinsichtlich der Gruppen mit und ohne akuter Abstoßungsreaktion. Auch bei Zusammenfassung der autoimmunen Erkrankungen (PSC, PBC, Autoimmunhepatitis) und der Infektionserkrankungen (HBV-und HCV-Zirrhose) ergeben sich keine signifikanten Ergebnisse ($p=0,364$ und $p=0,799$). Wie in der Einleitung bereits beschrieben, ist allerdings erkennbar, dass analog zur Literatur auch in diesem Patientenkollektiv die Leberzirrhose, insbesondere die ethyltoxische Leberzirrhose, eine der häufigsten Grunderkrankungen Lebertransplantierter ist.

Bei akutem Leberversagen, AIH, PBC und Budd-Chiari gibt es Fallzahlen <5 , sodass die p -Werte ungenau sind. Die Gruppe „others“ setzt sich aus Patienten mit kryptogener Leberzirrhose, unklarer Grunderkrankung oder solchen Erkrankungen zusammen, die pro Patientengruppe „akute Abstoßung“ bzw. „ohne Abstoßung“ eine Fallzahl <5 aufwiesen. Diese Gruppe hat somit keine Aussagekraft in Bezug auf das Risiko einer akuten Abstoßungsreaktion.

Die Immunsuppression ist als Duale Therapie (CNI + Kortison), Tripel Therapie (CNI + Kortison + antiproliferative Therapie) und Andere analysiert.

Da der Einfluss des Spenderalters auf die akute Abstoßung bekannt ist, wird dieser Faktor auch in dieser Arbeit betrachtet. Da für das Spenderalter 35 Werte fehlen, ergibt sich für dieses Ergebnis ein neuer Complete-Case-Datensatz (Tabelle 10). Auch in diesem Datensatz ist die Gruppe der Empfänger ohne Abstoßung signifikant älter ($p=0,010$).

Beim Alter der Spender finden sich keine signifikanten Unterschiede ($p=0,721$). Die Spender der Kohorte, die keine Abstoßung erfahren haben sind zum Zeitpunkt der Transplantation im Durchschnitt 50,78 Jahre (+/-16,913), die Spender der Kohorte mit akuter Abstoßung sind im Durchschnitt 49,70 Jahre (+/- 18,328). Die meisten Spender sind zum Transplantationszeitpunkt zwischen 50 und 60 Jahre alt.

Mit $p=0,045$ ergibt sich für eine Leberzirrhose nach HBV-Infektion ein signifikanter Wert. In der Gruppe ohne akute Abstoßung befinden sich mit einer Anzahl von 17 Patienten mehr Patienten mit Leberzirrhose nach HBV-Infektion als in der Gruppe mit akuter Abstoßung mit einer Anzahl von einem Patienten.

Tabelle 10: Darstellung des Complete-Case-Datensatzes mit Einbezug des Spenderalters mit n=173

	Keine Abstoßung n=130	Akute Abstoßung n=43	p-Wert
Geschlecht (m/w)			0,081
Männlich n=104 (60,1%)	83 (63,8%)	21 (48,8%)	
weiblich n=69 (39,9%)	47 (36,2%)	22 (51,2%)	
Empfängeralter (Mittelwert +/- Standardabweichung)	55,81 +/- 11,332	50,42 +/-12,827	0,010
Spenderalter (Mittelwert +/- Standardabweichung)	50,78 +/- 16,913	49,70 +/- 18,328	0,721
Grunderkrankung LTx			
Akutes Leberversagen	5 (3,8%)	2 (4,7%)	0,816
Alkoholische Leberzirrhose	38 (29,2%)	15 (34,9%)	0,486
Autoimmunhepatitis	8 (6,2%)	1 (2,3%)	0,327
PBC	4 (3,1%)	3 (7,0%)	0,261
Zirrhose nach HCV- Infektion	26 (20,0%)	11 (25,6%)	0,439
Zirrhose nach HBV- Infektion	17 (13,1%)	1 (2,3%)	0,045
PSC	8 (6,2%)	5 (11,6%)	0,238
Karzinom	41 (31,5%)	13 (30,2%)	0,873
Budd-Chiari-Syndrom	2 (1,5%)	1 (2,3%)	0,732
Andere	39 (30,0%)	9 (20,9%)	0,250
Autoimmunerkrankung	16 (12,3%)	8 (18,6%)	0,300
Infektion	41 (31,5%)	12 (27,9%)	0,654
Immunsuppression			
Dual N=48 (27,7%)	38 (29,2%)	10 (23,3%)	0,448
Tripel N=125 (72,3%)	92 (70,8%)	33 (76,7%)	
Andere N=0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	

4.2 Verteilung der SNPs

4.2.1 Anzahl der nicht typisierten SNPs

Bei sechs Patienten konnten nicht zu allen SNPs Daten erhoben werden. Bei der DNA von drei Patienten war bei keinem der SNP eine Fluoreszenz messbar. Bei der DNA eines weiteren Patienten konnte kein Ergebnis bei den SNPs rs4458647 und rs6922 erzielt werden, bei rs9450279 wurde für diese DNA ein eindeutiges Ergebnis gemessen. Eine andere DNA lieferte bei rs4458647 negative Ergebnisse, bei rs6922 konnte ebenfalls kein klares Ergebnis erzielt werden. Dies war bei einer weiteren DNA bei rs9450279 und rs4458647 ebenfalls der Fall.

4.2.2 Hardy-Weinberg

Es wurde ermittelt, ob die vorliegenden Daten der 208 Patienten im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht liegen. Folgende Tabellen zeigen die Anzahl beobachteter und erwarteter Genotypen, den χ^2 -Wert, sowie den p-Wert.

- rs9450279

Tabelle 11: Hardy-Weinberg-Gleichgewicht rs9450279

Genotyp	Beobachtet	Erwartet	Chi ² -Wert	p-Wert
CC	134	134,1	0,001282214	0,971435
CT	66	65,8		
TT	8	8,1		

- rs4458647

Tabelle 12: Hardy-Weinberg-Gleichgewicht rs4458647

Genotyp	Beobachtet	Erwartet	Chi ² -Wert	p-Wert
CC	8	8,3	0,014781909	0,903231
CT	67	66,4		
TT	133	133,3		

▪ rs6922

Tabelle 13: Hardy-Weinberg-Gleichgewicht rs6922

Genotyp	Beobachtet	Erwartet	Chi ² -Wert	p-Wert
GG	81	81,3	0,005470085	0,941042
GT	98	97,5		
TT	29	29,3		

Da alle p-Werte >0,05% sind (p=0,971435, p=0,903231, p=0,941042) und somit nicht signifikant sind, stimmen erwartete und beobachtete Ergebnisse überein und die untersuchte Kohorte liegt somit im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

4.2.3 Ergebnisse der SNP-Verteilung

Die Ergebnisse der Endpunktgenotypisierung der einzelnen SNP werden im Folgenden tabellarisch dargestellt.

▪ rs9450279

Tabelle 14: rs9450279- Verteilung der Allele und Genotypen in verschiedenen Vererbungsmodellen

		Keine Abstoßung	Akute Abstoßung
rs9450279			
Allele	C	218 (79,0%)	116 (82,9%)
	T	58 (21,0%)	24 (17,1%)
rs9450279dominant	TT	6 (4,3%)	2 (2,9%)
	CC+CT	132 (95,7%)	68 (97,1%)
rs9450279rezessiv	CC	86 (62,3%)	48 (68,6%)
	TT+CT	52 (37,7%)	22 (31,4%)
rs9450279kodominant	CT	46 (33,3%)	20 (28,6%)
	CC+TT	92 (66,6%)	50 (71,4%)

Bei rs9450279C/T gibt es beim Allel C und T zwischen den Kohorten ohne und mit akuter Abstoßung keine deutlichen Unterschiede (C 79,0% zu 82,9%; T 21,0% zu 17,1%). Beim Genotyp CC ist mit 62,3% der größte Unterschied zwischen den Kohorten erkennbar (62,3% zu 68,6%). Den Genotyp TT haben in der Gruppe ohne Abstoßung lediglich sechs Patienten

(4,3%), in der Gruppe mit akuter Abstoßung sind es zwei Patienten (2,9%) mit diesem Genotyp.

- rs4458647

Tabelle 15: rs4458647- Verteilung der Allele und Genotypen in verschiedenen Vererbungsmodellen

		Keine Abstoßung	Akute Abstoßung
rs4458647			
Allele	C	59 (21,4%)	24 (17,1%)
	T	217 (78,6%)	116 (82,9%)
rs4458647dominant	CC	6 (4,3%)	2 (2,9%)
	TT+CT	132 (95,7%)	68 (97,1%)
rs4458647rezessiv	TT	85 (61,6%)	48 (68,6%)
	CC+CT	53 (38,4%)	22 (31,4%)
rs4458647kodominant	CT	47 (34,1%)	20 (28,6%)
	CC+TT	91 (65,9%)	50 (71,4%)

Bei rs4458647T/C gibt es beim Allel T und C zwischen den Kohorten ohne und mit akuter Abstoßung keine deutlichen Unterschiede (T 78,6% zu 82,9%; C 21,4% zu 17,1%). Beim Genotyp TT ist mit 7,0% der größte Unterschied zwischen den Kohorten erkennbar (61,6% zu 68,6%). Den Genotyp CC haben in der Gruppe ohne Abstoßung lediglich sechs Patienten (4,3%), in der Gruppe mit akuter Abstoßung gibt es zwei Patienten (2,9%) mit diesem Genotyp.

- rs6922

Tabelle 16: rs6922-Verteilung der Allele und Genotypen in verschiedenen Vererbungsmodellen

		Keine Abstoßung	Akute Abstoßung
rs6922			
Allele	G	169 (61,2%)	91 (65,0%)
	T	107 (38,8%)	49 (35,0%)
rs692dominant	TT	24 (17,4%)	5 (7,1%)
	GG+GT	114 (82,6%)	65 (92,9%)
rs692rezessiv	GG	55 (39,9%)	26 (37,1%)
	TT+GT	83 (60,1%)	44 (62,9%)
rs692kodominant	GT	59 (42,8%)	39 (55,7%)
	TT+GG	79 (57,2%)	31 (44,3%)

Bei rs6922G/T zeigten sich beim Allel G und T zwischen den Kohorten ohne und mit akuter Abstoßung keine deutlichen Unterschiede (G 61,2% zu 65,0%; T 38,8% zu 35,0%). Der Genotyp TT ist in der Gruppe ohne akute Abstoßung fast dreimal so häufig wie in der Gruppe mit akuter Abstoßung (17,4% zu 7,1%). Er kommt insgesamt bei 13,9% der Patienten vor. Es zeigten aber nur 2,4% der Patienten akute Abstoßung und den Genotyp TT. Der Genotyp GT kommt in der Gruppe mit akuter Abstoßung öfter vor (42,8% zu 55,7%).

4.2.4 Frequenzvergleich

Beide Ausprägungen eines SNP kommen in der Bevölkerung mit >1% vor (Thomas et al. 2011) und stellen etwa 90% der genetischen Variation im menschlichen Genom dar (Thomas et al. 2011 & Collins et al. 1998). Da für die hier untersuchten SNPs in der gesunden kaukasischen Bevölkerung Allelfrequenzen von >10% beschrieben wurden, wird dieses Ergebnis unter der Voraussetzung, dass sich die Grunderkrankungen nicht auf die Allelfrequenz auswirkt, auch für die untersuchte Patientenkohorte erwartet.

Die Allelfrequenzen aus der Literatur für die europäische Bevölkerung werden mit denen der vorliegenden Stichprobe verglichen (Tabelle 17) (NCBI-Datenbank 2017c; NCBI-Datenbank 2017a; NCBI-Datenbank 2017b).

- rs9450279

Bei dem SNP rs9450279 waren 334 C-Allele und 82 T-Allele vorhanden. Das ergibt eine Gesamtzahl von 416 Allelen. Das C-Allel macht 80,3%, das T-Allel 19,7% aus.

Die durch die NCBI-Datenbank publizierten Daten weichen mit 86% für das C-Allel und 14% für das T-Allel nur geringfügig von den hier ermittelten Daten ab (NCBI-Datenbank 2017c).

- rs4458647

Bei dem SNP rs4458647 waren 83 C-Allele und 333 T-Allele bei einer Gesamtzahl von 416 Allelen vorhanden. Daraus ergibt sich ein C-Allel-Anteil von 19,95%, sowie ein Anteil der T-Allele von 80,05%. Auch hier weichen die Ergebnisse der NCBI-Datenbank mit 14% für das C-Allel und 86% für das T-Allel nicht deutlich von den ermittelten Daten ab (NCBI-Datenbank 2017a).

- rs6922

Beim SNP rs6922 gibt es 260 G-Allele und 156 T-Allele, was ebenfalls eine Gesamtzahl von 416 ergibt. Das G-Allel kommt zu einem Anteil von 62,5% vor, das T-Allel zu 36,5%. Die NCBI-Datenbank veröffentlicht für das G-Allel einen Anteil von 67%, für das T-Allel einen Anteil von 33% (NCBI-Datenbank 2017b).

Tabelle 17: Allelfrequenzen

	Ermittelte Daten	Publizierte Daten NCBI-Datenbank
rs9450279		
C	0,80	0,86
T	0,20	0,14
rs4458647		
C	0,20	0,14
T	0,80	0,86
rs6922		
G	0,63	0,67
T	0,37	0,33

4.2.5 Explorative Analyse

Unter Berücksichtigung von Geschlecht und Alter wurde der Einfluss der SNPs für den dominanten, rezessiven und kodominanten Vererbungsweg auf die akute Abstoßungsreaktion ermittelt.

Da die abhängige Variable mit 0=keine Abstoßung und 1=akute Abstoßung kodiert ist, bezieht sich die Odds-Ratio auf die akute Abstoßungsreaktion. Eine Odds-Ratio <1 zeigt somit ein geringeres Abstoßungsrisiko an, eine Odds-Ratio 1 bedeutet ein gleiches Abstoßungsrisiko, eine Odds-Ratio>1 weist auf ein größeres Abstoßungsrisiko hin.

4.2.5.1 rs9450279

Da der SNP rs9450279 in der Promotorregion des Gens für das Enzym CD73 liegt, wird der Einfluss des SNP auf die akute Abstoßung nach Lebertransplantation untersucht (Li et al. 2010).

Tabelle 18: Logistische Regressionsanalyse für rs9450279

Genotyp	Keine Abstoßung	Abstoßung	Modell	OR	95%-KI		p-Wert
					unteres	oberes	
CC	86 (62,3%)	48 (68,6%)	Dominant	0,612	0,113	3,318	0,569
CT	46 (33,3%)	20 (28,6%)	Rezessiv	1,196	0,629	2,272	0,585
TT	6 (4,3%)	2 (2,9%)	Kodominant	0,900	0,468	1,728	0,751
C	218 (79,0%)	116 (82,9%)		1,201	0,696	2,073	0,511
T	58 (21,0%)	24 (17,1%)					

Dominant= TT→CC+CT

Rezessiv= CC→CT+TT

Kodominant= CT→CC+TT

Es zeigt sich im Vergleich der Gruppen „mit akuter Abstoßung“ und „ohne akute Abstoßung“ unter Einbezug von Geschlecht und Alter kein signifikanter p-Wert.

Beim dominanten Erbgang zeigt TT→CC+CT mit p=0,569 ein 0,612-fach niedrigeres Risiko für eine akute Abstoßung (95%-KI 0,113-3,318). Beim rezessiven Erbgang hat CC→CT+TT bei einem p=0,585 ein 1,196-fach höheres Risiko (95%-KI 0,629-2,272) für eine akute Abstoßungsreaktion. Wird der SNP kodominant vererbt zeigt CT→CC+TT bei p=0,511 ein 1,201-fach höheres Risiko (95%-KI 0,696-2,073). Im Vergleich der Allele besteht beim C-Allel im Vergleich zum T-Allel bei p=0,511 ein 1,201-fach höheres Risiko (95%-KI 0,696-2,073) für eine akute Abstoßung.

4.2.5.2 rs4458647

Der SNP rs4458647 liegt ebenfalls in der Promotorregion des Gens für das Enzym CD73 sodass ein Einfluss des SNP auf die akute Abstoßung nach Lebertransplantation untersucht wurde (Li et al. 2010).

Tabelle 19: Logistische Regressionsanalyse für rs4458647

Genotyp	Keine Abstoßung	Abstoßung	Modell	OR	95%-KI		p-Wert
					unteres	oberes	
CC	6 (4,3%)	2 (2,9%)	Dominant	0,612	0,113	3,318	0,569
CT	47 (34,1%)	20 (28,6%)	Rezessiv	1,226	0,646	2,326	0,533
TT	85 (61,6%)	48 (68,6%)	Kodominant	0,877	0,457	1,682	0,692
C	59 (21,4%)	24 (17,1%)		0,819	0,475	1,411	0,471
T	217 (78,6%)	116 (82,9%)					

Dominant= CC→TT+CT

Rezessiv= TT→CC+CT

Kodominant= CT→CC+TT

Im Vergleich der Gruppen „mit akuter Abstoßung“ und „ohne akute Abstoßung“ zeigt sich unter Einbezug von Geschlecht und Alter auch beim SNP rs4458647 kein signifikanter p-Wert.

Beim dominanten Erbgang hat CC→TT+CT bei p=0,569 ein 0,612-fach niedrigeres Risiko (95%-KI 0,113-3,318) für eine akute Abstoßung. Beim rezessiven Erbgang zeigt TT→CC+CT bei p=0,533 ein 1,226-fach höheres Risiko (95%-KI 0,646-2,326) für eine akute Abstoßungsreaktion. Beim kodominanten Erbgang hat CT→CC+TT bei p=0,692 ein 0,877-fach niedrigeres Risiko (95%-KI 0,457-1,682) für eine akute Abstoßung. Bei Betrachtung der Allele zeigt das C-Allel im Vergleich zum T-Allel bei p=0,471 ein 0,819-fach niedrigeres Risiko (95%-KI 0,475-1,411) für eine akute Abstoßung.

4.2.5.3 rs6922

Der SNP rs6922 liegt in der 3'untranslatierten Region des Gens für CD73, sodass ein Einfluss auf die mRNA-Stabilität vermutet wird (Yoshino et al. 2014). In der Studie von Yoshino et al. wurde ein Geschlechtsunterschied gesehen, sodass dieser Faktor auch hier

untersucht wird. In dieser Studie wird der SNP rs6922 in Bezug auf das Arterioskleroserisiko untersucht, wobei ein signifikanter Zusammenhang bei Männern, allerdings nicht bei Frauen zu finden war.

Tabelle 20: Logistische Regressionsanalyse für rs6922

Genotyp	Keine Abstoßung	Abstoßung	Modell	OR	95%-KI		p-Wert
					unteres	oberes	
GG	55 (39,9%)	26 (37,1%)	Dominant	0,348	0,124	0,980	0,046
GT	59 (42,8%)	39 (55,7%)	Rezessiv	0,899	0,489	1,655	0,733
TT	24 (17,4%)	5 (7,1%)	Kodominant	1,706	0,940	3,095	0,079
G	169 (61,2%)	91 (65,0%)		1,194	0,773	1,845	0,424
T	107 (38,8%)	49 (35,0%)					

Dominant= TT→GG+GT

Rezessiv= GG→GT+TT

Kodominant= GT→GG+TT

Im dominanten Erbgang zeigt sich unter Berücksichtigung von Geschlecht und Alter beim SNP rs6922 TT→GG+GT bei p=0,046 ein 0,348-fachniedrigeres Risiko (95%-KI 0,124-0,980) für eine akute Abstoßungsreaktion. Der Genotyp TT zeigt also im Vergleich zu GG+GT ein niedrigeres Risiko für eine akute Abstoßung. Im rezessiven und kodominanten Erbgang gibt es keine p-Werte <0,05. GG→GT+TT zeigt bei p=0,733 ein 0,899-fach niedrigeres Risiko (95%-KI 0,489-1,655) einer akuten Abstoßung. Im kodominanten Vererbungsweg ergibt der Vergleich von GT→GG+TT bei p=0,079 ein 1,706-fach höheres Risiko (95%-KI 0,940-3,095) einer akuten Abstoßung.

Bei Betrachtung der Allele zeigt das G-Allel im Vergleich zum T-Allel bei einem p=0,424 ein 1,194-fach erhöhtes Risiko (95%-KI 0,773-1,845) für eine akute Abstoßungsreaktion.

In der Studie von Yoshino et al. wird, wie bereits beschrieben, der SNP rs6922 in Bezug auf das Arterioskleroserisiko untersucht, wobei ein Zusammenhang bei Männern, allerdings nicht bei Frauen zu finden war. Alle Analysen der logistischen Regression werden in dieser Arbeit unter Berücksichtigung von Geschlecht und Alter durchgeführt. Es konnte kein Unterschied des Abstoßungsrisikos zwischen beiden Geschlechtern festgestellt werden (dominant p=0,634, rezessiv p=0,696, kodominant p=0,731).

5 Diskussion

Die Biomarkerforschung wird für viele Erkrankungen vorangetrieben und die Zahl der verfügbaren Biomarker wächst kontinuierlich. Ziel dabei ist eine personalisierte Medizin zu etablieren (Strecker 2011). Aktuell gibt es keine klinisch eingesetzten genetischen Biomarker, um das Risiko einer Abstoßungsreaktion präoperativ vorherzusagen. Die immunsuppressive Therapie ist daher kaum individuellen Merkmalen angepasst, sondern richtet sich mehr oder weniger nach allgemeinen Protokollen.

In dieser Arbeit wurde die Assoziation zwischen drei SNPs (rs9450279, rs4458647, rs6922) im CD73-Gen und der akuten zellulären Abstoßung nach Lebertransplantation untersucht.

Eine solche Assoziation könnte eine Basis für die Etablierung eines Biomarkers in der klinischen Praxis sein und damit eine Grundvoraussetzung für ein individualisiertes Therapieprotokoll darstellen.

5.1 CD73

Es ist bekannt, dass das Enzym CD73 eine zentrale Rolle im Immunsystem spielt. CD39 baut ATP ab, im letzten Schritt der Abbaukette wird durch CD73 Adenosin hergestellt (Roberts et al. 2014). Adenosin wirkt über den A_{2A} -Rezeptor antiinflammatorisch. Der A_{2A} -Rezeptor aktiviert eine intrazelluläre Signalkaskade über ein G_s -Protein, welches über die Adenylatzyklase zur cAMP-Erhöhung führt (Wen et al. 2010). Erhöhte cAMP-Konzentrationen führen zur Aktivierung der Proteinkinase A, die den Transkriptionsfaktor CREB durch Phosphorylierung aktiviert. Dieser hemmt die Produktion proinflammatorischer Zytokine in Entzündungszellen, führt zu vermehrter Aktivierung regulatorischer T-Zellen und induziert die Produktion antiinflammatorischer Zytokine (Belikoff et al. 2010; Kobie et al. 2006).

Sowohl in Studien mit CD73-knock out-Mäusen, als auch in Studien mit A_{2A} -Rezeptor-knock out-Mäusen wird die zentrale Rolle von CD73 bzw. dem Produkt Adenosin in der Regulation von Entzündungsreaktionen deutlich (Volmer et al. 2006; Ohta & Sitkovsky 2001). Dieser Mechanismus ist auch in der Kontrolle von akuten zellulären Abstoßungsmechanismen von Bedeutung.

Es ist bekannt, dass die untersuchten SNPs rs9450279 und rs4458647 einen Einfluss auf die Expression des Enzyms CD73 haben. Rs9450279 und rs4458647 liegen in der Promotorregion (Li et al. 2010), während rs6922 in der 3'untranslatierten Region liegt

(Yoshino et al. 2014). Dieser SNP kontrolliert möglicherweise über die RNA-Stabilität die Expression von CD73 mit. Da alle SNPs in Regionen liegen, die relevant für die Steuerung der Expression von CD73 sind, ist es denkbar, dass sie eine Assoziation zu akuter zellulärer Abstoßung nach Lebertransplantation zeigen.

5.1.1 rs6922

Bei der Punktmutation rs6922G→T zeigen die vorliegenden Ergebnisse einen Zusammenhang mit der akuten Abstoßung nach Lebertransplantation.

Im dominanten Erbgang zeigt TT→GG+GT bei $p=0,046$ ein 0,348-fach niedrigeres Risiko für eine akute Abstoßung. Mit einer geringen Signifikanz zeigt somit der Genotyp TT im Gegensatz zu GG+GT ein geringeres Risiko für eine akute Abstoßung nach Lebertransplantation. In den anderen untersuchten Erbgängen lässt sich dies nicht bestätigen, die Ergebnisse sind nicht signifikant. Auch der Allelvergleich von G zu T liefert kein signifikantes Ergebnis.

- Hypothese:

Es ist dokumentiert, dass sich der SNP rs6922G→T in der 3'UTR der DNA im Gen für CD73 befindet und somit die Stabilität der mRNA beeinflussen könnte (Yoshino et al. 2014). Eine Hypothese für die Erklärung des Zusammenhangs des Genotyps TT mit einem geringeren Risiko für eine akute zelluläre Abstoßung wäre eine mRNA-Stabilitätserhöhung durch den Genotyp TT. Damit wird mehr CD73 exprimiert und der Körper ist vor akuten zellulären Abstoßungen besser geschützt. Bei den Genotypen GG und GT scheint dieser Einfluss auf die mRNA-Stabilität zu fehlen.

- Einordnung in die aktuelle Literatur:

Bisher gibt es wenige Veröffentlichungen zum Polymorphismus rs6922 und diese ist die erste Arbeit, die den Polymorphismus rs6922G→T in Bezug auf die akute zelluläre Abstoßung nach Lebertransplantation untersucht. In der Literatur sind die Ergebnisse von Yoshino et al. in Bezug auf Mikrozirkulationsstörungen am Herzen bekannt. Dort wird ein Zusammenhang des SNP rs6922 mit einem erhöhten Arterioskleroserisiko bei Männern beschrieben. Die Hypothese von Yoshino et al. besagt, dass CD73 vor Arteriosklerose schützt. Vermutlich reduziert der SNP rs6922 die CD73 spezifische Stabilität der mRNA, wodurch die Arteriosklerose begünstigt wird.

Die Studie von Yoshino et al und die vorliegende Studie zeigen somit unterschiedliche Ergebnisse für den Zusammenhang des SNP rs6922G→T mit der Funktion des Enzyms

CD73. Bei Yoshino et al führt das Allel T zu einer herabgesetzten Funktion von CD73. In der vorliegenden Arbeit ist das Allel T in Form des Genotyps TT mit einem geringeren Abstoßungsrisiko assoziiert. Das Allel T alleine zeigt zum Allel G keinen signifikanten Unterschied im Abstoßungsrisiko. Die Diskrepanz zwischen der Studie von Yoshino et al. und der vorliegenden Studie kann darin begründet sein, dass die beiden Studien den SNP rs6922 in unterschiedlichen Krankheitsbildern untersucht haben. Möglicherweise gibt es in Abhängigkeit von dem untersuchten Krankheitsbild Faktoren, die für den SNP rs6922 einen unterschiedlichen Phänotyp erzeugen. Dies könnte eine Erklärungsmöglichkeit für die Diskrepanz sein.

Bei Yoshino et al. wurde die Assoziation nur für Männer gefunden. In dieser Studie zeigt der Polymorphismus in Bezug auf akute Abstoßung unter Kontrolle des Alters keinen signifikanten Unterschied zwischen Männern und Frauen, sodass hier keine weitere separate Betrachtung stattfinden muss.

In einer anderen Arbeit wurde eine Assoziation von rs6922G→T mit der Inzidenz von Tumoren des Magens untersucht (Sunakawa et al. 2014). Durch die Produktion von Adenosin wird CD73 hier im Zusammenhang mit der Unterdrückung von Antitumor-Immunantworten gesehen. Die Genotypen TT und GT und somit das Vorhandensein des T Allels waren in dieser Studie in einer japanischen Kohorte mit einem längeren Überleben, in der U.S. amerikanischen Kohorte mit einem kürzeren Überleben assoziiert. Die Ergebnisse der japanischen Kohorte wären vergleichbar mit denen von Yoshino et al, da bei beiden ein Zusammenhang des T-Allels und der geringeren Funktion von CD73 besteht. Mit der vorliegenden Studie stimmen die Ergebnisse jedoch nicht überein. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen bezüglich des Genotyps TT damit Ähnlichkeiten mit der U.S. amerikanischen Kohorte auf.

- Ethnische Unterschiede und Frequenzen

Wie vorher beschrieben ergeben sich in der vorliegenden Studie Frequenzen von 0,63 für G und von 0,37 für T. Diese sind ähnlich der in der NCBI-Datenbank beschriebenen Frequenzen der europäischen Bevölkerung (G-0,66 T-0,33) (NCBI-Datenbank 2017b). Die Studienpopulation von Yoshino et al besteht zu 93% aus Europäern (Yoshino et al. 2014).

Eine Erklärung für die fehlende Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Yoshino et al ist anhand eines Frequenzunterschiedes damit nicht gegeben.

Sunawaka et al. führt die Studie mit einer japanischen und einer amerikanischen Kohorte durch (Sunakawa et al. 2014). Für die japanische Bevölkerung unterscheiden sich die in der NCBI-Datenbank angegebenen Frequenzen mit 0,66 für G und 0,34 für T nicht von denen der europäischen Bevölkerung, sodass auch hier die Frequenz keinen Erklärungsansatz erlaubt.

Die U.S. amerikanische Kohorte besteht sowohl aus Asiaten (22,9%) als auch aus Patienten kaukasischer (34,3%) und hispanoamerikanischer (41,3%) Herkunft. Die Patientenkohorte der vorliegenden Studie ist ausschließlich kaukasischer Herkunft, sodass die U.S. amerikanische Kohorte zumindest zu 1/3 hinsichtlich der ethnischen Herkunft mit der vorliegenden Patientenkohorte übereinstimmt. Bezüglich der Frequenz gibt es keine Angaben zu Hispanoamerikanern, die Frequenzen der Asiaten allgemein stimmen mit denen japanischer Probanden überein (NCBI-Datenbank 2017b).

Einen ethnischen Unterschied als Erklärung der Ergebnisse im Vergleich mit den anderen Studien scheint somit schwierig.

Bei Betrachtung der Fallzahlen dieser Studie fällt auf, dass trotz Auswahl von SNPs mit Frequenzen der Mutation von >10% in der Bevölkerung, die Fallzahlen teilweise sehr gering sind.

In den Gruppen ohne Abstoßung und mit Abstoßung ergeben sich keine großen Unterschiede (G: 61,2% zu 65%; T: 38,8% zu 35%).

Beim Genotyp ist die Frequenz von GT in der Kohorte mit Abstoßung deutlich höher (42,8% zu 55,7%). Die Frequenz des Genotyps TT ist in der Kohorte ohne Abstoßung mehr als doppelt so hoch wie in der Kohorte mit Abstoßung (17,4% zu 7,1%). Insgesamt haben 13,9% der Patienten den Genotyp TT. 2,4% der Patienten haben den Genotyp TT und hatten eine akute Abstoßung nach der Lebertransplantation, was einer absoluten Zahl von fünf Patienten entspricht. Es empfiehlt sich daher eine Reproduktion der Daten mit einem deutlich größeren Patientenkollektiv zu wiederholen.

- Zusammenfassung rs6922

Beim SNP rs6922 des CD73-Gen wurde lediglich im dominanten Erbgang ein statistisch sehr gering signifikantes Ergebnis ermittelt. Die anderen untersuchten Erbgänge blieben ohne Signifikanz. Teilweise stimmt das signifikante Ergebnis mit den Ergebnissen anderen Studien zum SNP rs6922 nicht überein. Aus diesen Gründen bleibt es unklar, ob die gefundene schwache Assoziation des SNP rs6922 im dominanten Erbgang ausreicht, um den SNP rs6922 als Biomarker für eine akute zelluläre Abstoßung nach Lebertransplantation zu spezifizieren.

5.1.2 rs9450279, rs4458647

In dieser Arbeit wurde kein Hinweis auf eine Assoziation der SNPs rs9450279 und rs4458647 im Gen des Enzyms CD73 mit der akuten Abstoßung nach Lebertransplantation

gefunden. Sowohl für den dominanten (rs9450279 TT→CC+CT p=0,569; rs4458647 CC→CT+TT p=0,569), für den rezessiven (rs9450279 CC→CT+TT p=0,585; rs4458647 TT→CC+CT p=0,533) als auch für den kodominanten Vererbungsweg (rs9450279 CT→CC+TT p=0,751; rs4458647 CT→CC+TT p=0,692) zeigten sich unter Kontrolle von Geschlecht und Alter keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Gruppen mit und ohne akuter Abstoßungsreaktion.

Diese SNPs sind somit ungeeignet das Risiko einer akuten zellulären Abstoßung präoperativ zu kalkulieren und scheiden als potentielle Biomarker aus.

Im Folgenden sollen mögliche Fehlerquellen für das Ausbleiben signifikanter Ergebnisse im Fall der SNPs rs9450279 und rs4458647 diskutiert werden:

- Es gibt viele Untersuchungen, in denen der Zusammenhang von CD73 mit der Regulation von Entzündungsreaktionen untersucht wurde. Weiterhin ist die Pathogenese der akuten zellulären Abstoßung mit der darauffolgenden Entzündungsreaktion gut verstanden, sodass auf einen Zusammenhang geschlossen werden kann. Bisher gibt es jedoch keine Arbeiten, in denen das Enzym CD73 direkt hinsichtlich der Assoziation mit akuter zellulärer Abstoßung untersucht wurde. Für eine zukünftige Arbeit wäre eine Untersuchung von CD73-knock out-Mäusen, denen eine Leber transplantiert wird, sinnvoll.
- In dieser Studie wurde nicht zwischen einfach und mehrfach akuten Abstoßungen unterschieden. Eine einfach akute Abstoßung ist häufig, hat in den meisten Fällen keine schweren Konsequenzen und kann gut behandelt werden. Mehrfach akute Abstoßungen beeinflussen das Outcome jedoch stark und könnten stärker mit genetischen Einflussfaktoren zusammenhängen als einfach akute Abstoßungen (Douset et al. 1998). Um einen signifikanten Einfluss der SNPs auf das Abstoßungsrisiko zu identifizieren, muss möglicherweise zwischen einfach und mehrfach akuten Abstoßungen differenziert werden. Aufgrund der zu geringen Patientenzahl wurde dies im vorliegenden Fall noch nicht durchgeführt.
- Da alle Berechnungen innerhalb des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts lagen, lässt sich eine Verfälschung der Daten aufgrund eines falschen Typisierungsergebnisses nahezu ausschließen.
- Die ethnische Herkunft der Patienten kann ebenfalls einen Einfluss auf die Verteilung des SNP haben. Alle Patienten des vorliegenden Patientenkollektivs sind kaukasischer Herkunft.

In der Studie von Li et al., in der die SNPs rs9450279 und rs4458647 untersucht wurden, setzte sich das Patientenkollektiv aus 58 europäisch-amerikanischen (EA), 53 afroamerikanischen (AA), 60 Han-Chinesen aus Amerika (HCA) und 23 Patienten

unbekannter Herkunft zusammen (Li et al. 2010). In der Studie gibt es keine Angaben über die ermittelte Allelfrequenz. Nach Angaben der NCBI-Datenbank liegen bei den SNPs rs9450279 und rs4458647 in der afrikanischen Bevölkerung die Mutationen zu 37% vor, in der europäischen und amerikanischen Bevölkerung jedoch lediglich zu 14% bzw. zu 11% (NCBI-Datenbank 2017c; NCBI-Datenbank 2017a). Zu Frequenzen der chinesischen Bevölkerung gibt es in der NCBI-Datenbank keine Angaben.

Obwohl die Allelfrequenzen für die Mutation insgesamt nicht geringer sind als in anderen Studien, ergeben sich bei der Betrachtung des Genotyps teilweise sehr geringe Fallzahlen. Wie oben diskutiert empfiehlt sich eine Reproduktion der Ergebnisse für den SNP rs6922 mit einer deutlich größeren Patientenkohorte. Beim SNP rs9450279 haben lediglich 3,8% den Genotyp TT, bei rs4458647 haben 3,8% der Patienten den Genotyp CC. Auch für diese SNPs empfiehlt sich daher eine Überprüfung der Ergebnisse mit einem deutlich größeren Patientenkollektiv, wodurch möglicherweise signifikante Ergebnisse aufgedeckt werden könnten.

- In dieser Arbeit wurden entscheidende Risikofaktoren für eine akute Abstoßung betrachtet. So konnte das Empfängeralter als signifikanter Einflussfaktor mit in die Berechnungen einbezogen werden. Das Spenderalter als auch der Einfluss von Grunderkrankungen, wie zum Beispiel Autoimmunerkrankungen, bestätigten sich in dieser Arbeit nicht als signifikante Einflussfaktoren, sodass eine Einberechnung dieser Faktoren nicht nötig wurde. Dennoch gibt es weitere Risikofaktoren für akute Abstoßungen nach Lebertransplantation. Dazu zählt ein HLA-DR-Mismatch, hohe Kreatinin-Level, hohe Leberenzymlevel als auch eine lange Ischämiezeit (Charlton 2013). Diese wurden in dieser Arbeit nicht betrachtet. Eine Beeinflussung der Ergebnisse durch nicht betrachtete Risikofaktoren erscheint möglich, sodass in folgenden Studien die Berücksichtigung dieser Faktoren sinnvoll sein kann.

5.2 Das Patientenkollektiv

5.2.1 Ursachen für ergebnislose Endpunktgenotypisierungen

Insgesamt konnten die Genotypen für die SNPs rs9450279, rs4458647 und rs6922 für 208 Patienten erfolgreich bestimmt werden. Bei sechs der Patienten konnten mit der Endpunktgenotypisierung keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden. Es wurde entweder kein Fluoreszenzsignal gemessen oder die Messwerte der Fluoreszenz konnten nicht eindeutig einem Genotyp zugeordnet werden. In unmittelbarer Umgebung aller untersuchten

SNPs liegen weitere Punktmutationen, die allerdings in niedrigerer Frequenz auftreten. Dies kann dazu führen, dass die Sonde nicht so stark oder gar nicht binden kann, wenn die niederfrequente Mutation vorliegt. Dadurch wird die Fluoreszenz abgeschwächt oder ausgelöscht. Eine andere Erklärungsmöglichkeit ist ein DNA-Bruch neben der Punktmutation, sodass beide Sonden nicht binden können.

5.2.2 Empfängeralter

In der Literatur ist der Einfluss des Empfängeralters auf die akute Abstoßung nach Lebertransplantation bekannt (Charlton 2013). Ein höheres Alter ist protektiv für eine akute Abstoßungsreaktion. Dieses Phänomen ist als Immunoseneszenz beschrieben. Es lässt sich durch ein im Alter weniger aktives Immunsystem mit einer schwächeren Immunantwort erklären (Heinbokel et al. 2013). Diese Annahmen bestätigen sich auch in diesem Patientenkollektiv. Die Gruppe ohne akute Abstoßung ist signifikant älter als die Gruppe mit akuter Abstoßung.

5.2.3 Grunderkrankungen

In der Literatur wird eine medikamentenunabhängige erhöhte Inzidenz zwischen Autoimmunerkrankungen und akuter Abstoßungsreaktion nach Lebertransplantation beschrieben, welche durch eine erhöhte immunologische Aktivität erklärt werden kann (Hayashi et al. 1998). Dieses Phänomen konnte hier nicht bestätigt werden. Wie bereits im Ergebnisteil beschrieben, bestehen bei einigen Grunderkrankungen, wie zum Beispiel der Autoimmunhepatitis, Fallzahlen von <5. Dies kann als mögliche Ursache für fehlende Assoziationen gesehen werden. Zudem werden in dieser Arbeit nur Autoimmunerkrankungen der Leber betrachtet, sodass der Einfluss extrahepatischer Autoimmunerkrankungen nicht erfasst werden kann.

5.2.4 Das Spenderalter

Studien zeigen einen signifikanten Einfluss des Spenderalters auf die akute Abstoßung nach Lebertransplantation (Wiesner et al. 1998). Bei älteren Spendern steigt die Inzidenz der akuten Abstoßung. In den Ergebnissen dieser Arbeit zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Alter der Spender zum Zeitpunkt der Transplantation zwischen den Gruppen mit und ohne akute Abstoßung. Hinsichtlich des Spenderalters fehlten für 17% der Spender Informationen

zum Spenderalter, sodass die untersuchte Kohorte deutlich kleiner ist. Dies könnte einer der Gründe für die fehlende Signifikanz des Spenderalters sein.

5.3 Weitere Einflussfaktoren

Nicht nur die SNPs, sondern auch andere Faktoren können das Risiko für eine akute Abstoßungsreaktion beeinflussen. Bekannte Risikofaktoren wie das Empfängeralter, das Spenderalter und Autoimmunerkrankungen wurden oben besprochen. Faktoren wie ein hohes Kreatinin-Level, erhöhte Leberenzyme, HLA-DR Mismatch oder die Ischämiezeit mit daraus folgenden Schädigungen durch Ischämie und Reperfusion wurden in dieser Studie nicht untersucht (Charlton 2013). Der Fokus dieser Studie sollte nicht auf die klinischen Parameter gelegt werden. Teilweise sind vor allem bei weiter zurück liegenden Transplantationen die Daten unvollständig. Sollte eine Reproduktion der Daten in einem größeren Patientenkollektiv mit den Daten der letzten Jahre stattfinden, könnte der Einschluss dieser klinischen Parameter durchaus in Betracht gezogen werden.

5.3.1 Ischämie und Reperfusion als Schädigungsmechanismus

Ischämie und Reperfusion als Schädigungsmechanismus der Leber bei Transplantation ist einer der Hauptrisikofaktoren sowohl für akute als auch chronische Abstoßung (Charlton 2013). Schon aus diesem Grund wäre es sinnvoll diesen Schädigungsmechanismus bei Betrachtung von akuten Abstoßungsreaktionen mit einzubeziehen, beispielsweise anhand der gemessenen Ischämiezeit.

Der Einfluss des Enzyms CD73 ist ein weiterer Grund den Faktor der Ischämie und Reperfusion als Schädigungsmechanismus mit zu betrachten. Das Enzym CD73 spielt auch bei der Schädigung der Leber nach Ischämie eine zentrale Rolle. Das freigewordene ATP wird mit Hilfe von CD73 zu Adenosin umgebaut. Es ist bekannt, dass der A_{2A} -Rezeptor einen wichtigen Mechanismus zur Reduktion der Entzündungsreaktion aktiviert (Day et al. 2004). Im Falle eines CD73-Defekts läuft die Entzündungsreaktion somit verstärkt ab und die Leberschädigung stellt sich verstärkt dar. Bezüglich dieses Mechanismus wäre es von besonderem Interesse ebenfalls eine Genotypisierung des Spenders vorzunehmen, da sich CD73 unter anderem auf dem Endothel der Leber befindet (Roberts et al 2014).

6 Fazit und Ausblick

Aktuell erfolgt die Immunsuppression nach Lebertransplantation nach Standardprotokollen. Bei der Leber gibt es jedoch, stärker als bei anderen Organen, sehr große Unterschiede im individuellen Risiko für Abstoßungsreaktionen. Viele Patienten reagieren mit multiplen Abstoßungsreaktionen. Bei Patienten, die die Immunsuppressiva unregelmäßig einnehmen oder absetzen, bleiben ca. 20% abstoßungsfrei (Mazariegos et al. 1997; Sanchez-Fueyo & Strom 2011). Deshalb ist es bei Lebertransplantationen erstrebenswert, das Abstoßungsrisiko bereits präoperativ einzuschätzen, um ein individuelles Therapieprotokoll zu erstellen.

Das individuelle Risiko für die akute Abstoßungsreaktion nach Transplantation setzt sich vermutlich aus multiplen Faktoren zusammen, von denen genetische Biomarker in Form von SNPs nur einen Teil darstellen. Da sie stabil, unveränderlich und präoperativ gut bestimmbar sind, eignen sich SNPs als Biomarker jedoch sehr gut und die Forschung in diesem Gebiet wird aktuell stark vorangetrieben. In dieser Arbeit konnte bei den SNPs rs9450279 und rs4458647 kein Zusammenhang gefunden werden, sodass sie als Biomarker scheinbar nicht geeignet sind. Eine sinnvolle Studie wäre sicherlich die Untersuchung lebertransplantierte CD73-knock out-Mäuse hinsichtlich der Assoziation mit akuter Abstoßung, um den Zusammenhang zwischen CD73 und akuten Abstoßungen nach Lebertransplantation endgültig zu klären. Auch vergleichbare Studien mit wesentlich größerer Patientenzahl und zusätzlicher Unterscheidung zwischen einfach und mehrfach akuten Abstoßungen könnte eine Assoziation dieser SNPs weiter charakterisieren. Zudem könnte die Berücksichtigung weiterer Risikofaktoren für die akute Abstoßung in Betracht gezogen werden. Dazu zählen beispielsweise hohe Kreatinin-Level, erhöhte Leberenzyme als auch Leberschädigung durch Ischämie und Reperfusion.

Beim SNP rs6922 konnte ein Hinweis auf eine Assoziation zur akuten zellulären Abstoßung nach Lebertransplantation gefunden werden. Allerdings ist die gefundene Assoziation auf den dominanten Erbgang beschränkt und von nur schwacher Signifikanz. Der SNP rs6922 muss daher bis dato als zweifelhafter Biomarker bezeichnet werden. Zur Abklärung müssten weitere prospektive und retrospektive Studien durchgeführt werden. Der nächste Schritt zur Klärung der Rolle des SNP rs6922 als Biomarker wäre hinsichtlich die Reproduktion der Daten in einem deutlich größeren Patientenkollektiv. Falls sich eine eindeutige Assoziation ergibt, wäre dies ein wichtiger Schritt, um den SNP rs6922 als genetischen Biomarker für die Ausprägung einer akuten zellulären Abstoßung nach Lebertransplantation zu definieren. Zusätzlich würde eine eindeutige Assoziation anzeigen, dass der CD73-spezifische

Reaktionsweg eine Relevanz für die Ausprägung einer akuten zellulären Abstoßung hat und somit als Angriffspunkt für immunsuppressive Medikamente dienen könnte.

7 Zusammenfassung

Die Transplantation ist für viele Lebererkrankungen die einzige kurative Therapiemöglichkeit. Dabei sind akute Abstoßungsreaktionen (AA) häufig, welche bei wiederholtem Auftreten das Outcome verschlechtern. Um sie zu verhindern, ist bei jedem Patienten eine lebenslange Immunsuppression notwendig, die mit schweren Nebenwirkungen einhergehen kann. Ziel muss es sein die Dosis der Medikamente in einem individuellen Therapieprotokoll gering zu halten, ohne das Risiko der Transplantatabstoßung zu erhöhen. Dafür ist es notwendig das Abstoßungsrisiko (AR) der Personen präoperativ abschätzen zu können. Neben anderen Einflüssen auf das AR werden auch genetische Faktoren, z.B. in Form von Single Nucleotide Polymorphismen (SNP) diskutiert. Da diese Biomarker von prognostischem Wert für die Einschätzung des individuellen AR sein könnten, sind SNPs auf der DNA der Organempfänger von großem Interesse. In der vorliegenden Arbeit werden drei SNPs (rs9450279, rs4458647 und rs6922) analysiert, die in der Region der DNA liegen, die für das Protein CD73 kodieren. Es ist bekannt, dass Adenosin als Produkt des Enzyms CD73 in Zusammenhang mit der Regulation des Immunsystems und der Regulation von Entzündungsmechanismen steht und auf diese Weise die AA nach Lebertransplantation beeinflussen könnte. Die drei SNPs werden hinsichtlich eines Zusammenhangs mit der AA untersucht. Erstlebertransplantierte Patienten mit AA (n=70) und Patienten ohne AA (n=138) werden miteinander verglichen. Es handelt sich um ein retrospektives Studiendesign mit einem Beobachtungszeitraum von 365 Tagen. Mit der isolierten DNA aus den Blutproben der Patienten werden die SNPs durch Endpunktgenotypisierung bestimmt. In Form einer explorativen, multivariaten Analyse wurden für die SNP rs9450279 und rs4458647 im dominanten Vererbungsmodell (rs9450279TT→CC+CT p=0,569, rs4458647CC→CT+TT p=0,569), im rezessiven Vererbungsmodell (rs9450279CC→CT+TT p=0,585, rs4458647TT→CC+CT p=0,533) als auch im kodominanten Vererbungsmodell (rs9450279CT→CC+TT p=0,751, rs4458647CT=CC+TT p=0,692) keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der SNPs gefunden. Für den SNP rs6922 ergab sich im dominanten Vererbungsweg ein leicht signifikantes Ergebnis (rs6922TT→GG+GT p=0,046). Beim rezessiven (rs6922GG→GT+TT p=0,733) und kodominanten (rs6922GT→GG+TT p=0,079) Vererbungsweg ergaben sich keine Signifikanzen. Die Ergebnisse geben für rs9450279 und rs4458647 keinen Hinweis auf eine Assoziation mit der AA. Diese SNPs sind deshalb ungeeignet das Risiko einer AA präoperativ zu kalkulieren. Für rs6922 ergibt sich ein Hinweis auf eine Assoziation und möglicherweise einen Biomarker zur Anzeige des AR.

8 Summary

For many liver diseases the liver transplantation is the only curative therapeutic option. Acute allograft rejection (AA) occurs frequently and especially repeated rejections downgrade the outcome. To prevent organ rejection, an immunosuppressive therapy is used, which can cause severe side effects itself. By using an individual therapeutical protocol, a balance between the necessary dose of medication without increasing the risk of acute allograft rejection (AR) has to be found. It is necessary to be able to estimate the AR. There are numerous factors influencing the AR, such as genetic effects in terms of single nucleotide polymorphisms (SNP). Because these Biomarkers can help to estimate the individual AR, it is of great interest to identify SNP as Biomarkers on the recipients DNA. In this study three SNPs (rs9450279, rs4458647, rs6922) were examined. All three are located in the region of the gene expressing the protein CD73. Studies suggest that Adenosin, as a product of the enzyme CD73, is part of the regulating mechanisms of the immune system and of inflammatory reactions and thereby influences the AR in liver transplantation. The three SNPs were reviewed concerning the influence on AA after liver transplantation. The retrospective study included Patients receiving their first liver transplantation in this group there were patients with AA (n=70) and without AA (n=138). The observation period was 365 days. Endpointgenotyping was used to genotype the SNPs. For the SNPs rs9450279 and rs4458647 no significant result was detected neither for the dominant model (rs9450279TT→CC+CT p=0,569, rs4458647CC→CT+TT p=0,569), the recessive model (rs9450279CC→CT+TT p=0,585, rs4458647TT→CC+CT p=0,533) nor the kodominant model (rs9450279CT→CC+TT p=0,751, rs4458647CT=CC+TT p=0,692). The result for the SNP rs6922 was slightly significant (rs6922TT→GG+GT p=0,046) in the dominant model. Both the recessive (rs6922GG→GT+TT p=0,733) and the kodominant (rs6922GT→GG+TT p=0,079) model did not show a significant result. The results for the SNPs rs9450279 and rs4458647 did not provide an indication of an association with the AA after liver transplantation. These SNPs seem to be improper as a biomarker for AA. . For the SNP rs6922 we detected an indication of an association whereby this SNP might be an appropriate biomarker to predict the AR after liver transplantation.

9 Abkürzungsverzeichnis

- 5'-nukleotidase ecto (NT5E)
- Abstoßungsrisiko (AR)
- adaptive T_{regs} (aT_{regs})
- Adenosindiphosphat (ADP)
- Adenosinmonophosphat (AMP)
- Adenosintriphosphat (ATP)
- Akute Abstoßungsreaktion (AA)
- Antigenpräsentierende Zelle (APC)
- Aspartat-Aminotransferase (AST)
- Autoimmunhepatitis (AIH)
- Calcineurin-Inhibitor (CNI)
- Calcium (Ca²⁺)
- cAMP regulated enhancer (CRE)
- cAMP response element-binding protein (CREB)
- Carbohydrate-Antigen (CA)
- Cluster of Differentiation (CD)
- CREB-binding Protein (CRB)
- Cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP)
- Damage associated molecular pattern (DAMP)
- Dendritische Zelle (DC)
- Desoxyribonukleinsäure (DNA)
- Desoxyribonukleotid Triphosphate (dNTPs)
- Fluoreszenzenergietransfer-Mechanismus (FRET)
- Forkhead-Box-Protein 3 (FoxP3)
- Hepatitis B-Virus (HBV)
- Hepatitis C-Virus (HCV)
- Hepatozelluläres Karzinom (HCC)
- human leukocyte antigen (HLA)
- inducible T_{regs} (iT_{regs})
- Interferon (INF)
- Interleukin (IL)
- Konfidenzintervall (KI)
- major histocompatibility complex (MHC)

- messenger RNA (mRNA)
- Minor-Groove-Binder (MGB)
- model for endstage liver disease-Score (MELD-Score)
- natural T_{regs} (nT_{regs})
- Nicht-Killerzellen (NK-Zellen)
- Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- κ B)
- Polymerasekettenreaktion(PCR)
- Primär biliäre Zirrhose (PBC)
- Primär sklerosierende Cholangitis (PSC)
- Proteinkinase A (PKA)
- regulatorische T-Zellen (T_{reg})
- Ribonukleinsäure (RNA)
- Single Nucleotide Polymorphismus (SNP)
- T-Helferzellen (T_H-Zellen)
- T-Zell-Rezeptor (TCR)
- Tumor Growth Faktor (TGF)
- Tumornekrosefaktor (TNF)
- Uniklinikum Eppendorf (UKE)
- zytotoxische T-Zellen (T_c-Zellen)

10 Literaturverzeichnis

- Afonina I, Zivarts M, Kutuyavin I, Lukhtanov E, Gamper H, Meyer R (1997) Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Research*, 25(13), pp.2657–2660.
- Belikoff B, Hatfield S, Sitkovy M, Remick D (2010) Adenosine negative feedback on A_{2A} adenosine receptors mediates hyporesponsiveness in chronically septic mice. *Shock*, 35(4), pp.382–387.
- Biosystems Applied (2010)a. Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System-Reagenzienhandbuch, Foster City, Californien, USA [Online im Internet] URL: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_048140.pdf [Stand: 04.April 2016].
- Biosystems Applied (2010)b. TaqMan® Genotyping Master Mix, Foster City, Californien, USA [Online im Internet] URL: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_039282.pdf [Stand: 04.April 2016].
- Bluestone JA, Tang Q (2005) How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? *Current Opinion in Immunology*, 17(6), pp.638–642.
- Blume C, Felix A, Shushakova N, Gueler F, Falk CS, et al. (2012) Autoimmunity in CD73/Ecto-5'-nucleotidase deficient mice induces renal injury. *PLoS one*, 7(5), e37100.
- Borsellino G, Kleinewietfeld M, Diletta Di M, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, Höpner S, Centonze D, Bernardi G, Dell'Acqua ML, Rossini PM, Battistini L, Röttschke O, Falk K (2007) Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*, 110(4), pp.1225–1232.
- Bouma MG, Jeunhomme TM, Boyle DL, Dentener MA, Voitenok NN, van den Wildenberg FA, Buurman WA (1997) Adenosine inhibits neutrophil degranulation in activated human whole blood: involvement of adenosine A₂ and A₃ receptors. *The Journal of Immunology*, 158(11), pp.5400–5408.
- Camperio C, Caristi S, Fanelli G, Soligo M, Porto PD, Enza P (2012) Forkhead Transcription Factor FOXP3 Upregulates CD25 Expression through Cooperation with RelA/NF-κB. *PLoS ONE*, 7(10), e48303.
- Charlton MR (2013) How important is acute cellular rejection? *Hepatology and Liver Transplantation*, 19(11), pp.S9-S13.
- Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, Samstein RM, Liang Y, Kas A, Rudensky AY (2009) CD4+ regulatory t cells control Th17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science*, 326(5955), pp.986–991.
- Chrobak P, Charlebois R, Rejtar P, El Bikai R, Allard B, Stagg J (2015) CD73 Plays a

- Protective Role in Collagen-Induced Arthritis. *The Journal of Immunology*, 194(6), pp.2487–2492.
- Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A (1998) A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome research*, 8(12), pp.1229–1231.
- Cronstein BN, Levin RI, Philips M, Hirschhorn R, Abramson SB, Weissmann G (1992) Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A1 receptors and inhibited via adenosine a2 receptors. *The Journal of Immunology*, 148(7), pp.2201-2206.
- Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ (2009) Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? *Immunity*, 30(5), pp.626–635.
- Day Y, Marshall MA, Huang L, McDuffie J, Okusa MD, Linden J (2004) Protection from ischemic liver injury by activation of A 2A adenosine receptors during reperfusion: inhibition of chemokine induction. *American Journal of Physiology*, 286(2), pp.285–293.
- Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Freidmann D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjyoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC (2007) Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of experimental medicine*, 204(6), pp.1257–65.
- Deaglio S, Robson SC (2011) Ectonucleotidases as Regulators of Purinergic Signaling in Thrombosis, Inflammation, and Immunity. *Advances in Pharmacology*, 61, pp.301-332.
- Denk H (2000) Pathologie der transplantierten Leber. *Pathologie der Leber und Gallenwege*, 2.Aufl., Band 10, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, Deutschland, pp. 804–833.
- Dousset B, Conti F, Cherruau B, Louvel A, Soubrane O, Houssin D, Calmus Y (1998) Is acute rejection deleterious to long-term liver allograft function? *Journal of Hepatology*, 29, pp.660–668.
- Deutsche Stiftung Organtransplantation DSO (2014)a Tätigkeitsbericht 2014 des Transplantationszentrums Universitätsklinikum Hamburg, Frankfurt am Main, Deutschland [Online im Internet] URL: http://www.dso.de/uploads/tx_infoc/Hamburg_2014_02.pdf. [Stand: 04.April 2016].
- Deutsche Stiftung Organtransplantation DSO (2014)b Lebertransplantation, Frankfurt am Main, Deutschland [Online im Internet] URL: <http://www.dso.de/organspende-und-transplantation/transplantation/lebertransplantation.html> [Stand: 04.April 2016].
- Deutsche Stiftung Organtransplantation DSO (2015)a. Wartliste und Vermittlung, Frankfurt am Main, Deutschland [Online im Internet] URL: <https://www.dso.de/organspende-und-transplantation/warteliste-und-vermittlung.html> [Stand: 01. Januar 2016].
- Deutsche Stiftung Organtransplantation DSO (2015)b Zahlen zur Organspende und Transplantation, Frankfurt am Main, Deutschland [Online im Internet] URL: <http://www.dso.de/servicecenter/presse/zahlen-zur-organspende-und->

- transplantation.html [Stand: 01. April 2016].
- Dullin R, Koch M, Sterneck M, Nashan B, Thude H (2015) Association Between a Gain-of-Function Variant of PTPN22 and Rejection in Liver Transplantation. *Transplantation*, 99(2), pp.431–437.
- Efferth T (2006) Prädiktive Pharmakologie und Toxikologie: Genetik, Genomik, Systembiologie. *Molekulare Pharmakologie und Toxikologie: Biologische Grundlagen von Arzneimitteln und Giften*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Deutschland, p.262.
- Eltzschig HK, Sitkovsky MV, Robson SC (2012) Purinergic signaling during inflammation. *The New England journal of medicine*, 367(24), pp.2322–33.
- Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF (2004) Cutting Edge: TGF- β Induces a Regulatory Phenotype in CD4⁺CD25⁻ T Cells through Foxp3 Induction and Down-Regulation of Smad7. *The Journal of Immunology*, 172(9), pp.5149–5153.
- Gesellschaft für biologische Krebsabwehr GfBK (2015) Tumormarker, Heidelberg, Deutschland [Online im Internet] URL: http://www.biokrebs.de/images/download/Therapie_Infos/Tumormarker.pdf [Stand: 05. Januar 2016].
- Göke B, Auernhammer C (2006) Lebertransplantation. *Interner Klinikleitfaden der Medizinischen Klinik und Poliklinik II: Gastroenterologie, Hepatologie, Endokrinologie, Stoffwechsel*, Klinikum der Universität München, Deutschland, pp. 141–160.
- Gómez-Manero N, Ignacio Herrero J, Quiroga J, Sangro B, Pardo F, Cienfuegos JA, Prieto J (2001) Prognostic model for early acute rejection after liver transplantation. *Liver Transplantation*, 7(3), pp.246–254.
- Gudenus R, Granzer U (2010) Biomarker und Surrogatendpunkte. *Transkript 7*, pp.31–32.
- Hayashi M, Keeffe EB, Krams SM, Martinez OM, Ojogho ON, So SK, Garcia G, Imperial JC, Esquivel CO (1998) Allograft rejection after liver transplantation for autoimmune liver diseases. *Liver transplantation and surgery*, 4(3), pp.208–14.
- Heinbokel T, Elkhail A, Liu G, Edtinger K, Tullius SG (2013) Immunosenescence and organ transplantation. *Transplantation Reviews*, 27(3), pp.65–75.
- Hill EW, McGivney BA, Gu J, Whiston R, MacHugh DE (2010) A genome-wide SNP-association study confirms a sequence variant (g.66493737C>T) in the equine myostatin (MSTN) gene as the most powerful predictor of optimum racing distance for Thoroughbred racehorses. *BMC Genomics*, 11(1), pp.1–10.
- Hosmer DW, Lemeshow S, Sturdivant R (2013) Logistic Regression Models for the Analysis of Correlated Data. *Applied Logistic Regression*, 3. Aufl., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 313–376.
- Ichikawa N, Tanguchi A, Kaneko H, Kawamoto M, Sekita C, Nakajima A, Yamanaka H (2015) Arterial Calcification Due to Deficiency of CD73 (ACDC) As One of Rheumatic

- Diseases Associated With Periarticular Calcification. *Journal of Clinical Rheumatology*, 21(4), pp.216–220.
- Jacobson K. (2010) P2X and P2Y Receptors. *Tocris Bioscience Scientific Review Series*, 33, pp.1–15.
- Jones KR, Kang EM (2015) Graft versus host disease : New insights into A_{2A} receptor agonist therapy. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 13, pp.101–105.
- Knight D, Zheng X, Rochini C, Jacobson M, Bai T, Walker B (1997) Adenosine A₃ receptor stimulation inhibits migration of human eosinophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 62(4), pp.465–468.
- Kobie JJ, Shah PR, Yang L, Rebhahn JA, Fowell DJ, Mosmann TR (2006) T Regulatory and Primed Uncommitted CD4 T Cells Express CD73, Which Suppresses Effector CD4 T Cells by Converting 5'-Adenosine Monophosphate to Adenosine. *The Journal of Immunology*, 177(10), pp.6780–6786.
- Konrad R, Busch U (1991) PCR und Real-Time PCR. *Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, Deutschland, pp.35-47.
- Koszalka P, Oezueyaman B, Huo Y, Zerneck A, Floegel U, Braun N, Buchheiser A, Decking UKM, Smith ML, Sevigny J, Gear A, Weber AA, Molojavyi , Ding Z, Weber C, Ley K, Zimmermann H, Gödecke A, Schrader J (2004) Targeted disruption of cd73/ecto-5-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. *Circulation Research*, 95(8), pp.814–821.
- Kruse A, Rink L, Haase H (2015) *Immunologie für Einsteiger*, 2.Aufl., Springer-Spektrum-Verlag, Wiesbaden, Deutschland, pp.179-183.
- Kupiec-Weglinski JW, Busuttil R (2005) Ischemia and Reperfusion Injury in Liver Transplantation. *Transplantation Proceedings*, 37(4), pp.1653–1656.
- Li F, Brooke LF, Matimba A, Krishna RK, Pelleymounter L, Moon I, Ji Y, Jenkins GD, Batzler A, Wang L, Weinshilboum RM (2010) Ecto-5-Nucleotidase and Thiopurine Cellular Circulation: Association with Cytotoxicity. *Drug Metabolism and Disposition*, 38(12), pp.2329–2338.
- LifeTechnologies (2012), ROX Reference Dye, Carlsbad, Kalifornien, USA [Online im Internet] URL: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/rox_referencedye_man.pdf [Stand: 04.April 2016].
- Longhi MS, Robson SC, Bernstein SH, Serra S, Deaglio S (2013) Biological functions of ecto-enzymes in regulating extrazellular adenosine levels in neoplastic and inflammatory disease states. *Journal of Molecular Medicine*, 91(2), pp.165–172.
- Maestrini E, Pagnamenta AT, Lamb JA, Bachelli E, Sykes NH, Sousa I, Toma C, Barby G, Butler H, Winchester L, Scerri TS, Minopoli F, Reichert J, Cai G, Buxbaum JD,

- Korvatska O, Schellenberg GD, Dawson G, de Bildt A, Minderaa RB, Mulder EJ, Morris AP, Bailey AJ, Monaco AP (2010) High-density SNP association study and copy number variation analysis of the AUTS1 and AUTS5 loci implicate the IMMP2L-DOCK4 gene region in autism susceptibility. *Molecular Psychiatry*, 15(9), pp.954–968.
- Mandapathil M, Hildorfer B, Szczepanski MJ, Czystowska M, Szajnik M, Ren J, Lang S, Jackson EK, Gorelik E, Whiteside TL (2010) Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285(10), pp.7176–7186.
- Mazariegos GV, Reyes J, Marino IR, Demetris AJ, Flynn B, Irish W, McMichael J, Starzl TE (1997) Weaning of immunosuppression in liver transplant recipients. *Transplantation*, 63(2), pp.243–9.
- McDonald JH (2009) *Handbook of Biological Statistics*, 2.Aufl., Baltimore, Maryland, USA Sparky House Publishing, pp.118-121.
- Menard S (2002) *Applied Regression Analysis*, 2.Aufl., Vol.106, Beverly Hills, Californien, USA, Sage, pp.75-80.
- Nagatu S (1999) Fas-Ligand induced Apoptosis. *Annual Review of Genetics*, 33, pp.29-55.
- NCBI-Datenbank (2017)a. SNP rs4458647, Bethesda, Maryland, USA [Online im Internet] URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=4458647 [Stand: 29. July 2017].
- NCBI-Datenbank (2017)b. SNP rs6922, Bethesda, Maryland, USA [Online im Internet] URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=6922 [Stand: 29. July 2017].
- NCBI-Datenbank (2017)c. SNP rs9450279, Bethesda, Maryland, USA [Online im Internet] URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=9450279 [Stand: 29. July 2017].
- Nikolova M, Carriere M, Jenabian MA, Limou S, Younas M, Kök A, Hue S, Seddiki N, Hulin A, Delaneau O, Schuitemaker H, Herbeck JT, Mullins JI, Muhtarova M, Benussan A, Zagury JF, Lelievre JD, Levy Y (2011) CD39/Adenosine Pathway Is Involved in AIDS Progression. *PLoS Pathogens*, 7(7), e1002110.
- Odashima M, Bamias G, Rivera-Nieves J, Linden J, Nast CC, Moskaluk CA, Marini M, Sugawara K, Kozaiwa K, Otaka M, Watanabe S, Cominelli F (2005) Activation of A_{2A} adenosine receptor attenuates intestinal inflammation in animal models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 129(1), pp.26–33.
- Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S (2013) Development and Maintenance of Regulatory T cells. *Immunity*, 38(3), pp.414–423.
- Ohta A, Sitkovsky M (2001) Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature*, 414(6866), pp.916–920.

- Ohta A, Kini R, Ohta A, Subramanian M, Madasu M, Sitkovsky M (2012) The development and immunosuppressive functions of CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells are under influence of the adenosine-A_{2A} adenosine receptor pathway. *Frontiers in Immunology*, 3(190), pp.1–12.
- Ohta A, Sitkovsky M (2014) Extracellular adenosine-mediated modulation of regulatory T cells. *Immunology*, 5(304), pp.1–9.
- Pillai AA, Levitsky J (2009) Overview of immunosuppression in liver transplantation. *World Journal of Gastroenterology*, 15(34), pp.4225–4233.
- Prezzemolo T, Guggino G, La Manna MP, Di Liberto D, Dieli F, Caccamo N (2014) Functional Signatures of Human CD4 and CD8 T Cell Responses to Mycobacterium tuberculosis. *Frontiers Immunology*, 5(180), pp.1-40.
- PubChem (2017) Adenosine 2D Structure, Bethesda, Maryland, USA [Online im Internet] URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/adenosine#section=2D-Structure> [Stand: 29.July 2017].
- Quintana A, Pasche M, Junker C, Al-Ansary D, Rieger H, Kummerow C, Nunez L, Villalobos C, Meraner P, Becherer U, Rettig J, Niemeyer BA, Hoth M (2011) Calcium microdomains at the immunological synapse: how ORAI channels, mitochondria and calcium pumps generate local calcium signals for efficient T-cell activation. *The EMBO Journal*, 30(19), pp.3895–3912.
- Roberts V, Stagg J, Dwyer KM (2014) The role of ectonucleotidases CD39 and CD73 and adenosine signaling in solid organ transplantation. *Immunology*, 5(64), pp.1–7.
- Rohrlack C (2007) Logistische und Ordinale Regression. *Methodik der empirischen Forschung*, Aufl.2, Springer Gabler Verlag, Wiesbaden, Deutschland, pp. 199–214.
- Romio MG (2010) Die Rolle der ekto-5'-Nukleotidase (CD73) und des Adenosin A_{2A} Rezeptors bei der Immunmodulation, Medizinische Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Sanchez-Fueyo A, Strom TB (2011) Immunologic basis of graft rejection and tolerance following transplantation of liver or other solid organs. *Gastroenterology*, 140(1), pp.51–64.
- Sapsford KE, Berti L., Medintz IL (2006) Materialien für den resonanten Fluoreszenzenergietransfer (FRET): jenseits klassischer Donor-Acceptor-Kombinationen. *Angewandte Chemie*, 118(28), pp.4676–4704.
- Schlitt A, Reindl I, Ebel H, Buerke M, Werdan K (2011) Kardiale Biomarker in der perioperativen Medizin. *Der Anaesthetist*, 60(8), pp.709–716.
- Shaked A, Ghobrial RM, Merion RM, Shearon TH, Emond JC, Fair JH, Fisher RA, Kulik LM, Pruett TL, Terrault NA (2009) Incidence and severity of acute cellular rejection in recipients undergoing adult living donor or deceased donor liver transplantation.

- American Journal of Transplantation*, 9, pp.301–308.
- Siegmund-Schultze N (2012) Individualisierte Therapieentscheidung: Welche Relevanz haben Biomarker. *Deutsches Ärzteblatt*, 109(10), pp.484-485.
- Stift J, Dienes HP (2014) Leberbiopsie nach Transplantation. *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen*, 12(2), pp.18–25.
- Strecker F (2011) Biomarker- Wegweiser in Diagnostik und Therapie, Baden-Württemberg, Deutschland [Online im Internet] URL: <https://www.gesundheitsindustrie-bw.de/de/fachbeitrag/aktuell/biomarker-wegweiser-in-diagnostik-und-therapie/> [Stand: 07.Mai 2016].
- Sunakawa Y, Volz NB, Zhang W, Yang D, Wakatsuki T, Ning Y, Stintzing S, Stremitzer S, Sebio A, Yamauchi S, Matsusaka S, El-Khoueiry RE, Iqbal S, Barzi A, Azuma M, Watanabe M, Koizumi W, Lenz HJ (2014) Genetic variants in tumor immune checkpoints as prognostic markers in patients (pts) with localized advanced gastric cancer (AGC). *Journal of Clinical Oncology*, 7(1/B7), p.4018
- ThermoFisher (2015)a. rs4458647, Waltham, Massachusetts, USA [Online im Internet] URL: <https://www.thermofisher.com/order/genome-database/browse/genotyping/keyword/rs4458647?ICID=uc-snp-rs4458647&mode=and> [Stand: 27.April 2016].
- ThermoFisher (2015)b. rs6922, Waltham, Massachusetts, USA [Online im Internet] URL: <https://www.thermofisher.com/order/genome-database/browse/genotyping/keyword/rs6922?ICID=uc-snp-rs6922&mode=and> [Stand: 27.April 2016].
- ThermoFisher (2015)c. rs9450279, Waltham, Massachusetts, USA [Online im Internet] URL: <https://www.thermofisher.com/order/genome-database/browse/genotyping/keyword/rs9450279?ICID=uc-snp-rs9450279&mode=and> [Stand: 27.April 2016].
- ThermoFisher (2015)d. PCR Enzymes & Master Mixes, Waltham, Massachusetts, USA [Online im Internet] URL: https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/pcr-enzymes-master-mixes/taq-dna-polymerase-enzymes.html?gclid=CO-BpZjqtcsCFWQq0wodCB0Cvw&s_kwid=AL!3652!3!77674606885!e!!g!!taq-polymerase&ef_id=VmqS9wAAQ9Kt026:20160310094246:s [Stand: 27.April 2016].
- Thomas PE, Klinger R, Furlong LI, Hofmann-Apitius M, Friedrich CM (2011) Challenges in the association of human single nucleotide polymorphism mentions with unique database identifiers. *BMC Bioinformatics*, 12(Suppl 4), p.S4.
- Thompson L (2004) Crucial Role for Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) in Vascular Leakage during Hypoxia. *Journal of Experimental Medicine*, 200(11), pp.1395–1405.
- Trautmann A (2009) Extracellular ATP in the immune system: more than just a “danger

- signal." *Science Signaling*, 2(56), pe6.
- Vaughn BP, Robson SC, Longhi MS (2014) Purinergic signaling in liver disease. *Digestive Diseases*, 32(5), pp.516–524.
- Vazgiourakis VM, Zervou MI, Choulaki C, Bertias G, Melissourgaki M, Yilmaz N, Sidiropulos P, Plant D, Trouw LA, Toes RE, Kardassis D, Yavuz S, Boumpas DT, Goulielmos GN (2011) A common SNP in the CD40 region is associated with systemic lupus erythematosus and correlates with altered CD40 expression: implications for the pathogenesis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70(12), pp.2184–2190.
- Vollmar A, Zündorf I, Dingermann T (2013) *Immunologie-Grundlagen und Wirkstoffe*, 2.Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, München und Frankfurt am Main, Deutschland, pp.34-135.
- Volmer JB, Thompson LF, Blackburn MR (2006) Ecto-5'-Nucleotidase (CD73)-Mediated Adenosine Production Is Tissue Protective in a Model of Bleomycin-Induced Lung Injury. *The Journal of Immunology*, 176(7), pp.4449–4458.
- Wang YC, Wu TJ, Wu TH, Lee CF, Chou HS, Chan KM, Lee WC (2016) The Risk Factors to Predict Acute Rejection in Liver Transplantation. *Transplantation Proceedings*, 44(2), pp.526–528.
- Wen AY, Sakamoto KM, Miller LS (2010) The Role of the Transcription Factor CREB in Immune Function. *The Journal of Immunology*, 185(11), pp.6413–6419.
- Wiesner R, Demetris J, Belle SH, Seaberg EC, Lake JR, Zetterman RK, Everhart J, Detre KM (1998) Acute hepatic allograft rejection: incidence, risk factors, and impact on outcome. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 28(3), pp.638–645.
- Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, Kremers W, Lake J, Howard T, Merion RM, Wolfe RA, Krom R, Colombani PM, Cottingham PC, Dunn SP, Fung JJ, Hanto DW, McDiarmid DV, Rabkin JM, Teperman LW, Turcotte JG, Wegman LR (2003) Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology*, 124(1), pp.91–96.
- Wintersymposium der amerikanischen Gesellschaft für Transplantationsforschung, ASTS, (2003) Immunsuppression erhöht das Krebsrisiko. *Deutsches Ärzteblatt international*, 100(27), A-1890.
- Yoshida O, Dou L, Kimura S, Yokota S, Isse K, Robson SC, Geller DA, Thomson AW (2015) CD39 deficiency in murine liver allografts promotes inflammatory injury and immune-mediated rejection. *Transplant Immunology*, 32(2), pp.76–83.
- Yoshino S, Cilluffo R, Best PJM, Atkinson EJ, Aoki T, Cunningham JM, de Andrade M, Choi BJ, Lerman LO, Lerman A (2014) Single Nucleotide Polymorphisms Associated with Abnormal Coronary Microvascular Function. *Coronary artery disease*, 25(4), pp.281–289.

- Zernecke A, Bidzhekov K, Ozüyaman B, Fraemohs L, Liehn EA, Lüscher-Firzlaff JM, Lüscher B, Schrader B, Schrader J, Weber C (2006) CD73/Ecto-5'-nucleotidase protects against vascular inflammation and neointima formation. *Circulation*, 113(17), pp.2120–2127.
- Zhai Y, Busuttil RW (2011) Liver Ischemia and Reperfusion Injury : New Insights into Mechanisms of Innate — Adaptive Immune-Mediated Tissue Inflammation. *American Journal of Transplantation*, 11, pp.1563–1569.
- Zhang B (2012) CD73 promotes tumor growth and metastasis. *Oncoimmunology*, 1(1), pp.67–70.
- Zhu J, Yamane H, Paul W (2010) Differentiation of effector CD4 T cell Populations. *Annual Review of Immunology*, 28(1), pp.445–489.
- Ziolkowski J, Paczek L, Niewczas M, Senatorski G, Oldakowska-Jedynak U, Wyzgak J, Foroniewicz B, Mucha K, Zegarska J, Nyckowski P, Zieniewicz K, Patowski W, Krawczyk M, Ziarkiewicz-Wroblewska B, Gornicka B (2003) Acute Liver Transplant Rejection : Incidence and the Role of High- Doses Steroids. *Transplantation Proceedings*, 35, pp.2289-2291

11 Danksagung

Nach intensiver Arbeit ist es jetzt an der Zeit, mich bei denjenigen zu bedanken, die mich in dieser herausfordernden, aber auch sehr lohnenden Phase begleitet haben. Zunächst möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Martina Koch für die Überlassung dieses interessanten Themas bedanken. Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Hansjörg Thude, der mir zu jeder Zeit in konstruktiven Gesprächen mit vielen thematischen und wissenschaftlichen Hinweisen zur Verfügung stand. Ohne die kompetente Unterstützung im Labor, insbesondere von Petra Tiede, wäre diese Arbeit nicht entstanden. Danke!

Ebenfalls möchte ich mich bei meiner Mitdotorandin Julia Kappauf für den engen Kontakt und die gegenseitige Unterstützung während der Tage im Labor bedanken.

Ebenso geht mein Dank an meine Freunde und Familie für die liebevolle Unterstützung und Fürsorge. Besonderer Dank an meine Schwester Johanna und an Vincent Sterrenberg. Zudem ein großes Dankeschön an meine Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben. Flo, vielen Dank, dass du mich mit deiner optimistischen Art und Hilfsbereitschaft durch die Promotionszeit begleitet hast.

12 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: