

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik V
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Campus Großhadern

Direktor Prof. Dr. med. Jürgen Behr

Risikostratifizierung und frühzeitige Identifizierung
chronischer Allograftdysfunktion nach
Lungentransplantation

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Johanna Köhler

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. univ. Dr. biol. hom. Nikolaus
Kneidinger

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Claus Neurohr

Dekan: Prof Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2021

	Seite
Inhaltsverzeichnis	I
1. Abstract	1
2. Einleitung	2
2.1. Hintergrund	2
2.2. Grunderkrankungen	3
2.3. Indikation zur Transplantation	5
2.4. Gratwanderung Infektion – Abstoßungsreaktion	6
2.5. Akute vs. chronische Abstoßung	7
2.6. CLAD – BOS – RAS	8
2.7. miRNA – ein möglicher Biomarker zur frühzeitigen Erkennung einer chronischen Abstoßungsreaktion	11
2.8. Fragestellung	13
3. Methodik und Statistik	13
3.1. Studiendesign	13
3.2. Patientenspektrum	14
3.3. Statistische Auswertung	16
3.4. Erhebung von Parametern	17
3.4.1. Lungenfunktionsdiagnostik	17
3.4.2. Bronchoalveoläre Lavage	18
3.4.3. BAL-Aufbereitung	18
3.4.4. Nano-Drop zur Hämolyseabschätzung	18
3.4.5. Evaporierung zur Konzentrierung	20
3.4.6. Isolierung der RNA	20

3.4.7. Reverse Transkription	21
3.4.8. Screening	23
3.4.9. Validierung	25
3.4.10. Auswertung experimenteller Daten	25
4. Ergebnisse	26
4.1. Transplantationen im Zeitraum von 2006 bis 2012	26
4.1.1. Transplantationsart – SLTX/DLTX	26
4.2. CLAD	27
4.3. Überleben des Gesamtkollektivs	28
4.4. Diagnosen	31
4.4.1. Cystische Fibrose/COPD und α 1-Antitrypsinmangel	32
4.4.2. Cystische Fibrose/Interstitielle Lungenerkrankung	32
4.4.3. Cystische Fibrose/Andere seltene Erkrankungen	32
4.5. Geschlecht	33
4.6. Alter zum Zeitpunkt der Transplantation	34
4.7. Neutrophilie	36
4.8. Azithromycin	36
4.9. Ischämiezeit	37
4.10. Multivariate Analysen	39
4.10.1. CMV Empfänger vs. CMV Spender	39
4.10.2. Größe Empfänger vs. Größe Spender	42
4.10.3. Alter Empfänger vs. Alter Spender	44
4.10.4. Ischämiezeit vs. Spenderdaten	46
4.11. Ergebnisse Screening und Validierung miRNA	49

5. Diskussion	50
6. Zusammenfassung	60
7. Anhang	IV
7.1. Abkürzungsverzeichnis	IV
7.2. Abbildungsverzeichnis	VI
7.3. Tabellenverzeichnis	VII
8. Literaturverzeichnis	VIII
9. Eidesstaatliche Versicherung	XV

1. Abstract

Viele Lungenerkrankungen bieten als letzte Therapieoption die Transplantation. Trotz moderner Standards ist das Überleben nach Transplantation vergleichsweise schlecht. Eine chronische Abstoßung (CLAD) betrifft 45-50 % der transplantierten Patienten innerhalb von 5 Jahren und macht mehr als 30 % der späten Mortalität aus. Eine Früherkennung ist derzeit nicht möglich. Die Therapieoptionen, sobald eine chronische Abstoßung eintritt, sind eingeschränkt. Diese Arbeit analysiert das Patientenspektrum der von 2006 bis 2012 an der LMU München transplantierten Patienten und untersucht miRNA als möglichen Biomarker für ein frühzeitiges Erkennen einer chronischen Abstoßungsreaktion. MiRNA bietet ein hohes Potenzial als Biomarker aufgrund seiner guten Extrahierbarkeit und Stabilität.

Die Auswertung der Überlebenszeiten erfolgte nach dem Modell der Cox-Regression, das häufigste Modell der multivariaten Analyse von Überlebenszeiten. Von den 288 untersuchten Patienten entwickelten 19,7% eine CLAD, 39% der beobachteten Patienten sind verstorben. Bei 18,6% der verstorbenen Patienten war eine CLAD festgestellt worden. Es wurde der Einfluss mehrerer Variablen auf die Entwicklung einer CLAD untersucht. Es ergab sich eine Tendenz zur Signifikanz hinsichtlich des Alters; mit steigendem Lebensjahr des Empfängers erhöhte sich das Risiko zur Entwicklung einer CLAD um 1%. Eine Tendenz zur Signifikanz wies zudem das Spenderalter zum Zeitpunkt der Transplantation auf. Pro Jahr erhöhte sich das Risiko um 2%. Das Auftreten einer Neutrophilie in der BAL 1 Jahr nach Transplantation war mit einem statistisch signifikanten Anstieg des Risikos der Entwicklung einer CLAD von 68% assoziiert. Bei positivem CMV-Status des Spenders verdoppelte sich das Risiko einer Abstoßungsreaktion. Die weiteren Variablen zeigten keinen statistisch signifikanten Einfluss.

Zur Untersuchung der miRNA wurde die extrahierte Flüssigkeit mit zellulärem Anteil, die 1 Jahr nach Transplantation im Rahmen der bronchoalveolären Lavage (BAL) gewonnen wurde, untersucht. Der Nachweis erfolgte mittels PCR. In der Fallgruppe befanden sich 22 Patienten mit spirometrisch nachgewiesener CLAD, in der Kontrollgruppe 20 Patienten mit unauffälliger Spirometrie. Im Screening auf 96 miRNAs ergab sich ein signifikanter Anstieg für 11 miRNAs bei CLAD-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Validierung ließ sich kein signifikanter Unterschied nachweisen. Unter Auswertung weiterer Studien wurde dies untersucht. Verunreinigung durch Hämolyse, eine geringe Menge an miRNA in der BAL oder Instabilität der miRNA durch wiederholtes Einfrieren im Aufbewahrungsprozess könnten die Validität von miRNA beeinflussen. MiRNA ließ sich somit nicht als Biomarker zur Früherkennung einer chronischen Abstoßungsreaktion verifizieren.

2. Einleitung

2.1. Hintergrund

Mit 60-70 Transplantationen pro Jahr ist das Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München eines der größten Lungentransplantationszentren weltweit. Es bietet die modernsten Optionen der postoperativen Versorgung und immunsuppressiven Therapie. Dennoch ist das Überleben im Vergleich zu anderen soliden Organtransplantationen vergleichsweise schlecht. Nach Angaben der International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT) überleben 79 % der Patienten im ersten Jahr, 71 % nach 3 Jahren, 53 % nach 5 Jahren und lediglich

31 % nach 10 Jahren; zum Vergleich ist die 5-Jahres-Überlebensrate nach Herztransplantationen mit 72 % deutlich besser¹.

Die chronische Allograftdysfunktion ist der wichtigste Einflussfaktor auf das postoperative Überleben. Die Diagnose erfolgt aktuell aufgrund regelmäßiger Kontrollen der Lungenfunktion, die im Fall einer chronischen Abstoßung mit deren irreversiblen Abfall einhergeht. Eine frühe Diagnose sowie die Identifizierung spezifischer Risikofaktoren könnten die Effektivität vorhandener Therapieoptionen positiv beeinflussen.

2.2. Grunderkrankungen²

Die Cystische Fibrose (CF) ist die häufigste angeborene Stoffwechselkrankheit in West- und Mitteleuropa. Allein in Deutschland leben etwa 6000-8000 Patienten mit CF. Neben Beschwerden des Pankreas führen der fibrotische Umbau des Lungengewebes zu Symptomen wie chronischem Husten, rezidivierende Pneumonien und Bronchitiden sowie im Verlauf zu respiratorischer Insuffizienz und Cor pulmonale. Die initiale Therapie umfasst neben Bronchialpflege und antibiotischer Therapie der Infekte auch O₂-Langzeittherapien bei Hypoxämie.

Eine weitere Ursache für die Entwicklung eines Lungenemphysems ist die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease, COPD), die in 90 % der Fälle auf aktiven oder ehemaligen Nikotinkonsum zurückzuführen ist und bei ca. 10 % der Erwachsenen in Deutschland auftritt. Weltweit stellt sie die vierthäufigste Todesursache dar. Die chronische Obstruktion ist auf eine

¹ Benden C, Edwards LB, Kucheryavaya AY et al. The registry of the international society for heart and lung transplantation: sixteenth official pediatric lung and heartlung transplantation report-2013; focus theme: age. J Heart Lung Transplant 2013; 32: 989-97.

² Duale Reihe, Innere Medizin, Thieme, 3. Auflage, S. 370-374, 375, 378-379, 401-403

Hypertrophie der Bronchialschleimhaut als Reaktion auf den kontinuierlichen Noxeneinfluss und eine Hypersekretion zurückzuführen. Die verminderte mukoziliäre Clearance führt zur Metaplasie und in Zusammenhang mit einer Vagusaktivierung zur bronchialen Obstruktion. Neben Beschwerden wie Husten und Auswurf tritt Dyspnoe unter Belastung sowie in fortgeschrittenen Stadien auch in Ruhe auf. Therapeutisch hat insbesondere ein Rauchstopp zu erfolgen sowie gemäß den Global Obstructive Lung Disease (GOLD) - Stadien eine medikamentöse Therapie. Durch Zuhilfenahme der Atemhilfsmuskulatur bei unwiderruflicher Progredienz der Erkrankung wird im Verlauf unter anderem aufgrund der Ermüdung der Atempumpe eine Sauerstofflangzeit- und unter Umständen eine Beatmungstherapie erforderlich.

Eine weitere häufige Grunderkrankung stellt der α 1-Antitrypsinmangel dar. Der Mangel an α 1-Antitrypsin, einem Proteaseinhibitor, führt insbesondere bei jungen Erwachsenen im Alter zwischen 25 und 40 Jahren zur Ausbildung eines Lungenemphysems. Belastungsdyspnoe im Frühstadium sowie eingeschränkte körperliche Aktivität, Zyanose und Zeichen der Rechtsherzdekompensation im Spätstadium sind die Folge. Eine frühestmögliche Diagnose ermöglicht die Einleitung einer Substitutionstherapie, welche mit einer Verbesserung der Prognose einhergeht.

Auch interstitielle Lungenerkrankungen (ILD) können als letzte Option eine LuTX notwendig machen. Unter den mehr als 300 Erkrankungen, die unter dem Begriff ILD zusammengefasst werden, sind die wichtigsten Sarkoidose, Idiopathische Lungenfibrose, Extrinsische Allergische Alveolitis, Pneumokoniose und Medikamenten-induzierte interstitielle Lungenerkrankung. Häufig sind weitere Organsysteme betroffen. Nur in ca. 33% der Fälle der ILD lässt sich eine mögliche Erkrankungsursache feststellen. Die 5-Jahres-Überlebensraten variieren zwischen

20% bei Idiopathischer Lungenfibrose und fast 100% bei der Kryptogen organisierenden Pneumonie (COP). Ist die Äthiologie bekannt, ist der erste Therapieansatz die Prävention und Vermeidung der Exposition. Bei unbekannter Äthiologie besteht die Therapie vordergründig aus antiinflammatorischer und antifibrotischer Medikation. Trotz Behandlung ist aufgrund des zumeist progredienten Verlaufs eine Transplantation notwendig.^{3 4 5 6}

2.3. Indikation zur Transplantation⁷

Die Indikation zu einer Lungentransplantation (LuTX) besteht prinzipiell bei allen nicht-malignen und nicht-infektiösen Lungenkrankheiten mit

- schwer eingeschränkter Lebensqualität infolge respiratorischer Insuffizienz (NYHA III)
- natürlicher 2-Jahresüberlebensrate ohne LuTX < 50 % und ausgeschöpfter konservativer Therapie
- Alter bis 65 Jahre (abhängig vom biologischem Alter und den Komorbiditäten).

Die häufigsten Indikationen zur LuTX sind

- Interstitielle Lungenerkrankungen (45,2%),
- COPD und alpha-1-Antitrypsin-Mangel (26,6%) und
- Cystische Fibrose (15,2 %) (s. 3.4.).

³ American Thoracic Society, European Respiratory Society. ATS/ERS International Consensus Statement. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnostic and treatment. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161: 646-664

⁴ Du Bois RM, Riceldi L, eds. Interstitial Lung Diseases. Eur Respir Monogr 2009; 46.

⁵ Travis WD, King TE, Bateman ED, et al. ATS-ERS international multidisciplinary consensus classification of idiopathic interstitial pneumonias. General principles and recommendations. Am J Respir Crit Care Med 2002; 165: 277-304

⁶ Wells AU, Hirani N. Interstitial lung diseases guideline: the British Thoracic Society in collaboration with the Thoracic Society of Australia and New Zealand and the Irish Thoracic Society. Thorax 2008; 63: Suppl. V, v1-v58

⁷ <http://www.lutx.de/wp-content/uploads/2014/03/Lungentransplantation-Herz140107-end-mit-Tabellen-und-Abbildungen.pdf>

Da aufgrund von Infektionen und Langzeitbeatmung möglicher Spender nur bei etwa 20 % - nach Erweiterung der Spenderkriterien bei etwa 40 % - der Multiorganspender in Deutschland eine Lungentnahme durchgeführt werden kann, ist das Organangebot begrenzt. Derzeit erhalten etwa 50 % der Patienten auf der Warteliste ein Spenderorgan. Zur Ermittlung der Rangfolge wird in Deutschland seit dem 10.12.2011 und auf internationaler Ebene in allen Eurotransplant-Ländern der Lung Allocation Score ermittelt. Dieser basiert auf einem Netto-Nutzen-Prinzip, das die medizinische Dringlichkeit und die Erfolgswahrscheinlichkeit abwägt. Hieraus ergibt sich die jeweilige Priorität. Es fließen als Parameter insbesondere die forcierte Vitalkapazität (FVC), die 6-Minuten-Gehstrecke, die Sauerstoffflussrate für eine ausreichende Oxygenierung und der funktionelle Status des Patienten ein.⁸

2.4. Gratwanderung Infektion – Abstoßungsreaktion

Aktuelle Regime beinhalten die Gaben von Kalzineurininhibitoren (Cyclosporin A oder Tacrolimus), Kortikosteroide, Mycophenolat-Mofetil oder Azathioprin.⁹ Ein nierenschonendes Vorgehen wäre ein Schema mit m-TOR-Inhibitoren. Ziel ist jedoch immer eine individualisierte Immunsuppression. Aufgrund der immunsuppressiven Therapie treten gehäuft Infektionen auf. Der häufigste virale Erreger ist das Cytomegalievirus (CMV). Selbst mit einer prophylaktischen antiviralen Therapie kommt es in einem Drittel der Patienten im ersten Jahr entweder zu einer Neuinfektion oder zu einer Reaktivierung.¹⁰ Eine indirekte Erhöhung der Rate an akuten Abstoßungen und der Entwicklung des Bronchiolitis-Obliterans-Syndroms

⁸ R. Speich, A. Boehler, A. Spiliopoulos, W. Weder, L.P. Nicod. Indikation zur Lungentransplantation bei fortgeschrittener zystischer Fibrose. Schweiz Med Wochenschr 2000;130:1352-60

⁹ M. Kamler and N. Pizanis. Aktueller Stand der Lungentransplantation. Pulmonale und nicht pulmonale Komplikationen. Z Herz Thorax Gefasschir. 2013; 27(6): 383–390.

¹⁰ <http://www.lutx.de/wp-content/uploads/2014/03/Lungentransplantation-Herz140107-end-mit-Tabellen-und-Abbildungen.pdf>

(BOS) wurde beschrieben.¹¹ Eine Prophylaxe mit Valganciclovir wird nach Leitlinien (für 6 Monate bei seropositivem Spender und seronegativem Empfänger, ansonsten für 3 Monate) empfohlen.¹² Weitere Probleme der Nachsorge stellen bakterielle Infektionen, Pilzinfektionen und Atemwegskomplikationen dar. Nach LuTX sind die Symptome und Befunde häufig unspezifisch, die Unterscheidung einer Abstoßungsreaktion von einer Infektion ist aufgrund der Klinik oft nicht möglich, sodass zu deren Diagnosestellung transbronchiale Lungenbiopsien notwendig sind.

2.5. Akute vs. chronische Abstoßung

In Bezug auf das 1-Jahres-Überleben schwanken die Angaben in der Literatur zwischen 80 und 90%. Dank verbesserter operativer Technik, besserem perioperativem Management, systematischer Prophylaxe häufiger Infektionen, verbesserter immunsuppressiver Therapie und nicht zuletzt dank regelmäßiger histologischer Untersuchungen wurde die 1-Jahres-Mortalität deutlich gesenkt.¹³

Bei den Formen der akuten Abstoßung sind die zelluläre, T-lymphozytär vermittelte Reaktion auf HLA-Antigene des Transplantats mit unspezifischen Symptomen wie Dyspnoe und Husten, und die akute antikörpervermittelte Abstoßung mit konsekutiver Entwicklung einer chronischen Abstoßungsreaktion zu unterscheiden. Die akute zelluläre Abstoßung wird histopathologisch nach der Klassifikation der Lung Rejection Study Group (LRSG) der International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT) eingeteilt (A = akute zelluläre vaskuläre Abstoßung, B =

¹¹ Snydman DR, Limaye AP, Potena L, Zamora MR. Update and review: state-of-the-art management of cytomegalovirus infection and disease following thoracic organ transplantation. *Transplant Proc* 2011; 43: S1-S17.

¹² Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM et al. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation* 2010; 89: 779-95.

¹³ A. Gaspert, A. Boehler, W. Weder, R. Speich, P. Vogt. Spezielle Probleme nach Lungentransplantation: eine Gratwanderung zwischen Infektion und Abstoßungsreaktion. *Schweiz Med Wochenschr* 2000;130:944-51

akute zelluläre Atemwegsabstoßung der kleinen Atemwege). Die humorale Abstoßung wird bestimmt durch donorspezifische anti-HLA-Antikörper (DSA), Komplementablagerungen in der Biopsie, histologische kapilläre Inflammation und Gewebeerstörung sowie klinische Hinweise auf Allograftdysfunktion. Nach der Transplantation können sich neue DSA- und non-DSA-anti-HLA-Antikörper bilden. DSA treten in 12-56 % der Organempfänger auf und gehen mit erhöhter Inzidenz an akuter Abstoßung, erhöhter BOS-Rate und schlechterer Überlebensrate einher.¹⁴

Nachgewiesene Risikofaktoren für die Entwicklung einer BOS sind gehäufte akute Abstoßungsreaktionen und eine persistierende Abstoßungsreaktion nach Therapie¹⁵, als weitere begünstigende Faktoren werden Infekte, insbesondere verursacht durch CMV, diskutiert. Bis zum 6. Monat nach LuTX spielen als Komplikation akute Abstoßungsreaktionen und Infekte die größte Rolle.

2.6. CLAD – BOS – RAS

Unter chronischer Allograftdysfunktion (chronic lung allograft dysfunction, CLAD) werden verschiedene Phänotypen der chronischen Abstoßung zusammengefasst. Eine weitere Klassifikation ist die Einteilung in Neutrophile reversible Allograftdysfunktion (NRAD), Bronchiolitis obliterans Syndrom (BOS) und Restriktives Allograftsyndrom (RAS). Eine chronische Abstoßung betrifft 45-50 % der lungentransplantierten Patienten innerhalb von 5 Jahren und macht mehr als 30 % der späten Mortalität aus.¹⁶ Die Risikofaktoren umfassen HLA-Mismatch, akute Abstoßungsreaktionen, Empfängeralter, CMV-Status, virale Atemwegsinfekte,

¹⁴ <http://www.lutx.de/wp-content/uploads/2014/03/Lungentransplantation-Herz140107-end-mit-Tabellen-und-Abbildungen.pdf>

¹⁵ Scott J.P., Higenbottam T.W., Clelland C.A., Stewart S., Smyth R.L., McGoldrick J.P., et al: Natural history of chronic rejection in heart-lung transplant recipients. J Heart Transplant 1990;9:510-5

¹⁶ Nicod LP. Mechanisms of airway obliteration after lung transplantation. Proc Am Thorac Soc 2006; 3: 444.

Pseudomonaskolonisation, lymphozytäre Bronchiolitis, gastrooesophageale Refluxerkrankung, Luftverschmutzung und Ischämierereperfusionsschäden.¹⁷

Die Neutrophilie in der BAL 3 und 12 Monate nach LuTX kann als prognostischer Marker gesehen werden und ist bedeutsam für die Entwicklung einer BOS. Teilweise zeigte die Gabe von Azithromycin bei Patienten mit BOS und initialer Neutrophilie eine günstige Entwicklung in Bezug auf CLAD und FEV₁.¹⁸

Aktuell erfolgt die Einteilung einer chronischen Abstoßung vornehmlich gemäß der BOS: diese repräsentiert den Abfall der FEV₁ auf weniger als 80 % des besten postoperativen Ausgangswertes.¹⁹ Histopathologische Grundlage ist ein inflammatorisch-fibrosierender Prozess der kleinen Atemwege mit subepithelialer Fibrose und intermittierender Stenosierung oder Okklusion des Lumens. Aufgrund ihrer geringen Sensitivität (28 %) und Spezifität (75 %) ist ein pathologischer Nachweis der BOS mittels transbronchialer Biopsie schwierig. Daher erfolgt eine klinische Einteilung (s. Abb. 1).²⁰ Der Verlauf kann sowohl chronisch progredient über mehrere Jahre als auch abrupt innerhalb von Wochen sein. Studien zeigten, dass insbesondere bei einem früh auftretenden, sehr schnell verlaufenden BOS die Überlebensrate schlecht ist.²¹ Bei anderen Patienten verläuft die BOS Progression eher langsam, Superinfektionen sind dagegen häufig und es zeigen sich

¹⁷ Suwara MI, Vanaudenaerde BM, Verleden SE, et al. Mechanistic differences between phenotypes of chronic lung allograft dysfunction after lung transplantation. *Transplant International*. (2014) 857-867

¹⁸ Vos R, Vanaudenaerde BM, Verleden SE et al. A randomised controlled trial of azithromycin to prevent chronic rejection after lung transplantation. *Eur Respir J* 2011; 37: 164-72

¹⁹ Christie JD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dobbels F, Kirk R, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-Eighth Adult Lung and Heart-Lung Transplant Report-2011. *J Heart Lung Transplant* 2011;30(10):1104-22

²⁰ Kramer MR, SToehr C, Wang JL, et al. The diagnosis of obliterative bronchiolitis after heart-lung and lung transplantation: low yield of transbronchial biopsies. *J Heart Lung Transplant* 1993;12: 713

²¹ Finlen Copeland CA, Snyder LD, Zaas DW et al. Survival after bronchiolitis obliterans syndrome among bilateral lung transplant recipients. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182: 784-9.

Kolonisationen der Atemwege mit *Pseudomonas aeruginosa* und *Aspergillus fumigatus*.²² Die Therapieoptionen für BOS sind relativ eingeschränkt, vorherrschendes Ziel ist die Stabilisierung des FEV₁.

Das RAS ist gekennzeichnet durch einen FEV₁-Abfall um 20 % sowie ein restriktives Lungenfunktionsmuster mit einem Abfall der Totalen Lungenkapazität (TLC) um mindestens 10 %. Es tritt in 25-30 % der Patienten mit CLAD auf. Computertomographisch zeigen sich deutlich mehr Milchglastrübung, Fibrose in den Oberlappen und Honigwabenbildung. Eine standardisierte Therapie existiert derzeit nicht, einzige gesicherte Therapieoption ist die Re-LuTX. Diese Form tritt in der Regel sehr rasch auf, zeigt sich therapieresistent und ist unvermeidbar mit einer hohen Mortalität verbunden.²³

Die Behandlungsoptionen der CLAD sind sowohl begrenzt als auch bisher schwer einschätzbar. Sie beinhalten Immunmodulation mit oralen Makroliden (Azithromycin, s.o.), Leukotrienrezeptorantagonisten (Montelukast) und extrakorporale Photopherese.²⁴

Die Langzeitresultate werden heute vor allem noch durch eine chronische Abstoßungsreaktion in Form der BOS beeinträchtigt.^{25 26} Problematisch bei der

²² Verleden GM, Vos R, De Vleeschauer SI, et al. Obliterive bronchiolitis following lung transplantation: from old to new concepts? European Society for Organ Transplantation. J Transplant International 2009; 22:771-779

²³ Sato M, Waddel TK, Wagnetz U, Roberts HC, Hwang DM, Haroon A, et al. Restrictive allograft syndrome (RAS): a novel form of chronic lung allograft dysfunction. J Heart Lung Transplant 2011;30(7):735-42

²⁴ Clajus C, Blasi F, Welte T, Greer M, Fuehner T, Mantero M. Therapeutic approach to respiratory infections in lung transplantation. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics 2014.07.003

²⁵ Boehler A., Speich R., Russi E.W., Weder W. Lung transplantation for lymphangioleiomyomatosis. N Engl J Med 1996;335:1275-80

²⁶ Heng D., Sharples L.D., McNail K., Stewart S., Wreghitt T., Wallwork J. Bronchiolitis obliterans syndrome: incidence, natural history, prognosis factors. J Heart Lung Transplant 1998;17:1255-63

Diagnosestellung sind unter anderem der zumeist schleichende Symptombeginn und bei fortgeschrittener Abstoßung geringe therapeutische Möglichkeiten.²⁷ Dies gibt Anlass zur Überlegung, ob mittels eines Biomarkers frühzeitig eine chronische Abstoßung festgestellt werden kann.

BOS	FEV ₁ (% des Basiswertes)
0	FEV ₁ > 90 %
Mögliche BOS	FEV ₁ 81 – 90 %
1	FEV ₁ 66 – 80 %
2	FEV ₁ 51 – 65 %
3	FEV ₁ < 50 %

Tab. 1: BOS Klassifikation, in Prozent des besten postoperativen Wertes²⁸

2.7. miRNA – ein möglicher Biomarker zur frühzeitigen Erkennung einer chronischen Abstoßungsreaktion?

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine, regulierende, nicht-kodierende RNAs, die in einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielen. Unter anderem regulieren sie die Entwicklung und Funktion des Immunsystems. MiRNAs können ohne weiteres aus Gewebe und Körperflüssigkeiten isoliert werden. Ihr Expressionsmuster reflektiert die Pathophysiologie des Gewebes und nachgewiesenermaßen spezifische Erkrankungsphasen. Zudem sind miRNA stabiler als mRNA und daher weniger anfällig in der Probenaufarbeitung. Zusammengefasst haben sie großes Potenzial als Biomarker.²⁹ Bisher wurden mehr als 1000 menschliche miRNAs identifiziert (miRBase, www.mirbase.org).

²⁷ Verleden et al. Obliterative bronchiolitis following lung transplantation: from old to new concepts? European Society of Organ Transplantation 22 (2009) 771-779

²⁸ Estenne M, Maurer JR, Boehler A, et al. Bronchitis obliterans syndrome 2001: an update of the diagnostic criteria. J Heart Lung Transplant 2002; 21: 297

²⁹ Gallo A, Tandon M, Alevizos I, Illei GG. The majority of MicroRNA detectable in serum und saliva is concentrated in exosomes. PLoS ONE 7(3)_e30679. Doi:10.1371/journal.pone.0030679

Unter den spezifischsten Expressionsmustern sind das der miR-122 in der Leber, der miR-375 im Gewebe der Pankreasinseln, miR-142 und miR-223 in der Hämatopoese sowie miR-1 und miR-133 im Muskel. Der Nutzen von einigen gewebespezifischen miRNAs zur Identifizierung des Ursprungsgewebes von wenig differenzierten Metastasen eines Tumors unbekanntes Ursprungs konnte in einer Proof-of-concept-Analyse nachgewiesen werden. Auch ihre Rolle als Onkogene (miR-21 beim Glioblastom), als Induktoren von kardialer Hypertrophie bei Herzinsuffizienz (miR-208) und Genmodulatoren für Zellproliferation, Apoptose und Immunsignale in viralen Erkrankungen wie dem Epstein-Barr-Virus wurden beschrieben.³⁰

In einer Studie von Zhang et al. fanden die Autoren 364 dysregulierte Gene bei lungentransplantierten Patienten im Vergleich zu gesunden. Der Vergleich mit Expressionsmustern von potenziell regulierender miRNA legte die Vermutung nahe, dass die Dysregulation einiger der mit LuTX in Zusammenhang stehender Gene auf die Dysregulation der jeweils regulierenden miRNA zurückzuführen sei. Einen Zusammenhang mit BOS konnten die Autoren nicht finden. Dies führten sie auf die geringe Anzahl der in die Studie eingeschlossenen Patienten von n = 18 zurück.³¹

Weithin ist bekannt, dass BOS durch eine von neutrophilen Granulozyten bestimmte Entzündung der Atemwege bestimmt wird und mit einem Anstieg von IL-8 in den Atemwegen einhergeht. In der Publikation von DiGiovine et al. wurde gezeigt, dass Patienten mit einer vermuteten chronischen Abstoßung nach LuTX signifikant

³⁰ Boyd SD, et al. Everything you wanted to know about small RNA but were afraid to ask. *Laboratory Investigation* 2008; 88:569-578

³¹ Zhang W, Zhou T, Ma S-F, Machado RF, Bhorade SM, Garcia JGN. MicroRNAs implicated in dysregulation of gene expression following human lung transplantation. *Transl Respir Med*. 2013; 1(1): doi:10.1186/2213-0802-1-12

erhöhte Neutrophilenwerte und IL-8 Spiegel in der BAL aufwiesen verglichen mit stabilen Patienten.³²

2.8. Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Kollektivs aus Patienten, die im Zeitraum vom 01.01.2006 bis 31.12.2012 am Klinikum Großhadern der LMU München lungentransplantiert wurden und die Beantwortung folgender Fragestellungen:

- Welchen Einfluss haben Faktoren wie Alter, Geschlecht, Größe, Neutrophilie in der BAL, Stammdaten und Beatmungsdauer des Spenders, Ischämiezeit zwischen Ex- und Implantation, die Gabe von Azithromycin, CMV-Status und akute Abstoßungsreaktionen auf die Entwicklung einer chronischen Abstoßung?
- Ist die Etablierung von miRNA als Biomarker für die Diagnose einer chronischen Abstoßung sinnvoll?

3. Methodik und Statistik

3.1. Studiendesign

Es wurden retrospektiv die Daten von 372 lungentransplantierten Patienten, die im Zeitraum vom 01.01.2006 bis 31.12.2012 am Klinikum der Universität München – Campus Großhadern transplantiert wurden, erhoben. Es flossen die bis zum 15.11.2013 erhobenen Daten in diese Auswertung ein.

³² DiGiovine B, Lynch III JP, Martinez FJ, et al. Bronchoalveolar lavage neutrophilia is associated with obliterative bronchiolitis after lung transplantation. J Immunol 1996; 157: 4194

Die Datenerfassung erfolgte hinsichtlich Patientenstammdaten (Geschlecht, Alter, Größe, Diagnose), Transplantationsdatum, Transplantationsverfahren, Eintreten einer chronischen Abstoßung anhand klinischer Parameter (Best FEV₁ nach Transplantation, CLAD, RAS, BOS, Neutrophilie), Behandlungsform nach LuTX (Azithromycin), Spenderdaten (Ischämiezeit, Alter, Geschlecht, Größe, Beatmungsdauer), Eintreten einer akuten Abstoßung (ISHLT A/B), CMV-Status von Spender und Empfänger, letztem Kontakt, Überleben nach LuTX sowie Todeszeitpunkt.

Die Daten wurden aus der Transplantationsdatenbank der Medizinischen Klinik und Poliklinik V, Arztbriefen, der elektronischen Patientenakte LAMP, dem Computerprogramm der klinischen Chemie des Universitätsklinikums und aus Akten des ärztlichen Zentralarchivs am Klinikum Großhadern gesammelt. Die Durchführung des experimentellen Ansatzes erfolgte am Comprehensive Pneumology Center – CPC, Großhadern.

Das Follow-up nach LuTX erfolgt alle drei Monate, wobei eine Anamnese, eine Lungenfunktion, Laborwerte und ein EKG bei jedem Patienten erhoben werden.

3.2. Patientenspektrum

Im Zeitraum vom 2006 bis 2012 wurden 372 Patienten am Klinikum der LMU transplantiert. Davon gehen 288 in die Auswertung ein. Bei 84 Patienten lag ein unvollständiger Datensatz vor, weshalb diese nicht berücksichtigt werden konnten.

Die Diagnosekodierung erfolgt zum einen nach Maßgabe der am häufigsten zugrundeliegenden Erkrankungen. Diese sind die CF, COPD inkl. Alpha-1-Antitrypsinmangel und die Idiopathische Lungenfibrose. In das Patientenkollektiv gehen 24 Patienten ein, die mit der Diagnose „Andere“ kodiert wurden. Diese

umfassen Pulmonale Arterielle Hypertonie, Bronchiektasen, Lymphangiomeiomyomatose, Sarkoidose, Systemische Sklerose und einzelne seltene Lungenerkrankungen. Die größte Subgruppe ist die Pulmonale Arterielle Hypertonie. Sie umfasst insgesamt 15 Patienten.

Zudem werden Re-LuTX erfasst. Bei 9 Patienten wurde im Beobachtungszeitraum eine Re-LuTX vorgenommen. Für diese Arbeit wurden nur die Daten vor und nach der Re-LuTX erfasst.

In dieser Arbeit soll das Überleben der lungentransplantierten Patienten mit der Entwicklung einer chronischen Abstoßung einerseits, und transplantierten Patienten ohne Abstoßung andererseits verglichen werden. Während des Beobachtungszeitraums sind 113 Patienten aus 288 ausgewerteten Fällen verstorben. Bezüglich der Auswertung ergibt sich hier jedoch eine Problematik. Unter den verstorbenen Patienten sind solche, die das Transplantat während des Beobachtungszeitraums abstießen, solche, die bis zu ihrem Tod zu keinem Zeitpunkt eine CLAD entwickelten und Patienten, die aus der Beobachtung ausschieden. Grund für das Ausscheiden waren Weiterbehandlung in einem anderen Zentrum oder fehlende Rückmeldung. Bei der zweitgenannten Patientengruppe, also den ohne Entwicklung einer CLAD Verstorbenen, bleibt offen, ob sich zum Todeszeitpunkt eine CLAD bereits entwickelt hat, jedoch noch nicht festgestellt wurde, oder sie jemals eine CLAD entwickelt hätten. Diese Fälle werden daher im Rahmen der Auswertung hinsichtlich CLAD zensiert.

Zur Quantifizierung von miRNA in der BAL, die ein Jahr nach Transplantation gewonnen wurde, wurden 22 Patienten, bei den spirometrisch eine BOS

nachgewiesen wurde, und 20 Patienten mit unauffälliger Spirometrie als Kontrollgruppe herangezogen. Mittels Nano-Drop konnte eine Hämolyseabschätzung und damit eine Abschätzung des Grades der „Verunreinigung“ der Probe mit erythrozytärer miRNA erfolgen. Aus beiden Gruppen wurden jeweils 6 Patienten, damit insgesamt $n = 12$, mit den besten Nano-Drop-Werten als Screeningpatienten berücksichtigt.

3.3. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software IBM SPSS Statistics, Version 24 für Windows und der Software R 3.4.1.

Zur Berechnung der Überlebenszeiten wurde das Modell der Cox-Regression angewendet. Es ist das am häufigsten genutzte Modell der multivariaten Analyse von Überlebenszeiten. Der Einfluss zugrundeliegender unabhängiger Variablen auf die Dauer bis zum Eintreten von Ereignissen (sog. Time-to-Event) wird hierbei eingeschätzt. Die Wahrscheinlichkeit des Eintretens des Endpunktes (in dieser Auswertung der Tod) ist die Hazard. Die Hazard Ratio (HR, $\text{Beta}(t)$) ist hierbei das Verhältnis der Gefährdungsraten zueinander. Eine HR von 1 gibt eine gleich hohe Gefährdung, eine HR von 2 eine doppelt so hohe Gefährdung an etc. Die statistische Signifikanz einer HR wird mittels Konfidenzintervall und p-Wert festgestellt. Bei Werten von $p < 0,05$ wurde eine Signifikanz angenommen.

Die Variablen sind nominal skaliert. Eine Ausnahme bildet die Variable *Ischämiezeit*, die eine metrische Skalierung aufweist. Zur Ermittlung der Korrelation zweier nominal skalierten Variablen wird nach dem oben beschriebenen Verfahren vorgegangen. Im Gegensatz dazu wird zur Ermittlung einer Korrelation einer nominal skalierten

Variable (hier z.B. *CLAD*) und einer metrisch skalierten Variable (z.B. *Ischämiezeit*) der Eta-Wert herangezogen. Aus diesem lässt sich ein Einfluss der Ischämiezeit auf die CLAD feststellen. Eine Aussage über die Signifikanz ist noch nicht möglich. Hierfür wird mittels ANOVA die einfaktorielle Varianzanalyse vorgenommen.

Die Überlebenswahrscheinlichkeiten wurden aus den Überlebenstabellen von SPSS und R-Studio übernommen.

3.4. Erhebung von Parametern

3.4.1. Lungenfunktionsdiagnostik

Die Lungenfunktionsprüfung umfasst die Spirometrie, die Ganzkörperplethysmographie und die Messung des Transferfaktors für Kohlenmonoxid. Erhobene Parameter sind unter anderem die Vitalkapazität, das Atemzugvolumen, Reservevolumina, die forcierte Vital- und forcierte expiratorische Einsekundenkapazität (FEV1).

Zur Ermittlung des Schweregrades insbesondere restriktiver Lungenerkrankungen muss die Ganzkörperplethysmographie herangezogen werden, die zudem Aufschluss über die funktionelle Residualkapazität, das Residualvolumen und die Totalkapazität gibt. Gemessen wird hier in einem geschlossenen System.

Für diese Arbeit war bei der Datenerhebung insbesondere das FEV1 von Bedeutung aufgrund ihres Stellenwertes zur Klassifikation der BOS (s. 1.6.).

Für das Monitoring des postoperativen Verlaufs erfolgen regelmäßige Lungenfunktionstests, in der Regel ca. alle 3 Monate. Zusätzlich finden im ersten

Jahr nach 3, 6 und 12 Monaten Bronchoskopien mit BAL und transbronchialen Biopsien statt. Im Anschluss werden bei unauffälligem Verlauf diese Untersuchungen gemäß subjektivem Wohlbefinden und Grafftfunction durchgeführt.

3.4.2. Bronchoalveoläre Lavage

Zur Verlaufskontrolle nach LuTX ist die Bronchoskopie die Standardmethode. Mit Hilfe eines Bronchoskops können bei dem sedierten Patienten Trachea und Bronchien dargestellt werden. Zusätzlich ist eine Lavage möglich, wobei i.d.R. eine 100ml NaCl-Lösung über das Bronchoskop eingespült und wieder abgesaugt wird. Dabei werden ebenso Zellen extrahiert, die Aufschluss über Entzündung und möglicherweise ein beginnendes Abstoßungsgeschehen geben. Die Zelldifferenzierung ist hierbei entscheidend.

Die extrahierte Flüssigkeit mit zellulärem Anteil dient im weiteren Verlauf der Testung auf miRNA.

3.4.3. BAL-Aufbereitung

Nach der Bronchoskopie wurden die BAL-Proben zunächst über sterile Gaze filtriert. Anschließend wurden sie bei 4°C/300g zentrifugiert, um die Zellen zu gewinnen. Nachdem der Überstand nochmals bei 3200g zentrifugiert wurde, wurde dieser aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

3.4.4. Nano-Drop zur Hämolyseabschätzung

Da es bei der Bronchoskopie ungewollt zu Läsionen des Epithels kommen kann, treten vereinzelt Erythrozyten in den BALs auf. Die Erythrozyten enthalten gehäuft

miRNA, sodass es bei hämolysierten Blutzellen zu einer falsch hohen miRNA-Konzentration kommen kann.

Mit Hilfe des Nano-Drop 1000 Version 3.8.1 kann der Grad der Verunreinigung mit hämolysierten Zellen festgestellt werden. Zunächst muss das Gerät mit Milli-Q-Water geeicht werden, um möglichst exakte, einheitliche Messwerte zu erhalten. Die Hämolyse kann bestimmt werden, wenn das Photometer bei einer Wellenlänge von 415nm die Absorption misst. Da bisher für BALs noch keine signifikanten Daten bestehen, wurde der ideale Wert empirisch anhand der Messdaten festgelegt.

Die Schlussfolgerung daraus war, je niedriger der Absorptionswert desto geringer verunreinigt stellt sich die Probe dar und desto verlässlicher handelt es sich um freie miRNA.

In den ersten Durchläufen der qPCR zeigte sich, dass sowohl in der Versuchs- als auch in der Kontrollgruppe keine einheitlichen Ergebnisse erzielt werden konnten. Mit Hilfe des Nano-Drops kann nicht nur der Hämolysegrad abgeschätzt werden, sondern auch der Anteil an RNA. Bei einer Wellenlänge von 230nm wurden sowohl die Proben der BAL als auch die der isolierten RNA gemessen, um den tatsächlichen RNA-Gehalt abschätzen zu können. Ausgangstheorie war, dass die Konzentration der RNA nach der Isolierung viermal so hoch sein würde wie in der BAL. Allerdings ergab die Messung sehr variable Ergebnisse, was darauf zurückzuführen sein kann, dass das totale RNA-Volumen sehr gering ist, was zu Messungenauigkeit führen würde.

3.4.5. Evaporierung zur Konzentrierung

Da die ersten Probendurchgänge eine große Variabilität der CT-Werte ergeben hatten, wurde im weiteren Verlauf ein zusätzlicher Schritt, die Evaporierung der BAL-Proben, hinzugefügt. Ziel war, durch Verdunstung der flüssigen Bestandteile eine höhere Konzentration an miRNA in der Probe zu erhalten, sodass in der qPCR niedrigere CT-Werte erzielt werden konnten. Dadurch würden weniger Proben wegen verminderter Verwertbarkeit aussortiert werden müssen.

Es wurde eine Konzentration von ca. 210µl angestrebt, da für die nachfolgende RNA-Isolation ein Ausgangsvolumen von 200µl notwendig ist. Eine einmalige RNA-Isolation sollte genügen, da dadurch die Konzentration an miRNA im gewonnenen Isolat möglichst groß wäre.

Es wurde der Eppendorf Concentrator plus verwendet. Im Modus V-AQ mit 1400 rpm war eine Durchlaufzeit von ca. 3h notwendig, um das gewünschte Volumen von ca. 210µl zu erhalten. Die Rotationsgeschwindigkeit war nicht variierbar, sodass die Zeiten in Abhängigkeit vom Ausgangsvolumen in der BAL stark variierten.

3.4.6. Isolierung der RNA

Mit Hilfe des miRCURY RNA Isolation Kit (Exiqon) wurde die RNA aus der BAL nach Protokoll des Herstellers isoliert. 300µl BAL-Flüssigkeit wurde mit Lysis Solution versetzt, um sämtliche Zellwände zu degradieren. Nachdem mittels Protein Precipitation Solution die Proteine denaturiert wurden, konnte ein proteinfreier Überstand durch 3 min Zentrifugation bei 11000 x g gewonnen werden. Durch Isopropanol konnten sämtliche Salze entfernt werden und RNA zur Aggregation gebracht werden. Durch einen Filter (microRNA Mini Spin Column BF) war es möglich die RNA aus dem Überstand herauszulösen. Durch Ionenbindungen wird ausschließlich RNA im Filter gebunden und restliche Proteine können ausgewaschen

werden. Dazu wurde abwechselnd Washing Solution beigemischt und zwischendurch das Tube bei 11000 x g zentrifugiert. Endprodukt war RNA gelöst in 50µl Nuklease freiem Wasser.

Da im Quality Check festzustellen war, dass die Proben in ihren CT-Werten deutlich variieren, wurde, um niedrigere CT-Werte zu erhalten und dadurch mehr Proben in den vom Hersteller garantierten messbaren Bereich aufzunehmen, statt 200µl in diesem Fall 300µl Flüssigkeit aus der BAL entnommen. Dadurch sollte der CT-Wert um 0,5 niedriger ausfallen.

Sofern die Proben nicht direkt weiterverarbeitet wurden, wurden sie nach Herstellerangaben kurzfristig bei -20°C und langfristig bei -80°C eingefroren.

3.4.7. Reverse Transkription

Mittels des miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR Protokolls (Exiqon) wurde durch reverse Transkription die RNA in cDNA umgeschrieben. Hierfür werden abgesehen von isolierter RNA auch 5x Reaction buffer, Spike-in, Nuklease freies Wasser und Enzym benötigt. Indem die Reagenzien vor Zugabe der RNA zusammengeführt und vermischt wurden, wurden Ungleichheiten in den Volumina in den einzelnen Proben vermieden.

Die Zugabe von Spike-in ist notwendig für die Qualitätskontrolle der RNA-Isolierung, der cDNA-Synthese und der PCR. Bei Isolierung der RNA kann es zu Verunreinigungen kommen und dazu führen, dass cDNA-Synthese oder PCR inhibiert werden. Die Spike-in RNA dient somit als Positivkontrolle. Fällt die PCR-Messung des Spike-ins negativ ist, deutet das darauf hin, dass Verunreinigungen die vorangegangenen Schritte beeinträchtigt haben oder dass nicht erwünschte Nukleasen

die RNA degradiert haben. In diesem Fall wurde der UniSp6 RNA spike-in verwendet, nachdem dieser mit Nuklease freiem Wasser verdünnt wurde.

Zunächst wurde ein 15µl/3-Ansatz (3µl RNA in 12µl Reagenzienmix) verwendet. Durch eine Inhibitortestung (Verwendung von 1,5µl, 3µl bzw. 6µl RNA) hat sich ergeben, dass bei einem 15µl/6-Ansatz der negative Einfluss von Inhibitoren der reversen Transkription soweit durch erhöhten RNA-Gehalt ausgeglichen werden kann, dass die CT-Werte um bis zu einen Wert niedriger waren. Um somit die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass trotz niedrigem RNA-Gehalt in der BAL die Werte in den vom Hersteller garantierten messbaren Bereich fallen, wurde im weiteren Verlauf ausschließlich der 15µl/6-Ansatz verwendet.

Somit konnten nach reverser Transkription mit Hilfe des Mastercyclers 15 µl cDNA erlangt werden. In diesem Schritt wird der Mix zunächst 60 min bei 42°C inkubiert, sodass die reverse Transkriptase den Doppelstrang synthetisieren kann. Daraufhin wird über 5 min bei einer Temperatur von 95°C das Enzym inaktiviert und dann die Probe auf 4°C heruntergekühlt.

Des Weiteren wurden zwei Kontrollproben je Lauf erstellt. Einer Probe wurde anstelle des Enzyms die entsprechende Menge an Nuklease freiem Wasser zugeführt. Dies dient der Kontrolle, dass die Probe frei von DNA ist. Ohne Enzym sollte keine Doppelstrangsynthese stattfinden, somit in der PCR keine Amplifikation möglich sein. Dies entspricht einer Kontrolle der zuvor stattgefundenen RNA-Isolation. Der zweiten Probe wurde kein Template zugeführt. Somit kann kontrolliert werden, ob die verwendeten Reagenzien frei von Nukleinsäuren sind.

n = X

Reagent	MM Vol. for 1 reaction	Vol. for 1 reaction +15 %	Vol. for X reactions +15%
5x Reaction buffer	10,00	11,5	11,5 x X
Spike-in	2,50	2,88	2,88 x X
H ₂ O	12,50	14,38	14,38 x X
Enzyme Mix	5,00	5,75	5,75 x X
Total	30,00	34,50	34,50 x X

+ 20 µl RNA

Tab 2: Schema für Reverse Transkription

3.4.8. Screening

Als PCR-Ansatz dienen 23 µl cDNA, 552 µl RNase-free Water und 575 µl Cybr Green Mastermix, die in einer lo-bind 2,0 ml Tube zusammengefügt werden.

Zur Primer-Testung dienen zwei Screening Panels mit insgesamt 96 Wells, jeweils einem Primer entsprechend. Für jedes Panel wird ein PCR-Ansatz vorbereitet.

n = X

Reagent	MM Vol. for 1 reaction	Vol. for 1 reaction +15 %	Vol. for X reactions +15 %
2x Universal PCR Master Mix	5,00	5,75	5,75 x X
Primer Mix	1,00	1,15	1,15 x X
Total	6,00	6,90	6,90 x X

+ 4 µl RT product (diluted 1:40)

Tab 3: Schema für Screening

Für das Screening herangezogen wurden n = 12 Proben, jeweils 6 aus der Kontroll- und der CLAD-Gruppe. Diese wurden nach oben ausgeführtem Procedere aus n = 49 Proben ausgewählt, die im Rahmen der 1-Jahres-BAL unter optimalen

Bedingungen gewonnen wurden. Zugrundeliegende Kriterien hierfür waren weibliches Geschlecht und Alter der Jahrgänge 1956 – 1986, da bei älteren Patienten die Recovery der BAL und damit der zelluläre Anteil geringer werden. Vordergründig wurde ein geringer Hämolysegrad berücksichtigt (s. Nano-Drop).

Mittels Zentrifugation werden die randständige cDNA und am Plattenboden befindlicher Primermix zusammengeführt.

Der PCR Master Mix enthält Fluoreszenzmoleküle (SYBR® Green), die an DNA-Doppelstränge binden. Die Fluoreszenz korreliert daher mit der Anzahl an doppelsträngiger DNA. Ab einer Amplifikation von 35 (entspricht CT-Wert = 35) können Messergebnisse nicht mehr berücksichtigt werden, da die Reliabilität aufgrund von Störgrößen sinkt. In der Regel werden ab 20 Amplifikationen Ergebnisse erzielt. Als Threshold wird der Fluoreszenzanstieg bezeichnet, ab dem dieser signifikant ist. Aufgrund verschiedenster RNA in den Proben ist ein „Grundrauschen“ zu erwarten. Daher gilt es, primerabhängige Thresholds zu berücksichtigen (z.B. miR 451 -> 23 Amplifikationen). Nach Beendigung der PCR wird die Probe nochmals durchgehend erhitzt, wobei permanent die Fluoreszenz gemessen wird. Dies dient der Sicherstellung, dass bei jeder Probe bei gleicher Temperatur kein Fluoreszenzanstieg mehr gemessen wird, da die cDNA nun als Einzelstränge vorliegen. Die Temperatur ist abhängig von der Bindungsstärke zwischen den Einzelsträngen. Sollte die Temperatur in einigen Proben abweichen, ist die Interferenz der verschiedenen Primer nicht ausgeschlossen. Die bei diesem Vorgang entstehende Kurve nennt sich Schmelzkurve („melting curve“).

Aufgrund von geringen Abweichungen werden pro Probe und Primer je drei Messungen durchgeführt. Daraus lässt sich der Mittelwert berechnen.

3.4.9. Validierung

Im Rahmen der Validierung erfolgt die Reverse Transkription und PCR nach oben beschriebenem Schema. Jede Probe aus $n = 49$ wird nun in je drei Wells mit signifikanten Primern versetzt. Positivkontrollen mit spike-in sowie Negativkontrollen mit „no template“- und Reverse Transkriptase-freier Probe werden ebenfalls berücksichtigt.

3.4.10. Auswertung experimenteller Daten

Zur Ermittlung signifikanter miRNA wird davon ausgegangen, dass mindestens 3 CT-Werte pro miRNA pro Probe bei $n = 12$ vorliegen. Bei 96 zugrundeliegenden miRNAs werden aus allen miRNAs Ratios gebildet.

$$\text{Ratio} = RQA / RQB$$

$$\Rightarrow RQX = 2^{-CtX}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-CtA} / 2^{-CtB}$$

$$\Rightarrow \text{Ratio} = 2^{(CtB - CtA)}$$

Zur Identifikation der signifikanten miRNA erfolgte die Normalisierung der CT-Werte aller Primer einer Probe durch Bildung eines geometrischen Mittels:

$$GM_{\bar{y}} = \sqrt[n]{y_1 y_2 y_3 \dots y_n}$$

Liegt das Verhältnis des CT-Werts zum geometrischen Mittel bei >1 , dann ist die miRNA überexprimiert. Liegt das Verhältnis bei <1 , ist die miRNA unterexprimiert.

4. Ergebnisse

4.1. Transplantationen im Zeitraum von 2006 bis 2012

In den Jahren von 2006 bis 2012 wurden statistisch verwertbar 288 Transplantationen an den Standorten Großhadern der Universitätsklinik der Ludwig-Maximilians-Universität durchgeführt.

4.1.1. Transplantationsart – SLTX/DLTX

Darunter erhielten 84 Patienten eine Einzellungentransplantation (single lung transplantation, SLTX) und 204 Patienten eine Doppellungentransplantation (double lung transplantation, DLTX).

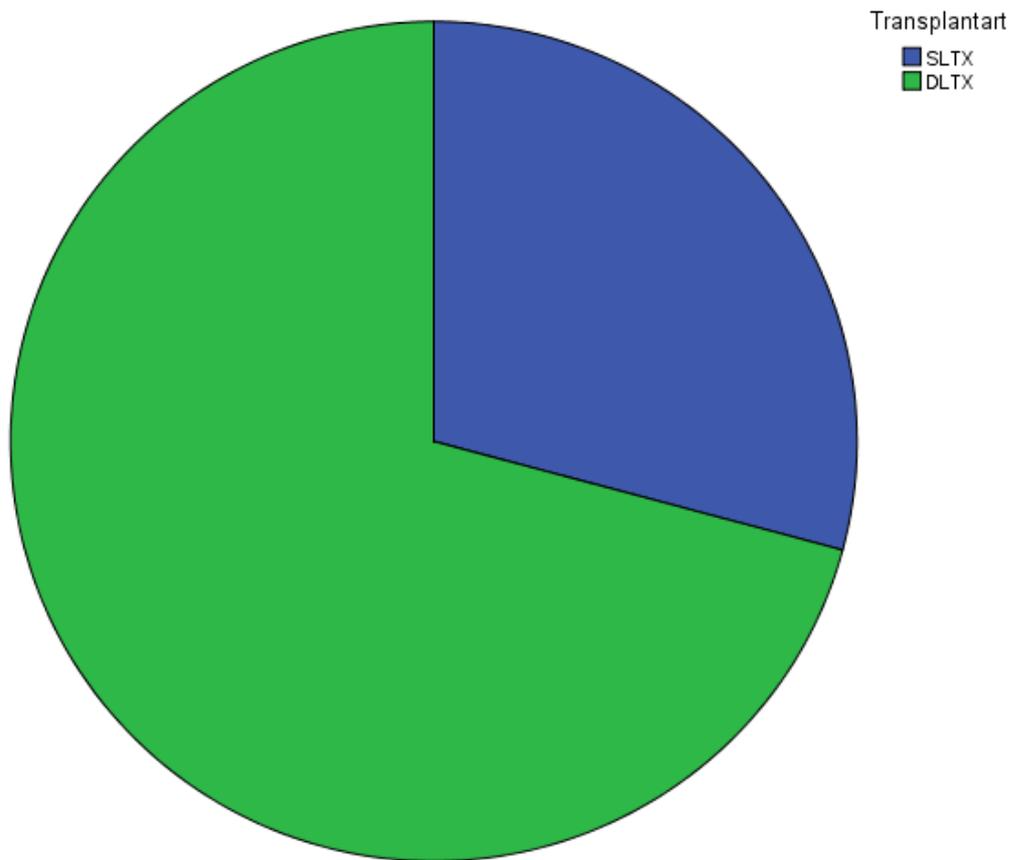


Abb 1: Verteilung Transplantationsart

Für das Risiko der Entwicklung einer chronischen Abstoßungsreaktion nach DLTX ergibt sich ein p-Wert von 0,28 bei einer HR von 0,74. Das 95%-Konfidenzintervall liegt bei 0,43 – 1,28. Eine DLTX würde im Vergleich zur SLTX somit eine Reduktion der der Wahrscheinlichkeit einer CLAD um den Faktor 0,74, also 26% bedeuten, muss aufgrund des p-Wertes $> 0,05$ jedoch als nicht statistisch signifikant abgelehnt werden.

4.2. CLAD

Von 288 Patienten des Gesamtkollektivs entwickelten 57 Patienten, also 19,7%, eine CLAD.

		Häufigkeit	Prozent
Gültig	nein	231	79,7
	ja	57	19,7
	Gesamt	288	99,3
Fehlend	System	2	,7
Gesamt		290	100,0

Tab 4: Häufigkeit Auftreten CLAD

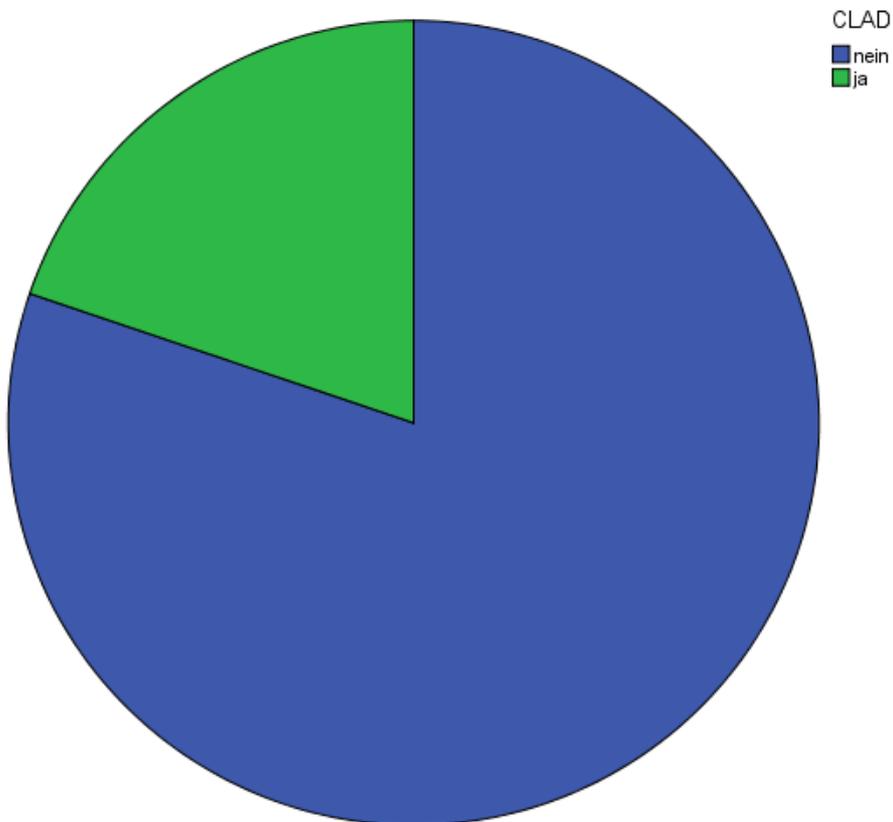


Abb 2: Verteilung Auftreten CLAD ja/nein

4.3. Überleben des Gesamtkollektivs

Von den 288 Patienten des Gesamtkollektivs sind im Zeitraum der Beobachtung 113 Patienten, also 39%, verstorben.

		Häufigkeit	Prozent
Gültig	nein	175	60,3
	ja	113	39,0
	Gesamt	288	99,3
Fehlend	System	2	,7
Gesamt		290	100,0

Tab 5: Häufigkeit Ereignis Tod

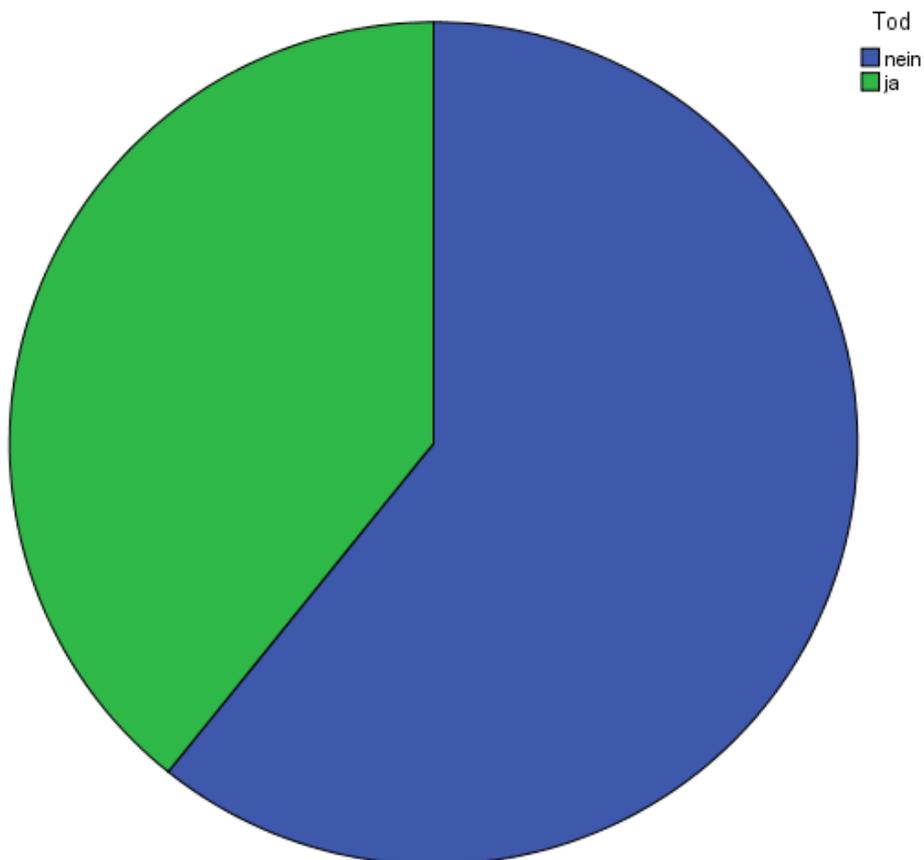


Abb 3: Verteilung Häufigkeit Tod ja/nein

In 21 Fällen dieser verstorbenen Patienten, also 18,6%, war die Entwicklung einer CLAD beobachtet worden. Das heißt, 81,4% der verstorbenen Patienten zeigten keine Hinweise für eine chronische Abstoßung.

		Häufigkeit	Prozent
Gültig	nein	92	81,4
	ja	21	18,6
	Gesamt	113	100,0

Tab 6: Häufigkeit CLAD unter verstorbenen Patienten

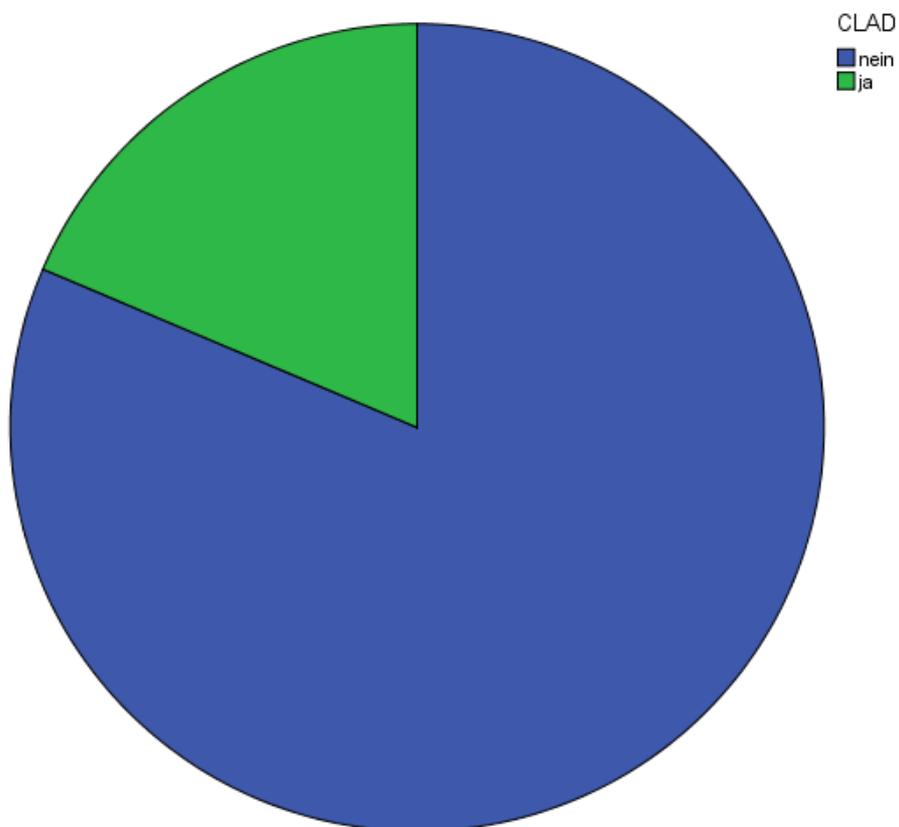


Abb 4: Verteilung Häufigkeit CLAD unter verstorbenen Patienten

4.4. Diagnosen

		Häufigkeit	Prozent
Gültig	CF	44	15,2
	COPD + alpha-Mangel	77	26,6
	ILD	131	45,2
	Re-TX	9	3,1
	Andere	24	8,3
	Gesamt	285	98,3
Fehlend	System	5	1,7
Gesamt		290	100,0

Tab 7: Häufigkeit der Diagnosen

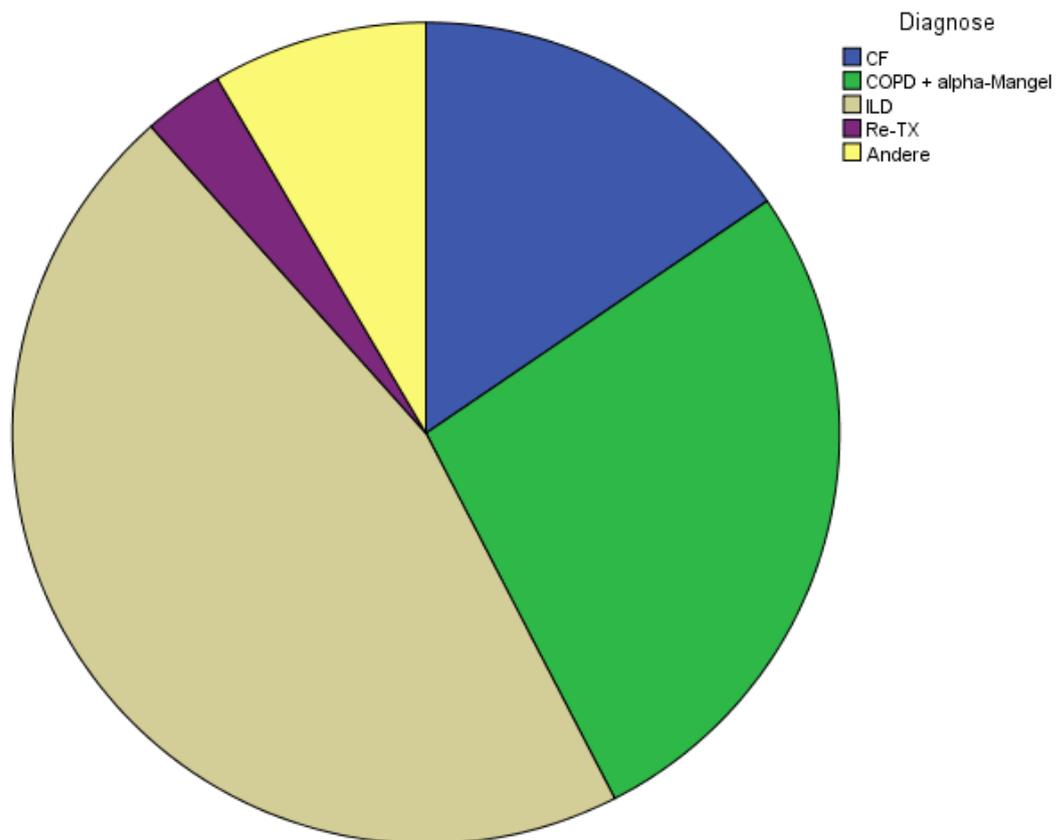


Abb 5: Verteilung Diagnosen

Unter den Patienten fanden sich 44 Patienten (15,2% des Gesamtkollektivs) mit der Diagnose CF, 77 (26,6% des Gesamtkollektivs) mit COPD und α 1-Antitrypsinmangel, 131 (45,2% des Gesamtkollektivs) mit Idiopathischer Lungenerkrankung und 24 (8,3% des Gesamtkollektivs) mit anderen Erkrankungen. 9 Patienten (3,1% des Gesamtkollektivs) erhielten eine Re-LuTX.

4.4.1. Vergleich Cystische Fibrose/COPD und α 1-Antitrypsinmangel

COPD und α 1-Antitrypsin-mangel sind statistisch nicht signifikant mit einem vermehrten Auftreten von CLAD assoziiert. Die statistische Analyse ergibt einen p-Wert von 0,50 bei einer HR von 1,32. Das 95%-Konfidenzintervall liegt bei 0,60 – 2,91.

4.4.2. Vergleich Cystische Fibrose/Interstitielle Lungenerkrankung

Es ergibt sich eine Reduktion der Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer CLAD bei Diagnose ILD im Vergleich zu CF um 27%. Die statistische Analyse ergibt einen p-Wert von 0,44 bei einer HR von 0,73. Das 95%-Konfidenzintervall liegt bei 0,33 – 1,62. Das Ergebnis ist nicht signifikant.

4.4.3. Vergleich Cystische Fibrose/Andere seltene Lungenerkrankungen

Im Vergleich zur CF ergibt sich für andere seltene Lungenerkrankungen bezüglich des Auftretens einer CLAD ein höheres Risiko, jedoch ohne statistische Signifikanz. Die statistische Analyse ergibt einen p-Wert von 0,12 bei einer HR von 2,27. Das 95%-Konfidenzintervall liegt bei 0,80 – 6,41.

4.5. Geschlecht

In das Kollektiv wurden 146 männliche und 142 weibliche Patienten aufgenommen.

Die Häufigkeit einer Transplantation ist damit unter den Geschlechtern nahezu identisch.

		Häufigkeit	Prozent
Gültig	männlich	27	47,4
	weiblich	30	52,6
	Gesamt	57	100,0

Tab 8: Häufigkeit Geschlecht männlich/weiblich

Insgesamt entwickeln 27 Männer und 30 Frauen im Lauf der Beobachtung eine CLAD.

male					female				
time	n.risk	n.event	survival	std.err	time	n.risk	n.event	survival	std.err
0	146	0	1.000	0.00000	0	142	0	1.000	0.0000
5	127	1	0.992	0.00784	5	126	0	1.000	0.0000
10	113	2	0.975	0.01411	10	119	2	0.984	0.0115
15	94	4	0.938	0.02275	15	107	4	0.949	0.0203
20	81	3	0.905	0.02871	20	88	5	0.901	0.0286
25	63	2	0.881	0.03290	25	75	3	0.866	0.0338
30	52	4	0.818	0.04286	30	59	3	0.824	0.0398
35	40	4	0.747	0.05189	35	49	2	0.794	0.0437
40	36	1	0.726	0.05444	40	43	1	0.777	0.0461
45	33	2	0.684	0.05903	45	37	2	0.739	0.0510
50	29	0	0.684	0.05903	50	32	1	0.716	0.0544
55	27	0	0.684	0.05903	55	29	0	0.716	0.0544
60	24	1	0.655	0.06307	60	21	1	0.683	0.0609
65	18	0	0.655	0.06307	65	17	1	0.649	0.0667
70	15	1	0.617	0.07015	70	9	2	0.535	0.0916
75	9	0	0.617	0.07015	75	6	1	0.469	0.1017
80	7	0	0.617	0.07015	80	3	1	0.351	0.1269
85	4	1	0.493	0.12376	85	2	0	0.351	0.1269
90	1	0	0.493	0.12376	90	1	0	0.351	0.1269
95	1	0	0.493	0.12376	95	1	0	0.351	0.1269

Tab 9: Risikoentwicklung Eintreten Ereignis CLAD in Abhängigkeit vom Geschlecht pro Monat

Die Tabelle postuliert, dass zum Zeitpunkt 0 = Transplantation die Wahrscheinlichkeit einer CLAD bei 0% liegt. Bereits nach 5 Monaten erhöht sich bei Männern die Wahrscheinlichkeit der CLAD auf 0,8%, bei Frauen beträgt die Wahrscheinlichkeit zu diesem Zeitpunkt weiterhin 0%. Erst nach 10 Monaten steigt die Wahrscheinlichkeit einer CLAD auf 1,2%.

Für die Variable Geschlecht ergibt sich ein p-Wert von 0,69 mit einer HR von 1,12. Das 95%-Konfidenzintervall liegt bei 0,66 – 1,89. Das Geschlecht ist damit nicht mit dem Auftreten einer CLAD assoziiert.

4.6. Alter zum Zeitpunkt der Transplantation

Das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Transplantation liegt bei 48,8 Jahren mit einer Standardabweichung von 12,73. Das Minimum liegt bei 9, das Maximum bei 67 Jahren.

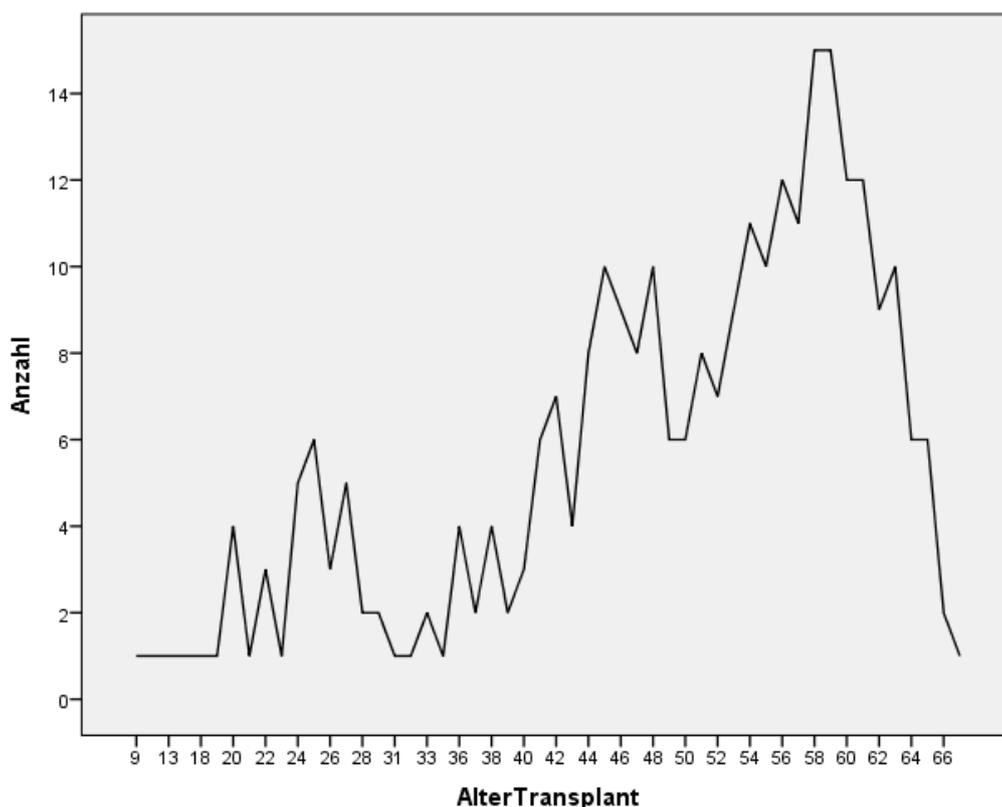


Abb 6: Verteilung Alter bei Transplantation

Der p-Wert liegt bei 0,58 mit einer HR von 1,01. Das 95%-Konfidenzintervall liegt bei 0,98 – 1,03. Damit ergibt sich keine Signifikanz. Da das Konfidenzintervall 1 einschließt, würde sich nur eine geringe Tendenz zur Signifikanz ergeben. Das bedeutet, pro Jahr höheren Lebensalters zum Zeitpunkt der Transplantation erhöht sich die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer CLAD um $HR = 1,01$, also 1%.

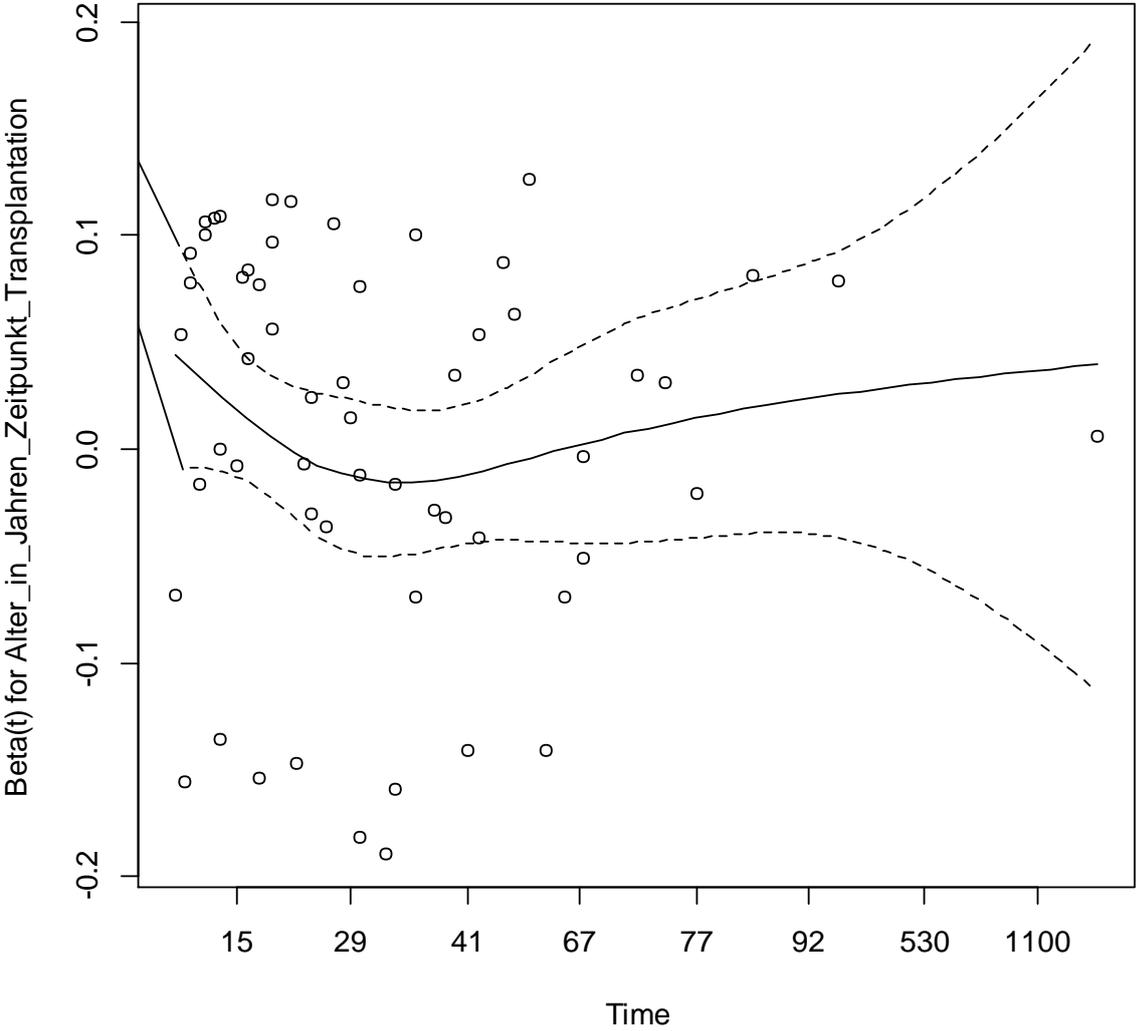


Abb 7: Verteilung der Hazard Ratio über die Zeit in Monaten (x) bezüglich des Alters zum Zeitpunkt der Transplantation (y)

4.7. Neutrophilie in der BAL

		Häufigkeit	Prozent
Gültig	nein	209	72,1
	ja	79	27,2
	Gesamt	288	99,3
Fehlend	System	2	,7
Gesamt		290	100,0

Tab 10: Neutrophilie

Bei 79 Patienten, also 27,2% des Gesamtkollektivs, zeigte sich in der BAL, die ein Jahr nach dem Zeitpunkt der Transplantation durchgeführt wurde, eine Neutrophilie. Von diesen 79 Patienten entwickelten 29, damit 36,7%, eine CLAD.

Der Nachweis einer Neutrophilie innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation war statistisch signifikant mit dem Auftreten einer CLAD assoziiert. Die Cox-Regression ergibt einen p-Wert von 0,055 bei einer HR von 1,68 (KI 0,99 – 2,84). Gemessen an p-Wert und HR kann bei grenzwertiger Signifikanz davon ausgegangen werden, dass das Vorhandensein einer Neutrophilie in der BAL das Risiko einer Abstoßung um 68% steigert.

4.8. Azithromycin

		Häufigkeit	Prozent
Gültig	Nein	147	50,7
	Ja	121	41,7
	Gesamt	268	92,4
Fehlend	System	22	7,6
Gesamt		290	100,0

Tab 11: Azithromycin

Es zeigt sich, dass 121 von 268 Patienten (41,7% des Gesamtkollektivs) mit Azithromycin behandelt wurden. 20 Fälle konnten aufgrund fehlender Information nicht berücksichtigt werden und wurden daher zensiert. Von diesen 121 Patienten entwickelten 46, also 38%, eine CLAD.

		Azithromycin		Gesamt
		nein	ja	
CLAD	nein	136	75	211
	ja	11	46	57
Gesamt		147	121	268

Tab 12: Kreuztabelle Azithromycin/CLAD

4.9. Ischämiezeit

Bei 11 Patienten (3,8% des Gesamtkollektivs) lagen zur Ischämiezeit keine Angaben vor. Die durchschnittliche Ischämiezeit betrug 481,97 Stunden mit einer Standardabweichung von 149,12 Stunden, einem Minimum von 103 Stunden und einem Maximum von 951 Stunden.

			Wert
Nominal-	bzgl. Eta	CLAD abhängig	,823
Intervallmaß		Ischämiezeit abhängig	max. ,085

Tab 13: Eta als Richtungsmaß für Ischämiezeit

	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	42895,504	1	42895,504	2,016	,157
Innerhalb der Gruppen	5849900,265	275	21272,365		
Gesamt	5892795,769	276			

Tab 14: Einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA für Ischämiezeit

Zur Ermittlung einer Korrelation der nominal skalierten CLAD und der metrisch skalierten Ischämiezeit wird das in 2.3. beschriebene Verfahren des Eta-Werts und der ANOVA-Analyse durchgeführt. Da das Signifikanzniveau über 5% liegt, kann nicht von einem signifikanten Zusammenhang beider Werte ausgegangen werden.

Die Cox-Regression ergibt einen p-Wert von 0,63 bei einer HR von 1. Das 95%-Konfidenzintervall liegt bei 0,998 – 1,002. Dies bestätigt, dass nicht von einem Zusammenhang ausgegangen werden kann.

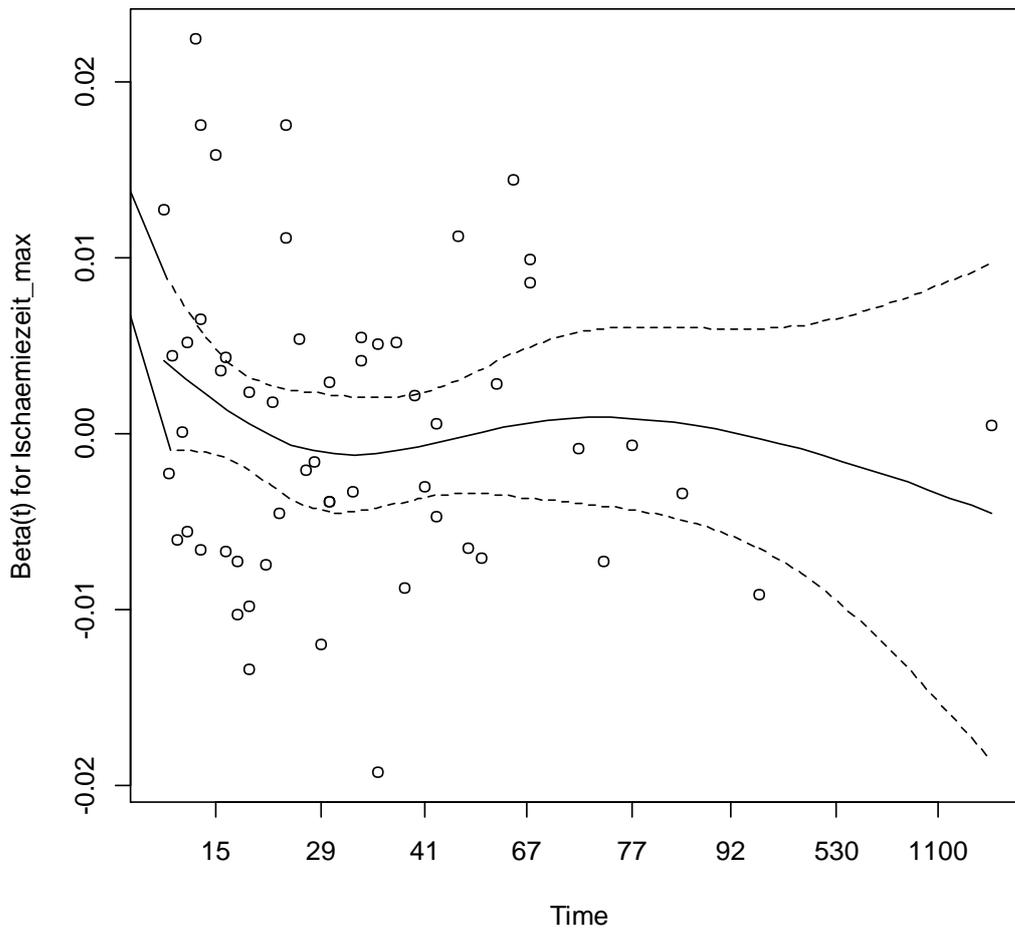


Abb 8: Verteilung der Hazard Ratio über die Zeit in Monaten (x) bezüglich der Ischämiezeit (y)

4.10. Multivariate Analyse

4.10.1. CMV Empfänger vs. CMV Spender

	p-Wert	HR	lower .95	upper .95
CMV Empfänger	0.1909	1.500	0.8168	2.756
CMV Spender	0.0891	1.764	0.9169	3.394
Likelihood ratio test		p=0.09067		
Wald test		p=0.1005		
Score (logrank) test		p=0.09546		

Tab 15: Cox-Regression für CMV Empfänger und CMV Spender

In Bezug auf CMV Status von Spender und Empfänger konnten n= 196 Fälle (68,1%) berücksichtigt werden. 92 Fälle (31,9%) mussten wegen fehlender Information zensiert werden.

Die p-Werte von Likelihood, Wald und Score Test liegen bei $> 0,05$ und zeigen damit keine Signifikanz des Testmodells. Da der p-Wert des CMV Status des Spenders näher an das Signifikanzniveau heranreicht als der des Empfängers, liegt ein negativer Einfluss ($HR > 1$) eines positiven CMV Status beim Organspender auf das Auftreten einer Abstoßung im Vergleich näher. Beide p-Werte tendieren zur Signifikanz. Bei einem 95%-Konfidenzintervall von 0,92 – 3,40 würde ein positiver CMV Status des Spenders das Risiko einer Abstoßung um 76,4% erhöhen.

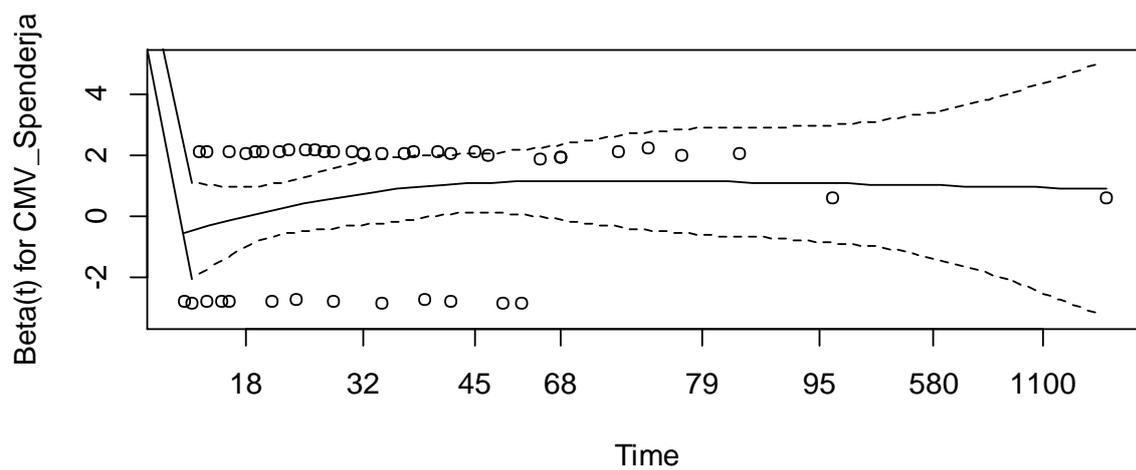
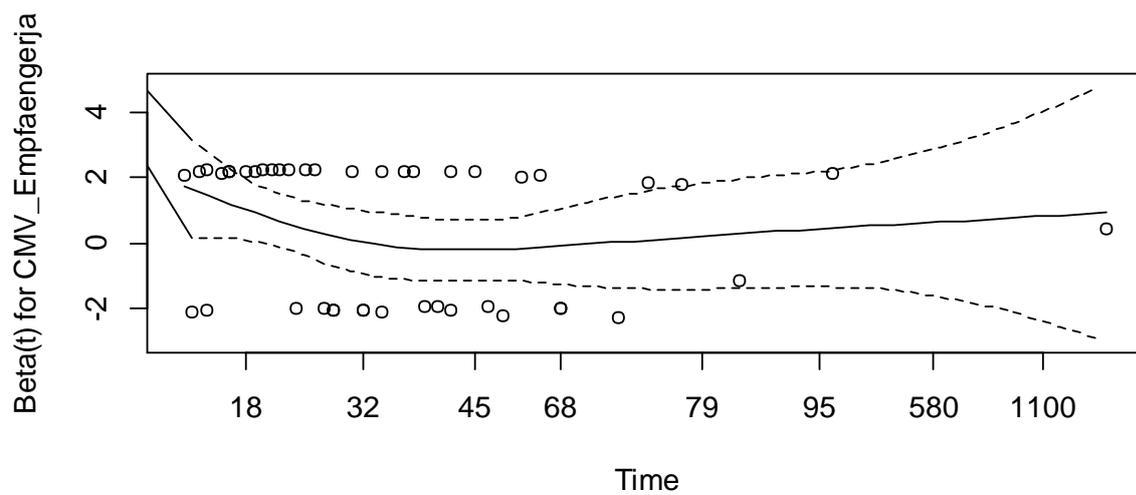


Abb 9: Vergleich der Verteilung der Hazard Ratios von CMV Empfänger und Spender (y) über die Zeit in Monaten (x)

4.10.2. Größe Empfänger vs. Größe Spender

	p-Wert	HR	lower .95	upper .95
Größe Empfänger	0.635	0.9922	0.9605	1.025
Größe Spender	0.849	0.9969	0.9658	1.029
Likelihood ratio test		p=0.775		
Wald test		p=0.7761		
Score (logrank) test		p=0.7759		

Tab 16: Cox-Regression für Größe Empfänger und Größe Spender

In Bezug auf die Körpergröße von Empfänger und Spender konnten 276 Fälle (95,8%) berücksichtigt werden. Aufgrund fehlender Informationen mussten 12 Fälle (4,2%) zensiert werden.

Die p-Werte von Likelihood, Wald und Score weichen stark vom angestrebten Signifikanzniveau von $p < 0,05$ ab und deuten damit auf fehlende Signifikanz des Modells hin. Ebenfalls die p-Werte der Variablen liegen mit 0,64 und 0,85 deutlich über 0,05 und sind damit nicht signifikant. Die HR beider Variablen liegen bei ca. HR = 1 und bestätigen damit keinen bestehenden Zusammenhang.

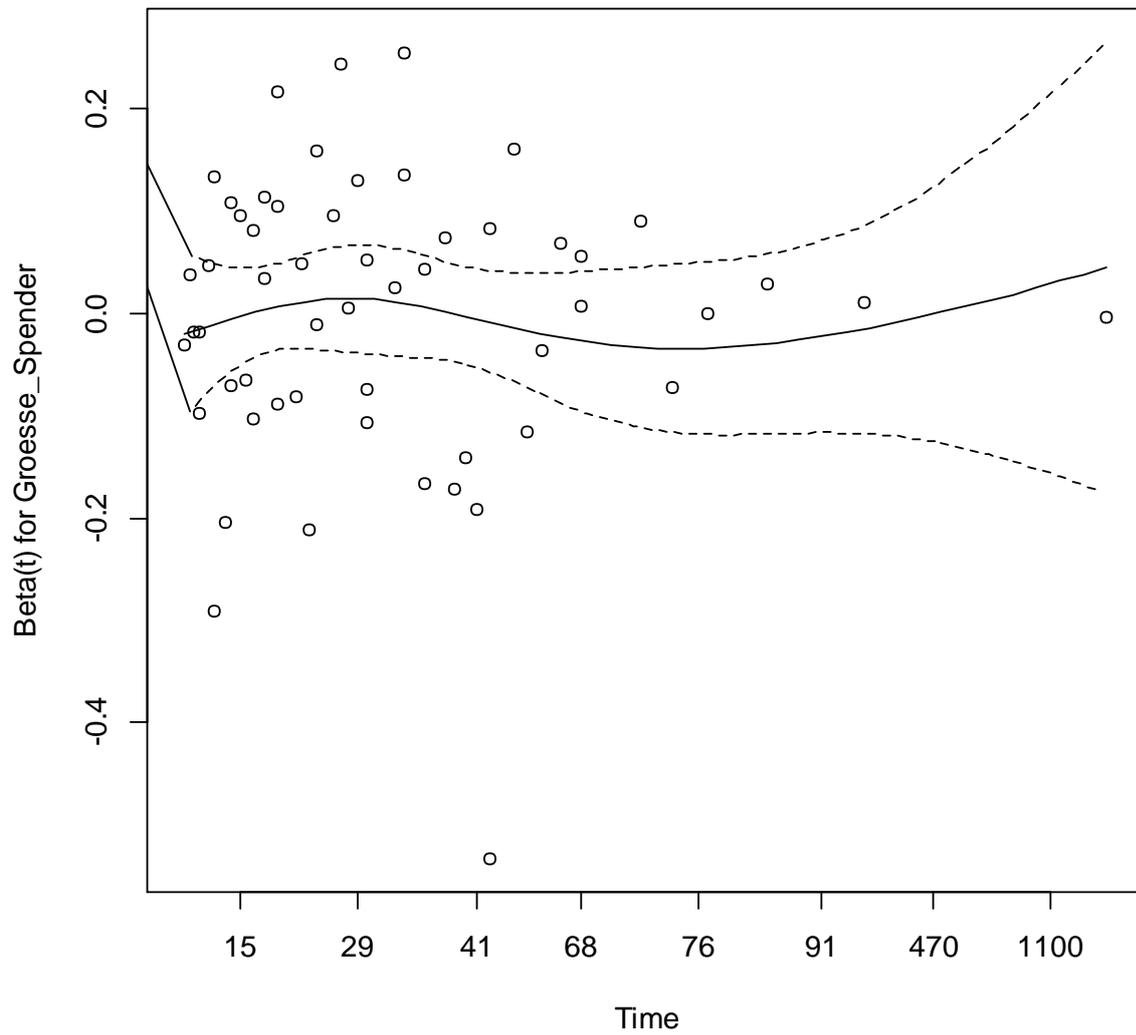


Abb 10: Verteilung der Hazard Ratio der Größe des Spenders (y) über die Zeit in Monaten (x)

4.10.3. Alter Empfänger vs. Alter Spender

	p-Wert	HR	lower .95	upper .95
Alter Empfänger	0.112	0.9855	0.9680	1.003
Alter Spender	0.106	1.0171	0.9964	1.038
Likelihood ratio test		p=0.08868		
Wald test		p=0.1214		
Score (logrank) test		p=0.1225		

Tab 17: Cox-Regression für Alter Empfänger und Alter Spender

Bezüglich der Variablen Alter von Empfänger und Spender konnten 286 Fälle (99,3%) berücksichtigt werden. Aufgrund fehlender Informationen mussten zwei Fälle (0,7%) zensiert werden.

Die p-Werte von Likelihood, Wald und Score Test liegen mit 0,089, 0,12 und 0,12 knapp oberhalb des Signifikanzniveaus, zeigen damit keine, tendieren aber zur Signifikanz. Dasselbe gilt für die p-Werte der Variablen Alter Empfänger (0,11) und Alter Spender (0,11). Da das Konfidenzintervall beider Variablen die 1 einschließt, liegt die Annahme, dass kein Zusammenhang besteht näher. Eine HR von 1,02 der Variable Alter Spender würde bedeuten, dass pro Jahr, das der Spender bei Spende älter ist, das Risiko der Entwicklung einer Abstoßung um 2% steigert. Eine HR von 0,99 der Variable Alter Empfänger würde bedeuten, mit jedem Jahr, das der Empfänger bei Organerhalt älter ist, reduziert das Risiko einer Abstoßung um 1%, d.h. je jünger der Spender und je älter der Empfänger, desto geringer das Risiko einer Abstoßung.

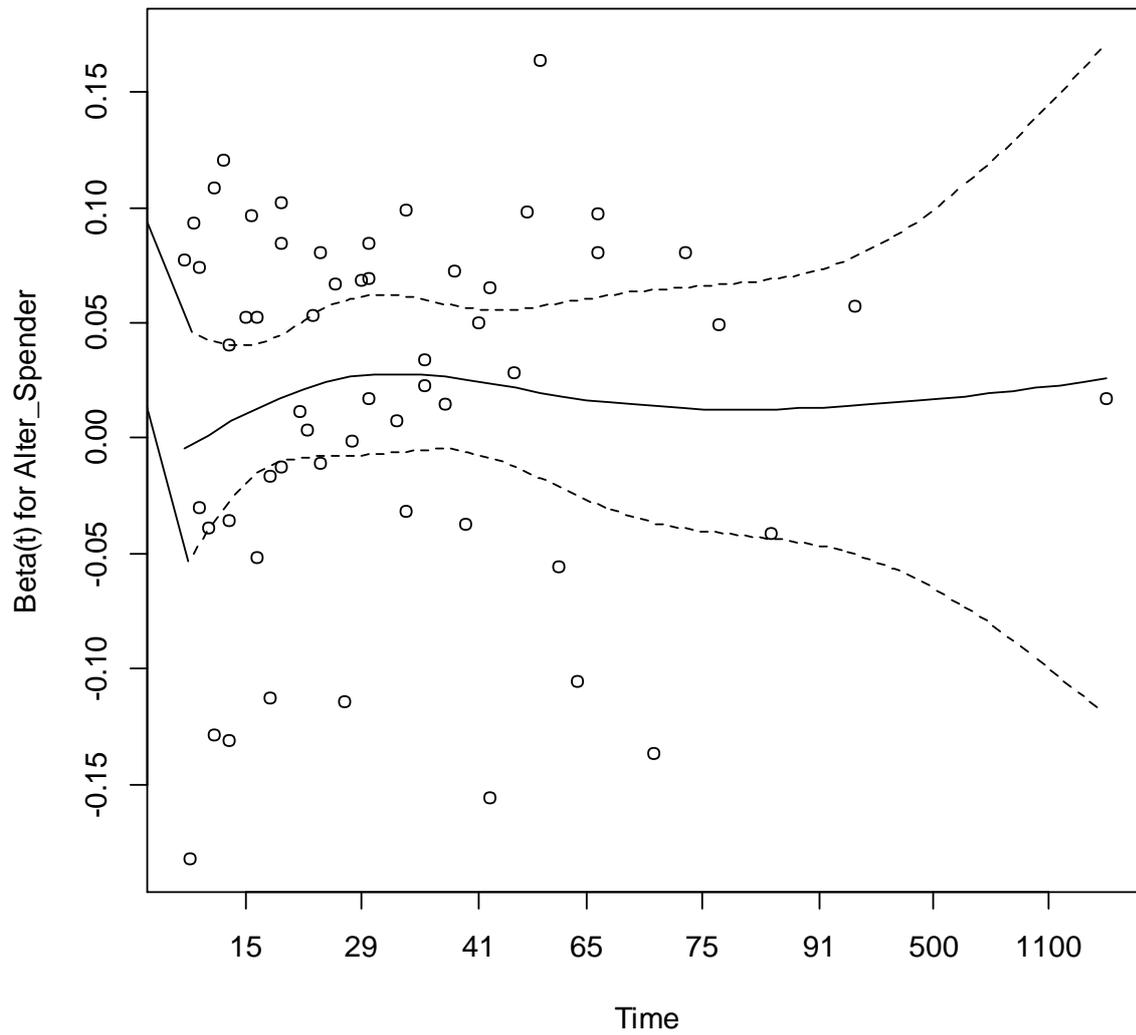


Abb 11: Verteilung der Hazard Ratio des Alters des Spenders (y) über die Zeit in Monaten (x)

4.10.4. Ischämiezeit vs. Spenderdaten

Die Spenderdaten umfassen das Alter, das Geschlecht, die Größe und den CMV Status des Spenders.

	p-Wert	HR	lower .95	upper .95
Ischämiezeit	0.5422	1.0007	0.9983	1.003
Alter Spender	0.1342	1.0190	0.9942	1.044
Geschlecht Spender w	0.7858	1.1226	0.4875	2.585
Größe Spender	0.4786	0.9855	0.9464	1.026
CMV Spender	0.0392	2.0913	1.0374	4.216
Likelihood ratio test		p=0.1422		
Wald test		p=0.1795		
Score (logrank) test		p=0.1635		

Tab 18: Cox-Regression für Ischämiezeit und Spenderdaten

In diesem Modell konnten 192 Fälle (66,7%) berücksichtigt werden. 96 Fälle (33,3%) mussten aufgrund fehlender Informationen zensiert werden. Das zu beobachtende Ereignis, die Abstoßung, trat in 42 Fällen (14,6%) ein.

Die p-Werte von Likelihood, Wald und Score Test liegen bei 0,14, 0,18 bzw. 0,16, damit über 0,05 und zeigen keine, sondern tendieren zur Signifikanz.

Die Cox Analyse zeigt für die Variablen Ischämiezeit, Alter Spender, Geschlecht Spender und Größe Spender keine Signifikanz. Mit einem p-Wert von 0,04 ist die Variable CMV Spender signifikant.

Mit einer HR von 1 und dem Einschluss von 1 in das Konfidenzintervall bei einem p-Wert von 0,54 zeigt in diesem Modell die Variable Ischämiezeit keinen Einfluss auf die Entwicklung einer Abstoßung.

Die Ergebnisse bezüglich des Spenderalters zeigen eine Erhöhung des Risikos pro Jahr um 2%. Bei einem p-Wert von 0,13 ist dies jedoch nicht signifikant, sondern tendiert zur Signifikanz.

Ein weibliches Geschlecht des Spenders ließe bei einer HR von 1,12 eine Risikozunahme um 12% vermuten, kann bei einem p-Wert von 0,79 und einem Konfidenzintervall von 0,49 – 2,59 abgelehnt werden.

Ebenso verhält es sich mit der Größe des Spenders. Bei einer HR von 0,99 und einem p-Wert von 0,48 besteht kein Zusammenhang zur Entwicklung einer chronischen Abstoßung.

Mit einem p-Wert von 0,04 ist die Variable CMV Spender als signifikant zu werten. Bei positivem CMV Status des Spenders erhöht sich die Wahrscheinlichkeit einer Abstoßung um den Faktor 2,09 (HR = 2,09) und verdoppelt damit das Risiko einer Abstoßung.

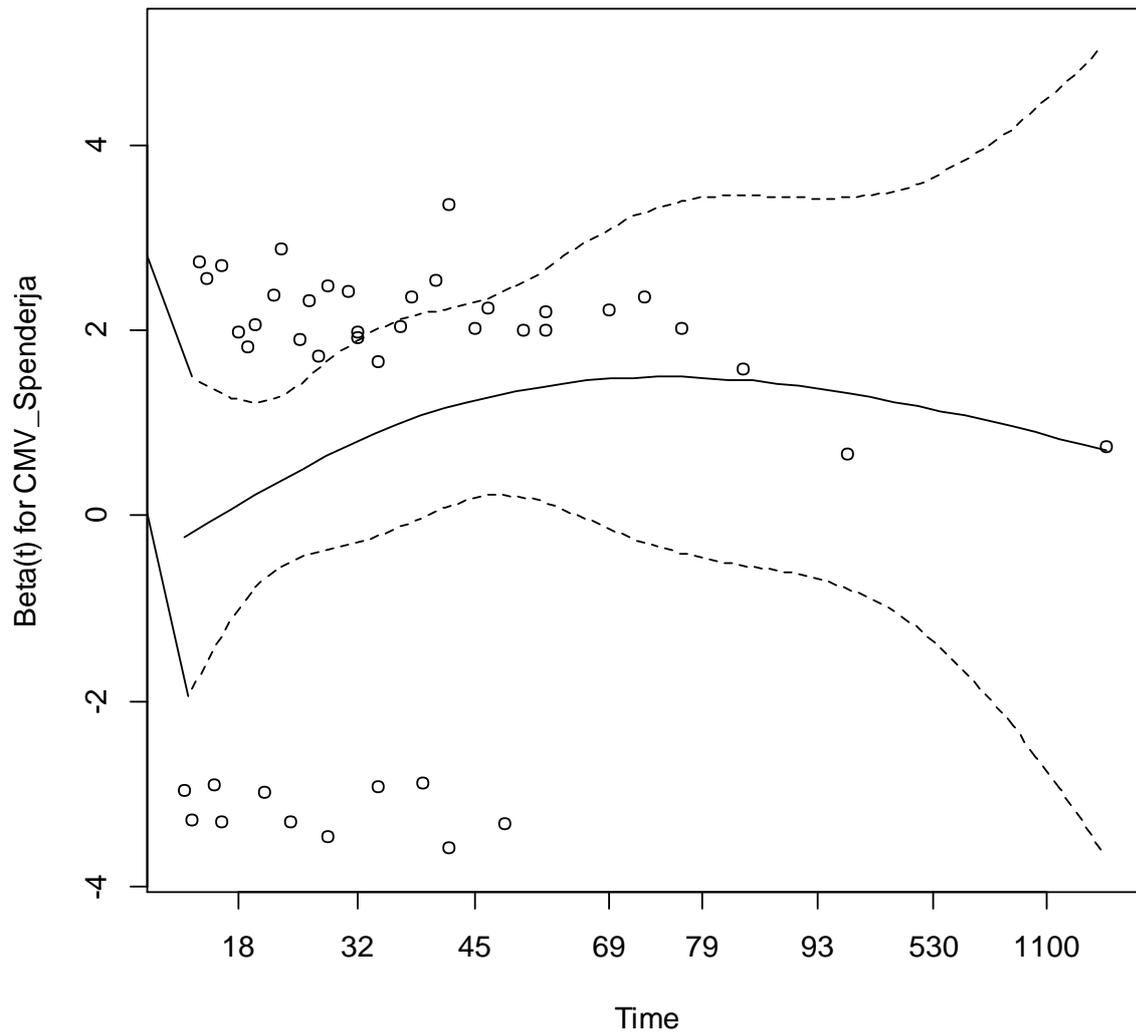


Abb 12: Verteilung der Hazard Ratio bei positivem CMV Status des Spenders (y) über die Zeit in Monaten (x)

4.11. Ergebnisse Screening und Validierung miRNA

Zur Ermittlung einer statistischen Signifikanz bei 96 zugrundeliegenden miRNAs werden (wie unter 2.4.10. erläutert) aus allen miRNAs Ratios gebildet. 58 dieser Ratios ergeben signifikante p-Werte $< 0,05$.

Folgende miRNAs zeigten hier statistisch signifikante p-Werte: hsa-miR-151a-5p, hsa-miR-495-3p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-22-3p, hsa-miR-99b-5p, hsa-let-7b-3p, hsa-miR-103a-3p und hsa-miR-92a-3p.

Die anschließende Validierung zeigte bei einer Validierungsgruppe von $n = 35$ einheitliche Schmelzpunkte bei jedem Primer, allerdings überwiegend negative Melting Curves. Somit liegt hier keine miRNA im quantitativ valide messbaren Bereich vor. Es ist eine zu häufige Amplifikation notwendig und damit die Qualität des Messergebnisses beeinträchtigt. Die Frage ist nun, ob eine Verunreinigung stattgefunden hat oder überhaupt Reverse Transkription stattgefunden hat.

Auf Verunreinigung wird durch die Negativ-Probe (kein Hinzufügen von Reverser Transkriptase) getestet. Hier findet keine Absorption statt, somit scheidet eine Verunreinigung aus.

Die Bestätigung der erfolgreichen Reversen Transkription erfolgt mittels Positiv-Kontrolle durch das Hinzufügen des spike-ins. Hier ergeben sich homogene Werte und bestätigen somit die Reverse Transkription.

5. Diskussion

Die LuTX stellt für Patienten mit fortgeschrittenen Erkrankungen des Lungenparenchyms oder der Lungenstrombahn häufig die Ultima Ratio dar.

Im Folgenden soll zunächst die statistische Analyse diskutiert werden. Die Auswertung ergab, dass 27 Männer und 30 Frauen der 288 ausgewerteten Fälle im Zeitraum der Beobachtung eine CLAD entwickelten. Es deutete sich an, dass das weibliche Geschlecht eine Tendenz als negativer prognostischer Wert aufweist, konnte jedoch nicht statistisch signifikant belegt werden.

Ebenfalls zeichnete sich eine Tendenz bezüglich des Alters ab. So ergab die Auswertung, dass die Wahrscheinlichkeit der Abstoßung pro höheres Lebensjahr zum Zeitpunkt der Transplantation um 1% zunimmt. Bei der multivariaten Analyse des Alters von Spender und Empfänger zeigte sich, dass sich pro höherem Lebensjahr des Spenders zum Zeitpunkt der Transplantation das Risiko der Abstoßung um 2% erhöht und pro höherem Lebensjahr des Empfängers zum Zeitpunkt der Transplantation um 1% reduziert. Aufgrund der p-Werte $> 0,05$ sind diese Ergebnisse jedoch nicht signifikant.

Zudem wurde der Einfluss der Transplantationsart ausgewertet. 29,2% Patienten erhielten eine SLTX, 70,8% Patienten eine DLTX. Das Risiko der Abstoßung liegt nach DLTX um 26% niedriger als bei SLTX. Allerdings sind bei p-Werten von $> 0,05$ die Ergebnisse als nicht signifikant zu werten.

Die Auswertung des Überlebens des Gesamtkollektivs ergab, dass 39% der Patienten im Zeitraum der Beobachtung verstorben sind. Unter diesen Patienten

entwickelten ca. 19,6% eine chronische Abstoßung. Die Literatur beschreibt, dass sich als Todesursache in über einem Drittel der Fälle eine BOS findet.³³ Die Untersuchung zwischen akuter und chronischer Transplantatabstoßung der Universitätsklinik Mainz ergab, dass 9 von 29 Patienten (exklusive 3 Re-LuTx) im Beobachtungszeitraum von 5 Jahren verstarben. In 5 von 9 Fällen lag eine chronische Abstoßung vor. Dieselbe Studie gibt das Durchschnittsalter der Patienten bei Transplantation mit 47 Jahren an. Dies deckt sich mit dieser Auswertung, die ein Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Transplantation von 48,8 Jahren ergibt. Ebenfalls deckungsgleich mit der Studie zeigt sich als häufigste Diagnose die Interstitielle Lungenerkrankung (12 von 32 beobachteten Patienten).³⁴

Hinsichtlich der Diagnose zeigte die Auswertung, dass im Vergleich zur CF die Diagnose Interstitielle Lungenerkrankung mit einem um 27% geringeren Risiko für chronische Abstoßung einhergeht. Die Diagnosen COPD und α 1-Antitrypsinmangel sowie andere Diagnosen gehen mit einem höheren Risiko für chronische Abstoßung einher als die Diagnose CF. Die Werte der Analyse sind jedoch nicht signifikant.

Suwara et al. bestätigt, dass keine signifikanten Unterschiede der Patienten bezüglich der Parameter Geschlecht, Transplantationsart, Ischämiezeit und CMV Status bestehen. In ihre Beobachtung flossen zudem die Parameter Blutgruppe, immunsuppressive Therapie und CRP ein.³⁵ Dies deckt sich mit den in dieser Auswertung erhobenen Ergebnissen. Einige Unterschiede treten jedoch auf. Zum einen lässt sich in dieser Auswertung eine Tendenz zur Signifikanz bei der multivariaten

³³ Transplantation ISfHaL. Annual Report of the International Society for Heart and Lung Transplantation. 1999

³⁴ Herber S et al. Akute oder chronische Transplantat-Abstoßung? Fortschr Röntgenstr 2001; 173: 823-829

³⁵ Suwara et al. Mechanistic differences between phenotypes of chronic lung allograft dysfunction after lung transplantation. Transplant International 2014; 27: 857-867

Analyse des CMV Status von Empfänger und Spender finden. Ein negativer Einfluss beider Variablen, eher jedoch eines positiven CMV Status des Spenders, liegt nahe. Zum anderen beschreibt Suwara et al. einen Unterschied hinsichtlich der Variable Alter. Eine Neutrophilie der Atemwege betraf in statistisch signifikanter Weise eher jüngere Patienten als in der Kontrollgruppe (33 vs. 57 %).

Aufschluss über die Neutrophilie erhält man im Rahmen der Verlaufskontrolle nach Transplantation mittels BAL. Die BAL Flüssigkeit, die man von gesunden, nichtrauchenden Patienten erhält, enthält durchschnittlich überwiegend Alveolarmakrophagen (80-90%), Lymphozyten (5-15%) und sehr wenige Neutrophile (<3%) oder Eosinophile (<1%). Wie von Meyer et al.³⁶ beschrieben und im Rahmen dieser Arbeit bei der Probenselektion berücksichtigt, treten bei älteren Patienten höhere Anteile an Lymphozyten und Neutrophilen in den BAL Proben auf. Zudem sinkt die Recovery, also die bei BAL gewonnene pulmonale Flüssigkeit, aufgrund vom Elastizitätsverlust des Lungengewebes. In der unmittelbaren Phase nach Transplantation sind die Zellzahlen deutlich erhöht, normalisieren sich aber annähernd bis zum 3. Monat nach Transplantation, vorausgesetzt das Transplantat erfüllt seine Funktion.³⁷ Eine Selektion auf 49 Proben gemäß diesen Kriterien wurde im Rahmen dieser Arbeit gewährleistet.

Die Analyse zeigte, dass 27,2% der Patienten des Gesamtkollektivs in der BAL ein Jahr nach Transplantation eine relevante Neutrophilie entwickelten. 36,7% der Patienten entwickelten eine CLAD. Laut Statistik erhöht sich das Risiko einer Abstoßung bei Vorhandensein einer Neutrophilie in der BAL somit um 68%. Die

³⁶ Meyer KC et al. Bronchoalveolar Lavage as a Diagnostic Tool. Semin Respir Crit Care Med 2007; 28: 546-560

³⁷ Meyer KC et al. Neutrophils, unopposed neutrophil elastase and alpha-1-antiprotease defenses following human lung transplantation. Am J Respir Crit Care Med 2001;164:97-102

Literatur bestätigt, dass hohe Werte an Neutrophilen in der BAL mit höheren Abstoßungsraten einhergehen. *Verleden et al.* beschrieb, dass BOS vornehmlich durch eine von Neutrophilen verursachte Atemwegsentzündung gekennzeichnet ist. Dabei gelte zu berücksichtigen, dass eine Abgrenzung von einem infektionsgetriggerten Anstieg der Neutrophilen in der BAL nicht immer einfach ist und somit einige Autoren festhielten, dass die meisten in der BAL nachgewiesenen Neutrophilen in der BAL von Infekten bedingt sind.³⁸ Verschiedene Studien beschrieben eine große Spannweite der Werte von Neutrophilenzahlen in der BAL, so waren es bei DiGiovine et al. zwischen weniger als 15% und 95%³⁹, Slebos et al. sogar zwischen 0% und 97%⁴⁰ und Ward et al. 16% bis 87% bei Patienten, die eine Abstoßung entwickelten und 0,4% bis 18% bei stabilen Patienten⁴¹. Verleden et al. bestätigte Slebos et al. in der Theorie, dass die hohe Diskrepanz der Werte bei Patienten in ähnlicher klinischer Verfassung auf die technische Ausführung der BAL zurückzuführen sei. Ob dies in Gänze diese Unterschiede erklärt bleibt fraglich. Das statistisch signifikante Ergebnis dieser Arbeit deutet jedoch ebenfalls auf die Neutrophilie als validen Marker bezüglich chronischer Abstoßung hin.

In diese Beobachtung flossen 41,7% der Patienten ein, die mit Azithromycin behandelt wurden. 38% dieser Patienten zeigten zudem eine CLAD. Hier zeigt sich ein statistisch nachgewiesener signifikanter Zusammenhang zwischen der Gabe von Azithromycin und der Entwicklung einer CLAD. Die Literatur beschreibt einen positiven prognostischen Einfluss von Azithromycin auf die CLAD. So sagt Verleden

³⁸ Verleden G M, Robin V, De Vleeschauwer SI, et al. Obliterative bronchiolitis following lung transplantation: from old to new concepts? 2009 European Society for Organ Transplantation 22 (2009) 771-779

³⁹ DiGiovine B, Lynch III JP, Martinez FJ, et al. Bronchoalveolar lavage neutrophilia is associated with obliterative bronchiolitis after lung transplantation. J Immunol 1996; 157: 4194.

⁴⁰ Slebos D-J, Postma DS, Koeter GH, et al. Bronchoalveolar lavage fluid characteristics in acute and chronic lung transplant rejection. J Heart Lung Transplant 2004; 23: 532

⁴¹ Ward C, Snell GI, Zheng L, et al. Endobronchial biopsy and bronchoalveolar lavage in stable lung transplant recipients and chronic rejection. Am J Respir Crit Care Med 1998; 158: 84

et al., dass 35% der Patienten in verschiedenen Stadien der BOS mit einem Anstieg der FEV1 um 14% reagierten. Zudem zeigen sie auf, dass die Behandlung mit Azithromycin die von Neutrophilen verursachte Entzündung in Fällen von BOS reduziert. Hiervon grenzten sie eine zweite Subgruppe ab, die sie als neutrophilic reversible allograft/airways dysfunction (NRAD) beschrieben.⁴² Diese Arbeit bestätigte in der multivariaten Analyse der Variablen Azithromycin und Neutrophilie einen signifikanten Einfluss der Variablen aufeinander.

Des Weiteren ist die Reliabilität der miRNA als Biomarker einer CLAD-Entwicklung zu bewerten. Hierfür wurden die BAL-Proben ein Jahr nach Transplantation herangezogen. Auch Lu et al.⁴³ nutzte die BAL, um auf Grundlage von RNA als Indikator für Genaktivität zwischen Patienten mit chronischer Abstoßung im Vergleich zu Patienten ohne Abstoßung zu unterscheiden.

Eine erste Einschränkung hinsichtlich der Reliabilität stellt die Verunreinigung der BAL-Probe durch Erythrozyten dar. Verschiedene Studien wie Kirschner et al.⁴⁴, McDonald et al.⁴⁵ und Pritchard et al.⁴⁶ zeigten, dass die Hämolyse bei der Probengewinnung oder –aufarbeitung einen essenziellen Einfluss auf die miRNA-Spiegel in Plasma und Serum haben. Alle drei Studien zeigten, dass miR-16 und miR-451 das höchste Vorkommen in Erythrozyten aufweisen und die Plasmawerte dieser miRNAs durch Hämolyse in höchstem Maße beeinflusst wurden. Zudem

⁴² Verleden G M, Robin V, De Vleeschauwer SI, et al. Obliterative bronchiolitis following lung transplantation: from old to new concepts? 2009 European Society for Organ Transplantation 22 (2009) 771-779

⁴³ Lu BS, Yu AD, Zhu X, et al. Sequential gene expression profiling in lung transplant recipients with chronic rejection. Chest 2006;130:847-854

⁴⁴ Kirschner et al. (2011) Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. PLoS ONE 6:e24145.doi:10.1371/journal.pone.0024145

⁴⁵ McDonald et al. (2011) Analysis of circulating miRNA: preanalytical and analytical challenges. Clin. Chem. 57, 833-840

⁴⁶ Prichard et al. (2012) Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. Cancer Prev. Res. (Phila.) 5, 492-497

zeigte Blondal et al.⁴⁷ bei einem Vergleich von 119 miRNAs in qualitativ hochwertigen und von Blut kontaminierten Proben auf, dass in den kontaminierten Proben viele der 119 miRNAs signifikant in ihrem Expressionslevel von den 381 qualitativ hochwertigen Proben abwichen. Zudem schlug diese Studie die Methode der Ratiobildung zwischen einer Probe, die besonders von Hämolyse betroffen war, mit einer Probe, die nicht durch Hämolyse verfälscht wurde, als Indikator für Hämolyse vor.

Kirschner et al.⁴⁸ versuchten daraufhin in ihrer Studie, die miRNA zu ermitteln, die am ehesten durch Hämolyse in der Auswertung verfälscht wird. Sie fanden 65% (88 von 136) der untersuchten miRNA in den hämolysierten Proben erhöht. Nicht nur in Folge der Gewinnung und Aufarbeitung von Proben, sondern auch in vivo erkrankungsbedingt oder medikamentenbezogen könne es zu Hämolyse kommen, so Kirschner et al., und mache damit den Stellenwert von miRNA als Biomarker fragwürdig. Gleichzeitig gestehen sie zu, dass diese Fälle der in vivo-Hämolyse eher selten eintreten.

Die Studie von Kirschner et al. gibt an, dass 15% der Proben unter Photospektrometrie auch mit dem bloßen Auge nicht sichtbare signifikante Hämolysebestandteile aufwiesen. Es bleibt jedoch zu bedenken, dass es sich bei den Proben in dieser Studie um Plasma- und Serumproben handelte. Daher kann der Grad der Hämolyse deutlich größer ausfallen als bei BAL-Proben, die durch Verletzung des Lungenparenchyms bei der Probengewinnung durch Hämolyse kontaminiert werden können.

⁴⁷ Blondal et al. (2013) Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods* 59, S1-6

⁴⁸ Kirschner MB, Edelman JJB, Kao SCH et al. The impact of hemolysis on cell-free microRNA biomarkers. *Frontiers in Genetics*. (2013) doi: 10.3389/fgene.2013.00094

Mittels Nano-Drop wurde in dieser Arbeit, wie von Kirschner et al. empfohlen, der Hämolysegrad der Proben bestimmt. Möglichst kontaminationsfreie Proben wurden für das Screening verwendet. Vorausgesetzt, dass die für die Validierung eingesetzten Proben daher höhere Grade an Hämolyse aufwiesen, wären höhere miRNA-Konzentrationen bei der Validierung zu erwarten gewesen. Jedoch ergab keine Probe einen, wie auch bei Kirschner et al. und gemäß Herstellerangaben des verwendeten Kits, für die Validierung vorausgesetzten CT-Wert < 35 in der PCR.

Bei der Metaanalyse diverser Studien, die miRNA analysierten, ist zu beachten, dass verschiedene Transcriptions Kits verwendet wurden, bei denen der Threshold variiert. In der Studie von Gallo et. al.⁴⁹, der mittels TaqMan Micro RNA Reverse Transcription Kit 9 miRNAs in Serum und 4 miRNAs aus Speichelproben nachweisen konnte, wurde beschrieben, dass die CT-Werte für die Mehrheit der miRNA bei über 35 lag und als reliabler Threshold für miRNA gewertet wurde. Im Fall dieser Arbeit wurde das miRCURY LNA Universal RT miRNA PCR Kit verwendet. Hier können gemäß Herstellerangaben CT-Werte ab 35 - wie bei Kirschner et al. - nicht mehr als valide angesehen werden. Während des Screenings konnten für $n = 12$ Proben valide CT-Werte und somit für 11 miRNAs valide Werte erzielt werden. Die Validierung ergab jedoch CT-Werte > 35 , wodurch diese Messungen nicht verwertet werden konnten.

Die Verwendung eines anderen Kits, ein geringeres Vorkommen von miRNA in der BAL als in den von Gallo et al. verwendeten Serum- und Speichelproben, eine fehlende Beständigkeit von Proben oder Primern oder technisch unsauberes Arbeiten kommen als Gründe der nicht validen Messung von miRNA in Betracht.

⁴⁹ Gallo A, Tandon M, Alevizos I, Illei GG (2012) The Majority of MicroRNAs Detectable in Serum and Saliva Is Concentrated in Exosomes. PLoS ONE 7(3):e30679. doi:10.1371/journal.pone.0030679

Die Studie von Rodriguez et al.⁵⁰ soll als weiterer Vergleich hinzugezogen werden. Ziel war es Unterschiede in miRNAs in aus Plasma und BAL isolierten Exosomen bei Patienten mit und ohne Bronchialkarzinom aufzuweisen.

Zur Quantifizierung von Exosomen in Plasma und BAL nutzten sie, wie Gallo et al., ebenfalls TaqMan miRNA Reverse Transcription Kit. Zur Messung der Amplifikationen der PCR wurde, wie in dieser Arbeit, miScript SYBR® Green PCR Kit eingesetzt. Die Auswertung erfolgte ebenfalls mittels der Bildung von Ratios einzelner miRNAs miteinander.

Die Studie konnte nachweisen, dass unabhängig von der zugrundeliegenden Pathologie die Plasmaproben signifikant höhere Konzentrationen an Exosomen als die BAL-Proben enthielten. Die BAL-Proben der Tumorpatienten zeigten wiederum eine höhere Konzentration von Exosomen als die der Nicht-Tumorpatienten. Die geringste Konzentration an Exosomen fand sich also in nicht-tumorassoziierten BAL-Proben, entsprechend dem Patientenkollektiv dieser Arbeit.

Es konnten in der Analyse von Rodriguez et al. 88% der 84 untersuchten miRNAs in nicht-tumorassoziierten BAL-Proben nachgewiesen werden – ebenso viele (87%) wie in tumorassoziierten BAL- und Plasma-Probe. Während sich spezifische miRNAs für BAL-Proben insgesamt (miR-302a und miR-302c), tumorassoziierte BAL- (miR-143) und nicht-tumorassoziierte Plasmaproben (miR-128) identifizieren ließen, fanden keine spezifische miRNA für nicht-tumorassoziierte BAL-Proben. Dies würde bestätigen, dass auch in dieser Arbeit keine spezifische miRNA in BAL-Proben gefunden wurde. Der Vergleich von in BAL und Plasma nachgewiesener miRNA ergab zudem, dass unabhängig von der Pathologie unterschiedliche miRNAs in Exosomen

⁵⁰ Rodriguez M, Silva J, López-Alfonso A et al. Different Exosome Cargo from Plasma/Bronchoalveolar Lavage in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Genes Chromosomes & Cancer*; 53:713-724 (2014)

freigesetzt werden. Ein Rückschluss von in Plasma freigesetzter miRNA auf in BAL freigesetzter miRNA scheint nicht möglich.

Der Vergleich mit der Studie von Rodriguez et al. zeigt auf, dass signifikante Ergebnisse unter Befolgung der Herstellerangaben trotz der Verwendung verschiedener Kits in Quantifizierung und Validierung gelingen kann. Die höchste Quantität an Exosomen weist in dieser Studie das Kollektiv der Tumorpatienten bei Untersuchung der Plasmaproben auf. Allerdings findet sich eine nahezu gleiche Menge an miRNA in nicht-tumorassoziierter BAL- wie in tumorassoziierter BAL- und Plasmaprobe. Zwar findet sich spezifische miRNA für BAL-Proben insgesamt, jedoch nicht für das nicht-tumorassoziierte Kollektiv. Dies würde der These, dass zu geringe miRNA-Mengen in der BAL vorliegen, um ein signifikantes Ergebnis zu erreichen, widersprechen. Jedoch scheint ein signifikanter Nachweis einer spezifischen miRNA nur in tumorassoziierter BAL möglich.

Diesbezüglich veröffentlichten Brock et al.⁵¹ 2015 eine weitere Studie. Sie untersuchten das dynamische Expressionsprofil von miRNAs innerhalb der ersten 24 Stunden nach Gewinnung der BAL. Sie untersuchten speziell miR-17, miR-19b und miR-20, die alle ähnliche Spiegel in Serum- und BAL-Proben aufweisen.⁵² Zudem analysierten sie miR-125a und miR-223-3p. Zur RNA-Isolation wurde ebenfalls miRCURY RNA Isolation kit-biofluids (Exiqon, Vedbaek, Denmark) verwendet. Die RNA wurde in RNase-free Water ebenfalls bei -80°C für spätere Analysen gelagert.

⁵¹ Brock M, Rechsteiner T, Kohler M, Franzen D, Huber LC. Kinetics of microRNA Expression in Bronchoalveolar Lavage Fluid Samples. *Lung* (2015) 193:381-385. Doi: 10.1007/s00408-015-9719-5

⁵² Molina-Pinelo S, Suarez R, Pastor MD et al. (2012) Association between the miRNA signatures in plasma and bronchoalveolar fluid in respiratory pathologies. *Dis Markers* 32(4):221-230. Doi:10.3233/DMA-2011-0882

Mittels SYBR Green quantitative PCR erfolgte die Quantifizierung von erworbener cDNA.

Untersucht wurde das Expressionslevel von diesen fünf miRNA in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit nach Probengewinnung und –aufbereitung. In Abhängigkeit von der Lagerung (Raumtemperatur vs. 4°C) zeigten die Expressionslevel von dieser miRNAs 8 Stunden nach BAL-Gewinnung keine signifikanten Unterschiede.

Sie zeigten jedoch, dass, sobald mehr als 24 Stunden nach der BAL-Gewinnung und RNA-Aufbereitung vergangen waren, ein deutlicher Anstieg in unterschiedlichen Ergebnissen zu verzeichnen war. Keines dieser Ergebnisse zeigte Signifikanz.

Brock et al. stellten fest, dass es bisher keine einheitlichen Schemata zur miRNA-Aufbereitung und Auswertung gibt. Ob Studienprotokolle vergleichbar sind, bleibe daher unklar. Sie konstatierten, dass Temperatur wohl keinen Einfluss auf die Stabilität und das Expressionslevel von miRNAs habe, jedoch umso mehr der Zeitpunkt der Analyse. Sie gaben an, dass miRNA Daten von Studien, die verschiedene Aufbereitungsprotokolle verwendeten, nur direkt kompatibel sind, wenn die Proben innerhalb der ersten 8 Stunden aufbereitet wurden.

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit waren die BAL-Proben der n = 49 Patienten seit mehreren Monaten bei -80°C eingelagert gewesen. Dies widerspricht eindeutig der Studie von Brock et al., demnach die Proben innerhalb von 8 Stunden nach Gewinnung valide Ergebnisse liefern. Jedoch erfolgte auch in der Studie von Brock et al. eine Lagerung der Proben bei -80°C und vielfach beschrieben ist die besondere Stabilität von miRNA (s.o.).

Abschließend bleibt festzuhalten, dass bei der Berücksichtigung der vorhandenen Aufbereitungsschemata gemäß der Literatur keine valide miRNA als Biomarker für chronische Abstoßung identifiziert werden konnte. Eine direkt im Anschluss an die BAL durchgeführte RNA-Prozessierung scheint eine mögliche Lösung.

6. Zusammenfassung

Bei Lungenerkrankungen im Endstadium, wie CF, Interstitieller Lungenerkrankung, COPD und Alpha-1-Antitrypsinmangel, bietet die Transplantation die letzte Therapieoption, wenn andere therapeutische Ansätze ausgeschöpft sind. Ein wichtiger Einflussfaktor auf das Überleben nach Transplantation ist die Entwicklung einer chronischen Abstoßung. Mit regelmäßigen Kontrolluntersuchungen und individuell angepasster immunsuppressiver Therapie soll dies verhindert werden.

Eine neue Methode zur frühzeitigen Erkennung eines Abstoßungsgeschehens würde jedoch ein frühestmögliches Einschreiten zur Verhinderung der Vollausbildung einer CLAD und damit eine Verbesserung des Überlebens und der Lebensqualität der Patienten gewährleisten.

Diese Arbeit beschäftigte sich in diesem Sinne mit einem Gesamtkollektiv von 372 Patienten (in die Auswertung flossen 288 Fälle ein), die im Zeitraum vom 01.01.2006 bis 31.12.2012 in den Kliniken der Universität München, Campus Großhadern, transplantiert und betreut wurden.

Mit 45,2% ist der Anteil an ILD als zugrundeliegende Erkrankung am häufigsten, gefolgt von 26,6% mit COPD bzw. α 1-Antitrypsinmangel und 15,2% mit CF. Bei einem Vergleich der Diagnosen besteht bei ILD ein um 27% geringeres, bei COPD und α 1-Antitrypsinmangel ein um 32% höheres und bei anderen Erkrankungen wie

primärer pulmonaler Hypertonie ein um den Faktor 2,27 höheres Risiko des Auftretens einer CLAD. Bei p-Werten $> 0,05$ sind diese Werte jedoch nicht signifikant.

Die Auswertung erbrachte zudem, dass Patienten, die eine DLTX erhielten im Vergleich zu Patienten mit SLTX ein um 26% geringeres Risiko einer CLAD aufweisen. Mit einem p-Wert von 0,28 ist dieses Ergebnis jedoch nicht signifikant.

Im Zeitraum der Beobachtung sind 39% der Patienten verstorben. In 18,6% der Fälle war die Entwicklung einer CLAD beobachtet worden.

Unter den Patienten entwickelten 27 Männer und 30 Frauen eine CLAD. Die Auswertung zeigt, dass bei Frauen die Wahrscheinlichkeit der Abstoßung pro Jahr um 12% zunimmt. Wegen fehlender statistischer Signifikanz, muss diese Hypothese jedoch verworfen werden.

Das Durchschnittsalter bei Transplantation liegt bei 48,8 Jahren. Das Risiko einer Abstoßung steigt mit jedem Jahr das der Patient bei Transplantation älter ist. Allerdings ergibt sich keine statistische Signifikanz. Dasselbe gilt für den Vergleich des Einflusses des Alters von Spender und Empfänger. Demnach reduziert sich das Abstoßungsrisiko um 1% mit jedem Jahr, das der Empfänger bei Erhalt älter und steigert sich das Risiko um 2% mit jedem Jahr, das der Spender bei Transplantation älter ist.

Bei grenzwertiger Signifikanz kann davon ausgegangen werden, dass das Vorhandensein einer Neutrophilie das Risiko einer Abstoßung um 68% steigert. Bei

27,2% des Gesamtkollektivs zeigt sich in der BAL, die ein Jahr nach Transplantation durchgeführt wurde, eine Neutrophilie. 36,7% dieser Patienten entwickelten eine CLAD.

Ein positiver CMV-Status von Spender und Empfänger zeigen laut Statistik einen negativen Einfluss auf die Entwicklung einer chronischen Abstoßung. Ein positiver CMV-Status des Spenders erhöht das Risiko um 76,4%, der des Empfängers um 50%. Beide Werte zeigen jedoch keine Signifikanz.

Die Ischämiezeit, Körpergröße des Organempfängers und Spenderdaten haben keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Entwicklung einer CLAD.

Die Isolation von miRNA aus den BAL-Proben von 49 nach einheitlichen Kriterien ausgewählten Patienten ergab zunächst im Screening den Hinweis auf 11 statistisch signifikant erhöhte miRNAs in den BAL-Proben der CLAD-Patienten im Vergleich zu gesunden Patienten. In der anschließenden Validierung konnte dies jedoch nicht bestätigt werden.

Mögliche Ursachen sind ein zu geringes Vorkommen von miRNAs in BAL-Proben, die fehlende Beständigkeit von miRNA in BALs nach einem Zeitraum von 24 Stunden nach Gewinnung der Probe oder technisch unsauberes Arbeiten. Weitere Studien mit größerem BAL-Volumen und zeitnaher Durchführung der RNA Isolation nach BAL könnte darüber weiteren Aufschluss geben.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BOS	Bronchiolitis obliterans Syndrom
cDNA	Complementary Desoxyribonucleic acid
CF	Cystische Fibrose
CLAD	Chronic lung allograft dysfunction (Chronische Lungentransplantat Abstoßung)
CMV	Cytomegalie Virus
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease)
CPC	Comprehensive Pneumology Centre
CT	Cycle Threshold
DLTX	Doppellungentransplantation
DSA	Donorspezifische anti-HLA-Antikörper
EKG	Elektrokardiogramm
FVC	Funktionelle Vitalkapazität
FEV1	Forcierte Einsekundenkapazität
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
HLA	Human Leukocyte Antigen
IgG	Immunglobulin G
IL 2/8	Interleukin 2/8
ILD	Interstitielle /idiopathische Lungenerkrankung (Interstitial/Idiopathic lung disease)
ISHLT	International Society for Heart and Lung Transplantation

kPa	Kilo Pascal
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LRSg	Lung Rejection Study Group
LuTX	Lungentransplantation
miRNA	microRNA (=micro ribonucleic acid)
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
NRAD	Neutrophile reversible Allograftdysfunktion
PaCO ₂	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PaO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
RAS	Restriktives Allograftsyndrom
SLTX	Einzellungentransplantation
TLC	Totale Lungenkapazität

7.2. Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb 1: Verteilung Transplantationsart	27
Abb 2: Verteilung Auftreten CLAD ja/nein	28
Abb 3: Verteilung Häufigkeit Tod ja/nein	29
Abb 4: Verteilung Häufigkeit CLAD unter verstorbenen Patienten	30
Abb 5: Verteilung Diagnosen	31
Abb 6: Verteilung Alter bei Transplantation	34
Abb 7: Verteilung der Hazard Ratio über die Zeit in Monaten (x) bezüglich des Alters zum Zeitpunkt der Transplantation (y)	35
Abb 8: Verteilung der Hazard Ratio über die Zeit in Monaten (x) bezüglich der Ischämiezeit (y)	39
Abb 9: Vergleich der Verteilung der Hazard Ratios von CMV Empfänger und Spender (y) über die Zeit in Monaten (x)	41
Abb 10: Verteilung der Hazard Ratio der Größe des Spenders (y) über die Zeit in Monaten (x)	43
Abb 11: Verteilung der Hazard Ratio des Alters des Spenders (y) über die Zeit in Monaten (x)	45
Abb 12: Verteilung der Hazard Ratio bei positivem CMV Status des Spenders (y) über die Zeit in Monaten (x)	48

7.3. Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab 1: BOS Klassifikation, in Prozent des besten postoperativen Wertes	11
Tab 2: Schema für Reverse Transkription	23
Tab 3: Schema für Screening	23
Tab 4: Häufigkeit Auftreten CLAD	28
Tab 5: Häufigkeit Ereignis Tod	29
Tab 6: Häufigkeit CLAD unter verstorbenen Patienten	30
Tab 7: Häufigkeit der Diagnosen	31
Tab 8: Häufigkeit Geschlecht männlich/weiblich	33
Tab 9: Risikoentwicklung Eintreten Ereignis CLAD in Abhängigkeit vom Geschlecht pro Monat	33
Tab 10: Neutrophilie	36
Tab 11: Azithromycin	36
Tab 12: Kreuztabelle Azithromycin/CLAD	37
Tab 13: Eta als Richtungsmaß für Ischämiezeit	37
Tab 14: Einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA für Ischämiezeit	38
Tab 15: Cox-Regression für CMV Empfänger und CMV Spender	39
Tab 16: Cox-Regression für Größe Empfänger und Größe Spender	42
Tab 17: Cox-Regression für Alter Empfänger und Alter Spender	44
Tab 18: Cox-Regression für Ischämiezeit und Spenderdaten	46

8. Literaturverzeichnis

- [1] Benden C, Edwards LB, Kucheryavaya AY et al. The registry of the international society for heart and lung transplantation: sixteenth official pediatric lung and heartlung transplantation report-2013; focus theme: age. J Heart Lung Transplant 2013; 32: 989-97.

- [2] Duale Reihe, Innere Medizin, Thieme, 3. Auflage, S. 370-374, 375, 378-379, 401-403

- [3] American Thoracic Society, European Respiratory Society. ATS/ERS International Consensus Statement. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnostic and treatment. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161: 646-664

- [4] Du Bois RM, Riceldi L, eds. Interstitial Lung Diseases. Eur Respir Monogr 2009; 46.

- [5] Travis WD, King TE, Bateman ED, et al. ATS-ERS international multidisciplinary consensus classification of idiopathic interstitial pneumonias. General principles and recommendations. Am J Respir Crit Care Med 2002; 165: 277-304

- [6] Wells AU, Hirani N. Interstitial lung diseases guideline: the British Thoracic Society in collaboration with the Thoracic Society of Australia and New Zealand and the Irish Thoracic Society. Thorax 2008; 63: Suppl. V, v1-v58

- [7,10,14] <http://www.lutx.de/wp-content/uploads/2014/03/Lungentransplantation-Herz140107-end-mit-Tabellen-und-Abbildungen.pdf>
- [8] R. Speich, A. Boehler, A. Spiliopoulos, W. Weder, L.P. Nicod. Indikation zur Lungentransplantation bei fortgeschrittener zystischer Fibrose. Schweiz Med Wochenschr 2000;130:1352-60
- [9] M. Kamler and N. Pizanis. Aktueller Stand der Lungentransplantation. Pulmonale und nicht pulmonale Komplikationen. Z Herz Thorax Gefasschir. 2013; 27(6): 383–390.
- [11] Snyderman DR, Limaye AP, Potena L, Zamora MR. Update and review: state-of-the-art management of cytomegalovirus infection and disease following thoracic organ transplantation. Transplant Proc 2011; 43: S1-S17.
- [12] Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM et al. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. Transplantation 2010; 89: 779-95.
- [13] A. Gaspert, A. Boehler, W. Weder, R. Speich, P. Vogt. Spezielle Probleme nach Lungentransplantation: eine Gratwanderung zwischen Infektion und Abstoßungsreaktion. Schweiz Med Wochenschr 2000;130:944-51
- [15] Scott J.P., Higenbottam T.W., Clelland C.A., Stewart S., Smyth R.L., McGoldrick J.P., et al: Natural history of chronic rejection in heart-lung transplant recipients. J Heart Transplant 1990;9:510-5

- [16] Nicod LP. Mechanisms of airway obliteration after lung transplantation. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 444.
- [17, 35] Suwara MI, Vanaudenaerde BM, Verleden SE, et al. Mechanistic differences between phenotypes of chronic lung allograft dysfunction after lung transplantation. *Transplant International*. (2014) 857-867
- [18] Vos R, Vanaudenaerde BM, Verleden SE et al. A randomised controlled trial of azithromycin to prevent chronic rejection after lung transplantation. *Eur Respir J* 2011; 37: 164-72
- [19] Christie JD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dobbels F, Kirk R, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-Eighth Adult Lung and Heart-Lung Transplant Report-2011. *J Heart Lung Transplant* 2011;30(10):1104-22
- [20] Kramer MR, Stoehr C, Wang JL, et al. The diagnosis of obliterative bronchiolitis after heart-lung and lung transplantation: low yield of transbronchial biopsies. *J Heart Lung Transplant* 1993;12: 713
- [21] Finlen Copeland CA, Snyder LD, Zaas DW et al. Survival after bronchiolitis obliterans syndrome among bilateral lung transplant recipients. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182: 784-9.

- [22, 27, 38,42] Verleden GM, Vos R, De Vleeschouwer SI, et al. Obliterive bronchiolitis following lung transplantation: from old to new concepts? European Society for Organ Transplantation. J Transplant International 2009; 22:771-779
- [23] Sato M, Waddel TK, Wagnetz U, Roberts HC, Hwang DM, Haroon A, et al. Restrictive allograft syndrome (RAS): a novel form of chronic lung allograft dysfunction. J Heart Lung Transplant 2011;30(7):735-42
- [24] Clajus C, Blasi F, Welte T, Greer M, Fuehner T, Mantero M. Therapeutic approach to respiratory infections in lung transplantation. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics 2014.07.003
- [25] Boehler A., Speich R., Russi E.W., Weder W. Lung transplantation for lymphangiomyomatosis. N Engl J Med 1996;335:1275-80
- [26] Heng D., Sharples L.D., McNail K., Stewart S., Wreghitt T., Wallwork J. Bronchiolitis obliterans syndrome: incidence, natural history, prognosis factors. J Heart Lung Transplant 1998;17:1255-63
- [28] Estenne M, Maurer JR, Boehler A, et al. Bronchitis obliterans syndrome 2001: an update of the diagnostic criteria. J Heart Lung Transplant 2002; 21: 297

- [29,49] Gallo A, Tandon M, Alevizos I, Illei GG. The majority of MicroRNA detectable in serum und saliva is concentrated in exosomes. PLoS ONE 7(3)_e30679. Doi:10.1371/journal.pone.0030679
- [30] Boyd SD, et al. Everything you wanted to know about small RNA but were afraid to ask. Laboratory Investigation 2008; 88:569-578
- [31] Zhang W, Zhou T, Ma S-F, Machado RF, Bhorade SM, Garcia JGN. MicroRNAs implicated in dysregulation of gene expression following human lung transplantation. Transl Respir Med. 2013; 1(1): doi:10.1186/2213-0802-1-12
- [32,39] DiGiovine B, Lynch III JP, Martinez FJ, et al. Bronchoalveolar lavage neutrophilia is associated with obliterative bronchiolitis after lung transplantation. J Immunol 1996; 157: 4194
- [33] Transplantation ISfHaL. Annual Report of the International Society for Heart and Lung Transplantation. 1999
- [34] Herber S et al. Akute oder chronische Transplantat-Abstoßung? Fortschr Röntgenstr 2001; 173: 823-829
- [36] Meyer KC et al. Bronchoalveolar Lavage as a Diagnostic Tool. Semin Respir Crit Care Med 2007; 28: 546-560

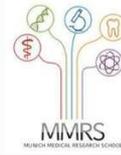
- [37] Meyer KC et al. Neutrophils, unopposed neutrophil elastase and alpha-1-antiprotease defenses following human lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:97-102
- [40] Slebos D-J, Postma DS, Koeter GH, et al. Bronchoalveolar lavage fluid characteristics in acute and chronic lung transplant rejection. *J Heart Lung Transplant* 2004; 23: 532
- [41] Ward C, Snell GI, Zheng L, et al. Endobronchial biopsy and bronchoalveolar lavage in stable lung transplant recipients and chronic rejection. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 84
- [43] Lu BS, Yu AD, Zhu X, et al. Sequential gene expression profiling in lung transplant recipients with chronic rejection. *Chest* 2006;130:847-854
- [44] Kirschner et al. (2011) Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PLoS ONE* 6:e24145.doi:10.1371/journal.pone.0024145
- [45] McDonald et al. (2011) Analysis of circulating miRNA: preanalytical and analytical challenges. *Clin. Chem.* 57, 833-840
- [46] Prichard et al. (2012) Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev. Res. (Phila.)* 5, 492-497
- [47] Blondal et al. (2013) Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods* 59, S1-6

- [48] Kirschner MB, Edelman JJB, Kao SCH et al. The impact of hemolysis on cell-free microRNA biomarkers. *Frontiers in Genetics*. (2013) doi: 10.3389/fgene.2013.00094
- [50] Rodriguez M, Silva J, López-Alfonso A et al. Different Exosome Cargo from Plasma/Bronchoalveolar Lavage in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Genes Chromosomes & Cancer*; 53:713-724 (2014)
- [51] Brock M, Rechsteiner T, Kohler M, Franzen D, Huber LC. Kinetics of microRNA Expression in Bronchoalveolar Lavage Fluid Samples. *Lung* (2015) 193:381-385. Doi: 10.1007/s00408-015-9719-5
- [52] Molina-Pinelo S, Suarez R, Pastor MD et al. (2012) Association between the miRNA signatures in plasma and bronchoalveolar fluid in respiratory pathologies. *Dis Markers* 32(4):221-230. Doi:10.3233/DMA-2011-0882



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Köhler, Johanna

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**Risikostratifizierung und frühzeitige Identifizierung
chronischer Allograftdysfunktion nach Lungentransplantation**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 26.07.2021

Johanna Köhler

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand