

Aus der Klinik für Nephrologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. L.C. Rump

***Donor-derived cell-free DNA* als nicht-invasiver Marker für
die Polyomavirusnephropathie bei Nierentransplantierten**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Lynn Koster

2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.- Prof. Dr. med. Johannes Stegbauer

Zweitgutachter: Univ.- Prof. Dr. med. Günter Niegisch

Zitat:

“Erfolg ist die Fähigkeit, von einem Misserfolg zum anderen zu gehen, ohne seine Begeisterung zu verlieren.” (Winston Churchill)

Zusammenfassung:

Die Nierentransplantation (NTX) zählt zu den erfolgreichen Therapien der terminalen, chronischen Nierenkrankheit. Durch die immunsuppressive Therapie nach der Nierentransplantation kann es jedoch zu verschiedenen infektiösen Komplikationen kommen. Die Infektion- oder Reaktivierung des BK-Virus (in 10-30 % der Fälle nach Transplantation) führt in 10 % der Fälle zu einer Polyomavirusnephropathie (BKN) mit bis zu 50 % Verlust des Transplantates. Die Diagnose kann nur durch eine invasive Transplantatnierenbiopsie gestellt werden. Eine spezifische Therapie gibt es bislang nicht, sie beruht auf der Reduktion oder Umstellung der Immunsuppression. Die donor-derived cell-free DNA (ddcf-DNA), also die zellfreie DNA des Spenders, die in der Hypothese, bei Transplantatschäden wie Infektionen (z. B. die BKN), Abstoßung des Transplantates oder mechanischen Schäden ins Blut des Empfängers freigesetzt wird, kann mittels droplet-digital PCR gemessen werden und wird zurzeit in der Transplantationsmedizin als nicht-invasiver Marker untersucht. In dieser Arbeit sollte die ddcf-DNA als nicht-invasiver Marker im Rahmen der BK-Virämie und der BKN bei Nierentransplantierten besser charakterisiert werden. Unter anderem sollte die Frage geklärt werden, ob die ddcf-DNA als nicht-invasiver Marker für den Übergang einer BK-Virämie zu einer BKN angewendet werden kann. Insgesamt wurden 118 Teilnehmer in die prospektive Studie eingeschlossen. Es entwickelten 33 Teilnehmer eine BK-Virämie (28,0 %). Insgesamt 7 dieser Teilnehmer (21,2 %) entwickelten eine BKN. Die ddcf-DNA war signifikant höher zum Zeitpunkt der höchsten BK-Virus-Kopien im Blut im Vergleich zu den ersten gemessenen BK-Virus-Kopien beim gleichen Teilnehmer. Bei abfallenden BK-Virus-Kopien im Blut war auch die ddcf-DNA wieder parallel regredient. Es konnte eine positive Korrelation zwischen den BK-Virus-Kopien im Blut und der ddcf-DNA (cp/ml) im Blut festgestellt werden. In der Frühphase der BK-Virämie wurden die Teilnehmer untersucht, die zwischen der erst gemessenen BK-Virämie mit den BK-Virus-Kopien in der zweiten Messung angestiegen sind (mit Abstand von 1,3 Monaten im Median zwischen den beiden Messungen), hier konnte in beiden Gruppen (BK-Virämie und BKN) kein signifikanter Anstieg der ddcf-DNA gezeigt werden. Zum Zeitpunkt einer Transplantatnierenbiopsie zeigte sich eine höhere ddcf-DNA bei den Patienten mit histologisch gesicherter zellulärer Abstoßung gegenüber der BKN oder dem Tubulusschaden. Die ddcf-DNA kann also nicht den Übergang einer BK-Virämie zu einer BKN voraussagen. Es besteht jedoch eine Korrelation zwischen der Viruslast und der ddcf-DNA. Die BK-Virämie scheint also eher unterschwellig zu einem Transplantatschaden zu führen, welcher nicht mit einem signifikanten Anstieg der ddcf-DNA im Übergang zu einer BKN einhergeht.

Summary:

Kidney transplantation (NTX) is one of the successful therapies for terminal, chronic kidney disease. However, immunosuppressive therapy after kidney transplantation can lead to various infectious complications. Infection or reactivation of the BK-Virus (in 10-30% of the cases after transplantation) leads to polyomavirus nephropathy (BKN) in 10% of cases with up to 50% loss of the graft. The diagnosis can only be made by an invasive graft kidney biopsy. So far, there is no specific therapy, it is based on the reduction or conversion of immunosuppression therapy. The donor-derived cell-free DNA (ddcf-DNA), which is hypothetically released into the recipient's blood, when transplant damage, such as infections (e.g. BKN), rejection of the transplant or mechanical damage occurs, can be measured by droplet-digital PCR and is currently being investigated as a non-invasive marker in transplantation medicine. The aim of this study was to better characterize ddcf-DNA as a non-invasive marker in the context of BK viremia and BKN in kidney transplant patients. Among other things, the question of whether ddcf-DNA can be used as a non-invasive marker for the transition from BK viremia to BKN should be clarified. A total of 118 participants were included in the prospective study. 33 participants developed BK viremia (28,0 %). A total of 7 of these participants (21.2 %) developed BKN. The ddcf-DNA was significantly higher at the time of the highest BK-Virus copies in the blood, compared to the first measured BK-Virus copies in the same participant. In the case of dropping BK-Virus copies in the blood, the ddcf-DNA was also regredient. There was a positive correlation between the BK-Virus copies in the blood and the ddcf-DNA (cp/ml) in the blood. In the early phase of BK viremia, the participants, who increased with the BK virus copies between the first measured BK viremia and the second measurement (with an interval of 1.3 months in the median between the two measurements) were examined. No significant increase in ddcf-DNA could be shown in both groups (BK viremia and BKN). At the time of transplant kidney biopsy, higher ddcf-DNA was found in patients with histologically confirmed T-cell mediated rejection than in those with BKN or tubulus necrosis. Thus, the ddcf-DNA cannot predict the transition from BK viremia to BKN. However, there is a correlation between viral load and ddcf-DNA. BK viremia therefore seems to lead to graft damage rather subliminally, which is not accompanied by a significant increase in ddcf-DNA in the transition to BKN.

Abkürzungsverzeichnis:

ABMR.....	Antibody mediated rejection
ADPKD.....	Autosomal dominate polyzystische Nierenerkrankung
ATG	Anti- Thymozytenglobulin
AVF	Arterio-venöse Fistel
BGA.....	Blutgasanalyse
BKN.....	Polyomavirusnephropathie
bp	Basenpaar
cf-DNA	cell-free-DNA
cff-DNA.....	fetale cell-free DNA
CKD.....	chronische Nierenerkrankung
CsA	Ciclosporin
ct-DNA.....	circulating -tumor DNA
ddef-DNA	donor-derived cell-free-DNA
ddPCR.....	droplet-digital PCR
EBV	Epstein Barr Virus
EDTA.....	Ethylendiamintetraessigsäure
ESP.....	Extendet Senior Program
ETKAS.....	Eurotransplant kidney allocation system
FGF 23	fibroblast growth factor 23
FK-506.....	Tacrolimus
GFR.....	Glomeruläre Filtrationsrate
GGT	Gamma-GT
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT.....	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human Leukozyt Antigen
ICH.....	Immunhistochemie
IFN γ	Interferon-gamma
IL-15	Interleukin 15
IL-2	Interleukin 2
IMPDH.....	Inosin monophosphat Dehydrogenase
INR.....	International hazard ratio
ivIG	intravenöse Immunglobuline
KIZ.....	Kalte Ischämiezeit
MMF	Mycophenolat Mofetil
MPA.....	Mycophenolsäure
NET.....	Neutrophil extracellular trap
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NGS	Next Generation sequencing

NTX	Nierentransplantation
PCP	Pneumocystis jirovecii
PCR	Polymerase chain reaction
PTH	Parathyroid hormone
PTLD	posttransplant lymphoproliferative disorders
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
REAL	Recipient oriented allocation
SNP's	single nucleotid polymorphisms
TCMR	T-cell mediated rejection
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TNF α	Tumornekrosefaktor
UKD	Universitätsklinikum Düsseldorf
VZV	Varizella Zona Virus
WIZ	Warme Ischämiezeit

Inhaltsverzeichnis:

1	EINLEITUNG	1
1.1	Chronische Nierenkrankheit.....	1
1.2	Nierentransplantation.....	2
1.2.1	Allgemein	2
1.2.2	Komplikationen nach Nierentransplantation	3
1.2.3	Immunsuppression nach Nierentransplantation	6
1.2.4	(Transplantat-) Nierenbiopsie	10
1.3	Polyomaviren.....	11
1.3.1	BK-Virus	11
1.3.2	Polyomavirusnephropathie	12
1.4	Cell-free DNA	17
1.4.1	Definition und Eigenschaften	17
1.4.2	Ursprung der cf-DNA	18
1.4.3	Anwendungsbereiche der cf-DNA außerhalb der Transplantationsdiagnostik	19
1.4.4	Donor-derived cell-free DNA	19
1.5	Ziel und Fragestellung	23
2	MATERIAL UND METHODEN	25
2.1	Studiendesign.....	25
2.1.1	Patientenkollektiv	25
2.1.2	Einschluss- und Ausschlusskriterien.....	25
2.1.3	Einschlussuntersuchungen	25
2.1.4	Follow-up.....	26
2.1.5	Bestimmung der Laborparameter	27
2.1.6	Abnahme und Auswertung der ddcf-DNA	27
2.2	Gruppenaufteilung.....	29
2.3	Statistik	30

2.4	Ethikvotum	30
3	ERGEBNISSE	31
3.1	<i>Baseline</i> charakteristika	31
3.2	Verlauf der ddcf-DNA nach Nierentransplantation	35
3.3	Spender-, Empfänger- und Transplantationscharakteristiken und der Effekt auf die ddcf-DNA	37
3.4	Level der ddcf-DNA bei Teilnehmern mit oder ohne Komplikationen.....	42
3.5	Ergebnisse der ddcf-DNA in Bezug auf das BK-Virus	43
3.5.1	ddcf-DNA und Kreatinin im Vergleich an der ersten dokumentierten BK-Virämie und der höchsten BK-Virämie	43
3.5.2	ddcf-DNA und Kreatinin im Vergleich an der höchsten BK-Virämie und der negativen BK-Virämie (negativ oder < 500 Kopien)	46
3.5.3	Korrelation zwischen ddcf-DNA und BK-Virus Kopien.....	47
3.5.4	Korrelation zwischen ddcf-DNA und Kreatinin	48
3.5.5	Verlauf der ddcf-DNA und des Kreatinins bei steigenden BK-Viren in der BK-Virämie Gruppe im Vergleich zur Polyomavirusnephropathie Gruppe	49
3.6	Donor-derived cell-free DNA zum Zeitpunkt der Transplantatnierenbiopsie	52
3.6.1	Vergleich der ddcf-DNA nach Biopsie Befund	52
3.6.2	Vergleich der ddcf-DNA bei replikativer BK-Virämie nach Biopsie Befund	53
4	DISKUSSION	55
4.1	Patientenkollektiv	55
4.2	Zusammenhang der Charakteristiken und der ddcf-DNA	56
4.3	Zeitlicher Verlauf der ddcf-DNA nach Transplantation	58
4.4	ddcf-DNA und BK-Virämie/ BK-Nephropathie	58
5	SCHLUSSFOLGERUNG	62

6	LITERATURVERZEICHNIS.....	64
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	75
8	TABELLENVERZEICHNIS.....	79

1 Einleitung

1.1 Chronische Nierenkrankheit

Die chronische Nierenkrankheit (CKD) definiert sich ab einer glomerulären Filtrationsrate (GFR) von $< 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ Körperoberfläche über einen Zeitraum von mindestens drei Monaten. Die CKD ist in fünf Stadien unterteilt, die durch die *Kidney Disease Improving Global Outcome KDIGO-Guidelines* von 2012 festgelegt sind. Unterteilt werden die Stadien nach der Ursache der Nierenkrankheit, der GFR und der Albuminurie (A1-A3) (KDIGO CW 2012).

		Albuminurie mg/g		
		A1 < 30	A2 30-300	A3 > 300
GFR ml/min/1,73 m ²				
	G1 > 90	Keine Funktionseinschränkung		
G2 60-89	Geringgradige Funktionseinschränkung			
G3a 45-59	Gering- bis mittelgradige Funktionseinschränkung			
G3b 30-44	Mittel- bis hochgradige Funktionseinschränkung			
G4 15-29	Hochgradige Funktionseinschränkung			
G5 < 15	Nierenversagen			

Grün: geringes Risiko; gelb: moderat erhöhtes Risiko; orange: hohes Risiko; rot: sehr hohes Risiko

Abb. 1: Stadien der chronischen Nierenkrankheit. Modifiziert nach KDIGO CW 2012.

In der gesamten Bevölkerung liegt die Prävalenz der chronischen Nierenkrankheit zwischen 10-15 % (Schneider et al. 2018). Durch die eingeschränkte Nierenfunktion kommt es im menschlichen Organismus zu multiplen Anpassungs- und Umbauvorgängen im Körper. Diese können jedoch lange Zeit stumm verlaufen und die Diagnose der Nierenkrankheit hinauszögern.

Zu den häufigsten Erkrankungen, die zur chronischen Niereninsuffizienz führen, zählen in Deutschland der Diabetes mellitus (31 %) und die vaskulären Erkrankungen mit der Hypertonie und der daraus resultierenden hypertensiven Nephropathie (22 %) (Keller and Geberth 2010).

Ab einer GFR von $< 15 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ sollte eine Nierenersatztherapie mittels Hämodialyse, Peritonealdialyse oder Nierentransplantation in Erwägung gezogen werden.

1.2 Nierentransplantation

1.2.1 Allgemein

Die Geschichte der Nierentransplantation beginnt bereits im Jahre 1902 mit einer Nierentransplantation zwischen zwei Hunden durch Emerich Ullmann aus Wien (Benjamens et al. 2020). Die erste erfolgreiche Nierentransplantation gelang in Boston, Massachusetts im Jahre 1954 durch Dr. Joseph Murray, mit einer Nierentransplantation zwischen zwei eineiigen Zwillingenbrüdern (Calne 2005). 1962 gelang Dr. Murray dann erstmals eine Nierentransplantation zwischen zwei nicht verwandten Personen mithilfe der neu entwickelten Immunsuppressiva. Einen weiteren Meilenstein stellte die Entdeckung des HLA-Systems durch den französischen Wissenschaftler Jean Dausset im Jahre 1965 dar (Primc et al. 2020). Seit 1970 gehört die Nierentransplantation offiziell zur etablierten Therapieoption der terminalen Niereninsuffizienz. Aktuell werden circa 27,5 % der Patienten mit chronischer Nierenkrankheit durch eine Nierentransplantation behandelt.

Auf der Warteliste für eine Nierentransplantation standen im Status T (= transplantabel) in Deutschland im Jahre 2022 6.364 Patienten (statistics.eurotransplant.org 2023a). Im Jahre 2022 sind 339 Patienten auf der Warteliste für eine Nierentransplantation verstorben (statistics.eurotransplant.org 2023c). Die Allokation erfolgt in Deutschland zentral über Eurotransplant. Es gibt mehrere Allokationsverfahren, eingeteilt in ETKAS (*Eurotransplant kidney allocation system*), Rescue-Allokation, ESP (*Extended Senior Programm*) und REAL (*Recipient oriented allocation*). Die Organvergabe wird nach Wartezeit, HLA-Kompatibilität, Blutgruppe, räumlicher Distanz und der Zusage zu den verschiedenen Alternativen zu ETKAS geregelt (Keller and Geberth 2010). Als eine der

Alternativen dient die Lebendspende. Hierfür muss keine Blutgruppenkompatibilität bestehen (Cozzi et al. 2022).

In Deutschland wurden im Jahre 2022 1.966 Nieren transplantiert. Davon waren 535 Lebendspenden, also 27,2 % (statistics.eurotransplant.org 2023b). Die Nierentransplantation zeigt einen Vorteil in Bezug auf das Überleben gegenüber den chronischen Dialysepatienten. Die Langzeit-Mortalitätsrate nach NTX ist 48-82 % geringer (Wolfe et al. 1999). Es besteht zudem eine bessere Kosteneffizienz. In den Vereinten Nationen kostet eine Dialysebehandlung pro Patienten circa 121.000 US-Dollar pro Jahr. Eine NTX einmalig 145.000 US-Dollar. Zusätzlich zu den Kosten der Immunsuppressiva käme man nach fünf Jahren auf 605.000 US-Dollar an Ausgaben an der Dialyse versus 273.000 US-Dollar nach einer NTX (Held et al. 2016). Die Lebensqualität ist gegenüber den chronischen Dialysepatienten ebenfalls gebessert (Kostro et al. 2016).

1.2.2 Komplikationen nach Nierentransplantation

Neben den Vorteilen der Nierentransplantation, bestehend aus einer besseren Überlebensrate im Gegenzug zur Dialyse, einer besseren Lebensqualität und einer geringeren Kosteneffizienz, zeigen sich jedoch als Nachteile durch die Immunsuppression, eine höhere Rate an Infektionen – unter anderem opportunistische Infektionen – und eine höhere Tumorraten. Es kann ebenfalls zu per- und postoperativen Komplikationen wie Wundheilungsstörungen, Blutungen und Lymphozelen kommen (Agrawal, Ison, and Danziger-Isakov 2022).

Die infektiösen Komplikationen stellen weiterhin die führende Todesursache nach Nierentransplantation dar (Behzad et al. 2020). Die akute Harnwegsinfektion ist die am häufigsten auftretende, bakterielle Infektion nach Nierentransplantation (Hamid et al. 2020). Je nach Land tritt eine akute Harnwegsinfektion in 35-79 % der Fälle nach der Transplantation auf. Escherichia Coli ist das Bakterium, welches in den meisten Fällen für die Harnwegsinfektion verantwortlich ist (70-90 %). Weitere Pathogene stellen andere Enterobakterien, Enterokokken, Staphylokokken und Pseudomonaden dar (Behzad et al. 2020). Die steigende Anzahl der multiresistenten Erreger, vor allem bei

immunsupprimierten Patienten mit rezidivierenden Infektionen, stellen ein zunehmendes Problem in der korrekten Therapie dieser Infektionen dar (Rostkowska et al. 2020). Neben der führenden bakteriellen Harnwegsinfektion sind auch andere bakterielle Infektionen mit klassischen Erregern vorzufinden. Hierzu zählen eine Pneumonie, eine Meningitis oder im frühen post-operativen Stadium eine Katheter-assoziierte Infektion oder Wundinfektionen. Durch die immunsuppressive Therapie treten auch opportunistische Infektionen auf. Führend zu erwähnen gilt hier die Pilzinfektion mit *Pneumocystis jirovecii* (PCP), welche zu einer schweren Pneumonie führen kann. Aber auch andere Erreger wie zum Beispiel Mykobakterien, Nocardien oder Aspergillen können nach Nierentransplantation zu opportunistischen Infektionen führen und sind oft schwer zu diagnostizieren (Keller and Geberth 2010). Auch virale Infekte, vor allem immunmodulierende Viren wie das Cytomegalievirus (CMV), das Epstein-Barr-Virus (EBV), das Herpes-Simplex-Virus (HSV), das Varizella-Zoster-Virus (VZV) und das in dieser Studie zentrale BK-Virus (BK), treten oft im Zeitrahmen von vier Wochen bis zu einem Jahr nach Transplantation auf (Keller and Geberth 2010). Diese Viren können unter der Immunsuppression zu schwerwiegenden multifokalen oder systemischen Infektionen führen, welche oft intravenös behandelt werden müssen. Das EBV kann zudem posttransplantations-lymphoproliferative Erkrankungen (PTLD) hervorrufen (Afify et al. 2023). Bei schweren Infektionen muss die immunsuppressive Therapie oft reduziert werden, um eine effektive Behandlung zu gewährleisten. Hierdurch wird in der Folge das Risiko für eine Abstoßung des Nierentransplantats wieder erhöht. Um die Infektionsrate post-Nierentransplantation zu verringern, wird bereits intraoperativ vor Induktion eine antibiotische Therapie (zum Beispiel ein Cephalosporin der 3. Generation) gegeben (Orlando et al. 2010). Zusätzlich wird über einen Zeitraum von circa sechs Monaten eine prophylaktische Therapie gegen PCP mit Cotrimoxazol verabreicht (Park et al. 2020). Die Dauer der Prophylaxe ist jedoch zwischen den Transplantationszentren unterschiedlich. Je nach Cytomegalievirus-Status des Spenders und Empfängers erhalten die Empfänger, je nach Risikokonstellation, zusätzlich prophylaktisch Valganciclovir, adaptiert an die Nierenfunktion (Shi et al. 2021). Einem Soor des Mund- und Rachenraumes kann mittels Amphotericin B oder Fluconazol prophylaktisch vorgebeugt werden (Antunes et al. 2014).

Neben den infektiösen Komplikationen haben Personen nach Nierentransplantation gegenüber der generellen Bevölkerung ein zwei- bis vierfach erhöhtes Risiko, an einem

malignen Tumor zu erkranken und zu versterben. Die Inzidenzrate beträgt 9-10 % für einen soliden Tumor nach zehn Jahren der Immunsuppression nach NTX (Buxeda et al. 2021). Es besteht ein zwei- bis fünffach erhöhtes Risiko für Hauttumore und urologische Tumore nach Transplantation. Das Risiko für Virus-assoziierte lymphoproliferative Erkrankungen oder Karposi-Syndrome ist nach NTX hundertfach erhöht (Piselli et al. 2013). Hauttumore verbleiben die häufigsten malignen Erkrankungen nach NTX. Es besteht eine direkte Korrelation zur Intensität der Immunsuppression und der Entwicklung von malignen Tumoren. Eine höher dosierte immunsuppressive Therapie mit ATG, im Rahmen der Induktionstherapie oder einer Abstoßung, erhöht das Risiko für eine Tumorerkrankung. Auch die Calcineurininhibitoren (CNI) können durch Stimulation des *Transforming Growth Factor beta* (TGF- β) das Tumorwachstum begünstigen (Medeiros and Merhi 2021). Mtor-Inhibitoren (mTORi) haben dagegen eine inhibierende Wirkung auf Hauttumorzellen gezeigt. Ein Wechsel der immunsuppressiven Therapie wird deshalb oft nach der Diagnose in Erwägung gezogen (Geissler 2015). Die Therapie der malignen Tumore ist nach Nierentransplantation schwierig. Oft ist ein Wechsel oder eine Reduktion der immunsuppressiven Therapie notwendig, um das Wachstum des Tumors oder ein Rezidiv einzuschränken. Hierdurch erhöht sich erneut das Abstoßungsrisiko mit Verlust des Transplantates. Auch haben viele Chemotherapien eine nephrotoxische Wirkung und können somit nicht – oder nur in geringerer Dosis – angewendet werden.

Das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen nach Nierentransplantation ist gegenüber den chronischen Dialysepatienten zwar signifikant reduziert, dennoch verbleibt es gegenüber der generellen Population erhöht. In der fünften Dekade besteht ein 50-faches Risiko nach NTX, an einem kardiovaskulären Event zu versterben, gegenüber der generellen Population (Birdwell and Park 2021). Hauptrisikofaktor ist das Ausmaß an kardiovaskulären Vorerkrankungen vor der Transplantation (Keddis, Bhutani, and El-Zoghby 2014). Hierzu zählen klassischerweise die Hypertonie, die Dyslipidämie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus und Adipositas. Oft kommt es an der Dialyse durch die Volumenüberladung zusätzlich zur linksventrikulären Hypertrophie und einer Dysregulation des Kalzium-Phosphathaushalts mit oxydativem Stress. Nach der Transplantation können zusätzlich ein Posttransplantationsdiabetes und die Nebenwirkungen der immunsuppressiven Therapie hinzukommen. Führend zu erwähnen gilt hier das Risiko für eine Hypertonie unter CNI und Steroiden, Diabetes unter Steroiden

CNI und mTORi, Gewichtszunahme unter Steroiden sowie eine Dyslipidämie unter Steroiden und mTORi (Keddis, Bhutani, and El-Zoghby 2014). Ein regelmäßiges Screening auf kardiovaskuläre Erkrankungen muss auch nach Transplantation weiterhin erfolgen, da eine hohe Morbiditäts- und Mortalitätsrate besteht (Birdwell and Park 2021).

Zu den weiteren Komplikationen nach erfolgter Nierentransplantation zählen ebenfalls die metabolischen Erkrankungen. Führend zu erwähnen gilt der Posttransplantationsdiabetes, der in 7-30 % der Fälle nach Nierentransplantation auftritt. Bis zu 60 % der zuvor Nicht-Diabetiker erfahren eine therapiebedürftige Hyperglykämie nach der NTX (Cohen et al. 2020). Hierdurch erhöht sich dann, wie bereits oben erwähnt, das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse. Osteopenie und Osteonekrosen können vermehrt nach Nierentransplantation auftreten. Durch die Immunsuppression mittels Kortikosteroiden kommt es zu einer Osteopenie und dem erhöhten Frakturrisiko. Die Osteonekrosen treten in bis zu 15 % nach Nierentransplantation auf und sind vor allem der Therapie mit Kortikosteroiden geschuldet (Keller and Geberth 2010). Bei manchen Nierentransplantierten kommt es durch einen tertiären Hyperparathyreoidismus, also einer Autonomie der Nebenschilddrüse, zu einer Hyperkalzämie durch Sekretion von PTH und Abbau des Knochens. Hierdurch wird die Osteopenie weiter begünstigt. Auch die Hypophosphatämie, hervorgerufen durch den Hyperparathyreoidismus und den persistierend erhöhten *fibroblast growth factor 23* (FGF 23), reduziert die Aktivität der Osteoblasten und ruft somit eine Osteomalazie und eine Muskelschwäche hervor (Nel and Epstein 2016).

1.2.3 Immunsuppression nach Nierentransplantation

Übersicht

Die immunsuppressive Therapie zählt zu der notwendigen und dauerhaften Therapie nach Transplantation, um eine akute Rejektion des Transplantates zu vermeiden. Initial erhalten die Patienten eine Induktionstherapie, die meistens präoperativ verabreicht wird. Sie besteht aus einer Kombination aus hochdosierten Glukokortikosteroiden und einer Antikörper-vermittelten Immunsuppression wie zum Beispiel Anti-Thymozytenglobulin (ATG) oder Basiliximab (Anti- CD25, einem Anti-IL-2 Rezeptor) (Kesiraju et al. 2014). Nach der Transplantation erfolgt eine Erhaltungsimmunsuppression, bestehend aus einer

getrippeelten oder dualen Kombinationstherapie. Standardmäßig enthält die dreifache Immunsuppression einen CNI-Hemmer, MMF und Glukokortikosteroide. Bei der doppelten Immunsuppression wird auf eine dauerhafte Gabe von Glukokortikosteroiden verzichtet. Neben den eigenständigen Nebenwirkungen der verschiedenen Immunsuppressiva, kommt es insgesamt, unabhängig der Präparate, zu einem erhöhten Infektionsrisiko und einem erhöhten Tumorrisiko (Redondo-Pachón et al. 2023).

Calcineurininhibitoren

Die Calcineurininhibitoren werden seit 1980 in der Therapie der Rejektionsprophylaxe nach Organtransplantation eingesetzt (Ume, Wenegieme, and Williams 2021). Der erste Calcineurininhibitor Ciclosporin (CsA) wurde im Jahre 1970 aus dem Boden-Pilz *Tolypocladium inflatum* extrahiert. Das Tacrolimus (FK-506) wurde später, um 1985, ebenfalls aus einem Keim des Bodens, dem *Streptomyces tsukubaensis*, gewonnen. Die immunsuppressive Wirkung der Calcineurininhibitoren ist durch eine Interaktion mit den T-Zell-Lymphozyten durch Inhibieren des Calcineurin zu erklären (Ume, Wenegieme, and Williams 2021). Calcineurin ist eine Ca^{2+} /Calmodulin-aktivierte Protein-Phosphatase (Rusnak and Mertz 2000), die in verschiedenen Zellwegen zum Einsatz kommt. Die Calcineurininhibitoren binden an Immunophilin und können somit das Calcineurin inhibieren. Durch die Inhibition des Calcineurin wird das Protein NFAT1c exprimiert und dieses blockt dann die Transkription von Interleukin-2 (IL-2) und wirkt somit immunsuppressiv (Ume, Wenegieme, and Williams 2021). Die Calcineurininhibitoren gehören zur Basis der immunsuppressiven Therapie nach Nierentransplantation (Feldkamp and Linkermann 2013).

Mycophenolat Mofetil

Die Mycophenolsäure (MPA) bezeichnet den aktiven Metaboliten des Mycophenolat Mofetil (MMF). MPA wurde erstmalig 1896 aus dem Pilz *Penicillium brevicompactum* extrahiert und als Antibiotikum verbreitet. Erst später in den 1960er Jahren wurde seine anti-tumorale Wirkung im Tierexperiment bewiesen. Noch später wurde die MPA zur Behandlung von Leukämie oder Lymphomen eingesetzt. Das Wissen um die MPA in der

immunsuppressiven Therapie begann um 1969. Die MPA ist ein selektiver Inhibitor von Inosin monophosphat Dehydrogenase (IMPDH), welches in der Produktion von de novo-Purinen und somit der Proliferation von T- und B-Lymphozyten verantwortlich ist. (Kaltenborn and Schrem 2013). Durch den Einsatz der MPA wird diese Strecke gehemmt und die Lymphozyten in ihrer Funktion der Immunantwort gestört.

Steroide

Die Glukokortikoide wirken durch eine Hemmung der T-Lymphozyten immunsuppressiv. Durch die Inhibition der Mitose der Lymphozyten und die Reduktion der Ausschüttung von Zytokinen durch die Inhibition des Effekts von dem *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- κ B) auf den Zellkern, kommt es primär zur Reduktion der Zytokine Interleukin-1 und Interleukin-2, aber auch vielen weiteren immunmodulierenden Zytokinen wie zum Beispiel dem Tumornekrosefaktor (TNF α) und dem Interferon-gamma (IFN γ) (Ganong et al. 2012). Die Immunreaktion in der Zelle wird dadurch beeinflusst. Auch die Zellmembran wird durch hochdosierte Steroide in ihrer Struktur verändert und die oberflächigen Proteine werden in ihrer Funktion gestört (Keller and Geberth 2010). Zusätzlich kommt es zu einer Umverteilung der Lymphozyten aus der Blutbahn ins lymphatische Gewebe. (Kuhlmann et al. 2008).

m-Tor-Inhibitoren

Der erste m-Tor-Inhibitor, das Sirolimus (Rapamycin), ist ein Macrolidantibiotikum. Es wird durch den Pilz *Streptomyces hygroscopicus* produziert (Keller and Geberth 2010). Seine immunsuppressive Wirkung besteht aus der Interaktion mit dem G1-Phase-Zyklus der T-Zelle, indem das m-Tor (*mamalian target of Rapamycin*) gehemmt und die Zellmitose somit inhibiert wird (Kuhlmann et al. 2008). Zusätzlich zum Sirolimus wurde später Everolimus im Jahre 2004 zugelassen. Im Gegensatz zum Sirolimus ist das Everolimus nicht auf die T-Zellen limitiert, sondern hemmt generell proliferierende Zellen.

Basiliximab

Basiliximab ist ein chimärer monoklonaler Antikörper, der mit Spezifität und hoher Affinität gegen das Antigen CD25 der α - Kette des IL2-Rezeptors der aktivierten T-Zellen, gerichtet ist. Durch Bindung des Antikörpers wird die Aktivierung der T-Lymphozyten gehemmt. Nebenbei wird auch die Proliferation von mononuklearen Zellen im peripheren Blut durch Hemmung von Interleukin 15 (IL-15) geblockt (Chapman and Keating 2003). Die Gabe erfolgt an Tag 0 und 4 der Transplantation mit jeweils 20 mg und der Rezeptor wird bis zu 45 Tage gehemmt. Das Basiliximab gehört somit zur Induktionstherapie (Augustine 2018).

Anti-Thymozytenglobulin

Hierbei handelt es sich um polyklonale IgG Antikörper gegen menschliche Thymozyten oder andere Lymphozyten (Siddiqui et al. 2019), die durch die Immunisierung von Kaninchen mit menschlichen Thymozyten hergestellt werden (Harrison et al. 2014). Sie wirken hauptsächlich T-Lymphozyten depletierend, indem sie an diese binden und durch Opsonisierung in der Milz abgebaut werden. Der Effekt hält zwischen zwei bis drei Monaten an. ATG wird ebenfalls in der Therapie der akuten Transplantat-Rejektion angewendet (Augustine 2018).

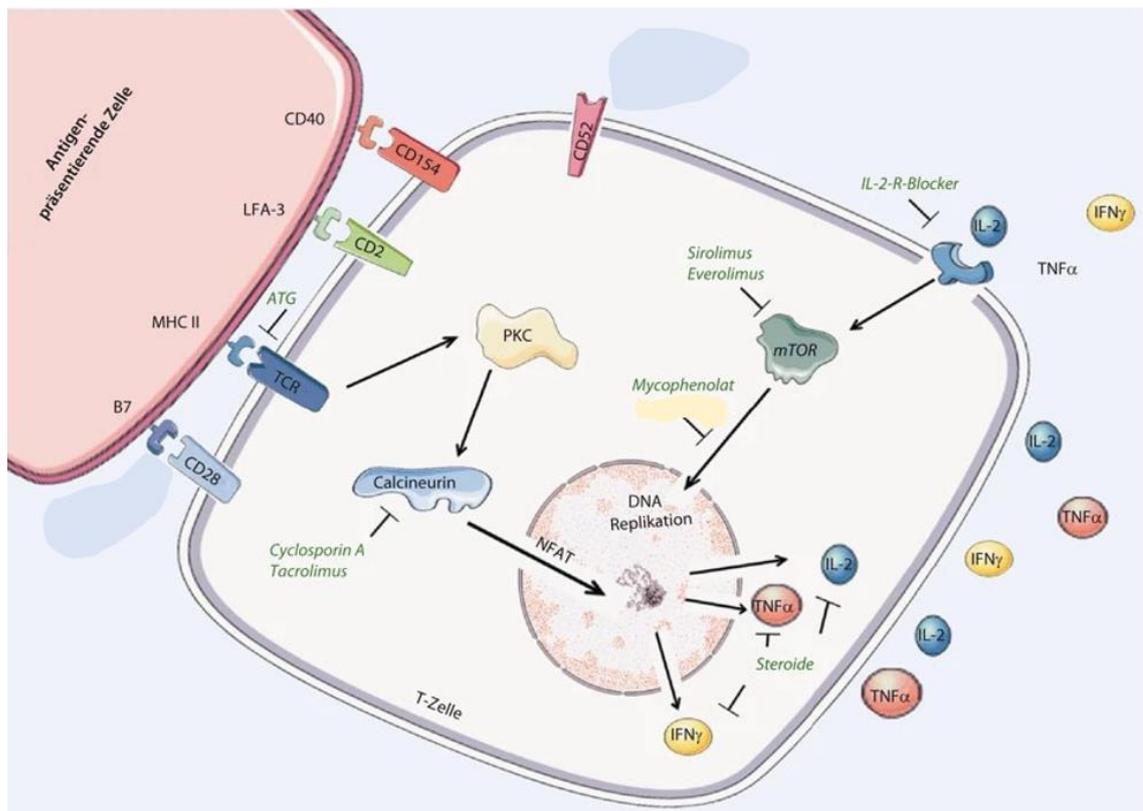


Abb. 2: Wirkungsmechanismen der verschiedenen Immunsuppressiva. Modifiziert nach Feldkamp et al. (2013).

1.2.4 (Transplantat-) Nierenbiopsie

Die Nierenbiopsie gehört weiterhin zum Gold-Standard der Diagnosesicherung der verschiedenen Nierenkrankheiten (Hogan, Mocanu, and Berns 2016). Auch nach der Transplantation ist die Transplantatnierenbiopsie ein alltäglicher Eingriff, der zur invasiven Diagnostik einer verschlechterten Transplantatfunktion herangeführt wird. Zur Untersuchung wird ein circa 1cm langes Biopsat aus der Nierenrinde entnommen. Hier liegen anatomisch die Glomeruli. Das Biopsat wird mittels eines automatisierten Biopsie-Gerätes und einer Hohlnadel mit einer Größe von 16 oder 18-Gauge entnommen. Zu den absoluten Kontraindikationen der (Transplantat-) Nierenpunktion zählen eine Einschränkung der Blutgerinnung entweder spontan, oder durch Einnahme von medikamentösen Antikoagulantien. Hier wird ein *international normalized ratio* (INR) von $>1,3$ als Hauptrisikofaktor angesehen. Eine verlängerte Blutungszeit durch eine Thrombozytopenie von $< 60.000/\mu\text{l}$ wird ebenfalls als hohes Risiko einer postinterventionellen Blutung und somit Kontraindikation betrachtet (Ahmad 2004). Im

Rahmen der Nierenbiopsie kommt es in 1,5 % der Fälle zu einer schwerwiegenden Komplikation (Fatthy et al. 2022). Als Hauptkomplikation der Nierenbiopsie zählt die Blutung, die bis hin zu einer Bluttransfusion, einer interventionellen radiologischen Embolisation der zuführenden Gefäße, der Nephrektomie und zum Tod führen kann (Morgan et al. 2016). Des Weiteren können arterio-venöse Fisteln (AVF) in der Niere, Verletzung der umliegenden Organe, Infektionen bis hin zur Sepsis sowie anaphylaktische Reaktionen auf die lokalen Anästhetika auftreten. Als unabhängige Risikofaktoren für die oben aufgeführten schwerwiegenden Komplikationen zählen eine GFR < 30ml/min/1,73m², ein Alter von > 65 Jahren und eine Anämie (Fatthy et al. 2022). Als absolute Indikation für eine Transplantatnierenbiopsie zählt der klinische und laborchemische Verdacht auf eine akute oder chronische Abstoßung des Transplantates, der Verdacht auf die Rekurrenz der Grunderkrankung im Transplantat oder steigende BK-Virus-Kopien (Metter and Torrealba 2020).

1.3 Polyomaviren

1.3.1 BK-Virus

Das BK-Virus gehört zur Gruppe der menschlichen Polyomaviren (*Polyomaviridae hominis*), ebenso wie das JC-Virus und das SV40-Virus. Es handelt sich um ein kleines (40-44 nm), unverhülltes Doppelstrang-DNA-Virus (Furmaga et al. 2021). Das Virus kann in sechs Genotypen unterteilt werden, die je nach Polymorphismus des viralen Kapselproteins 1 und der nicht-kodierenden Kontrollregion unterteilt werden (Sharma et al. 2016). Das BK-Virus wurde erstmalig 1971 im Urin eines nierentransplantierten Patienten nachgewiesen, der an einer Ureterstenose litt. Der Name BK entspricht den Initialen des Patienten, bei dem das Virus erstmalig entdeckt und beschrieben wurde (Ambalathingal et al. 2017). Biologisch gesichert wurde das Virus aber erst im Jahre 1993 (Kant et al. 2022). Die Infektion findet im Kindesalter, gemittelt im Alter von vier bis fünf Jahren, durch Tröpfcheninfektion, oro-fäkale Transmission, Schmierinfektionen mit Urin oder auch durch vertikale Transmission statt (Saleh et al. 2020). Ungefähr 46-94 % der erwachsenen Population besitzt Antikörper gegen das BK-Virus (Khaled 2004). Das Virus verbleibt nach der Primo-Infektion latent im Körper in den Tubulus-Epithelzellen der ableitenden Harnwege, in den B-Lymphozyten und im zentralen Nervensystem. (Khaled 2004). Die Primo-Infektion verläuft meistens asymptomatisch, kann jedoch mit

einem respiratorischen Infekt einhergehen (Randhawa and Brennan 2006). Nach der Nierentransplantation kommt es durch die immunsuppressive Therapie in circa 30-40 % der Fälle zur Virurie, entweder durch Reaktivierung des BK-Virus unter Immunsuppression oder durch eine de novo-Infektion durch die Spenderniere (Hariharan 2006). In 10-30 % der Fälle ist das BK-Virus auch im Blut mittels PCR nachweisbar (Kant et al. 2022). Eine klinische Symptomatik gibt es meistens bei aktiver BK-Virämie nicht. Die Replikation des Virus geht mit einer verschlechterten Transplantatfunktion einher, welche durch einen Anstieg des Serum-Kreatinin beobachtet werden kann. Eine persistierende Viruslast von > 1000 K/ml über einen Zeitraum von drei Wochen wird als klinisch relevante BK-Virus-Replikation eingestuft (Hirsch and Randhawa 2019). Ab einer Viruslast von 10.000 K/ml kann man von einem aktiven Befall der Transplantatniere und von einer möglichen BKN sprechen. Bei 35 % der Personen mit bestätigter BKN lagen die BK-Virus-Kopien jedoch bei < 10.000 K/ml (Krejci et al. 2018). Das BK-Virus kann in der Transplantatniere bei Entwicklung einer BKN einerseits zur interstitiellen Nephritis, zur hämorrhagischen Zystitis (vor allem bei stammzelltransplantierten Personen) oder zur Ureterstenose führen (Khaled 2004).

1.3.2 Polyomavirusnephropathie

Nach der Nierentransplantation kommt es in 1-10 % der Fälle zu einer Polyomavirusnephropathie (Gately et al. 2023). Das BK-Virus gelangt durch *calveolin*-bedingte Endozytose nach Andocken an die Rezeptoren der Zellmembran der Tubulusepithelzellen in die Zelle. Die entstandenen Vesikel werden anschließend in Form von Microtubuli in der Zelle Richtung Zellkern transportiert. Im endozytoplasmatischen Retikulum werden die Vesikel dekapsidiert. Danach kommt es zum Eindringen der Partikel in den Zellkern durch die nuklearen Poren. Hier wird die Doppelstrang-DNA des BK-Virus mittels der Enzyme der Tubuluszelle transkribiert. Die neu entstandenen viralen Proteine werden dann ins Zytoplasma freigegeben und danach erneut mittels nuklearer Sequenzen in den Zellkern integriert. Durch die Zusammensetzung mit den viralen Kapsiden, die sich im Zellkern befinden, kommt es zur Ansammlung der Partikel in der Zelle und schließlich zur Lyse (Solis et al. 2019). Bei der Polyomavirusnephropathie kommt es daher durch die Replikation der BK-Viren im Tubulusepithel der Transplantatniere zu einer interstitiellen Nephritis. Diese wird durch

die Ansammlung von verschiedenen Zellen des Immunsystems im Gebiet der Zelllyse ausgelöst. Zunächst werden durch eine unspezifische Immunantwort vor allem mittels *natural-killer-Zellen* die BK-Viren angegriffen (Comoli et al. 2006). Eine Studie von (Koyro et al. 2021) hat hinsichtlich der *natural-killer-Zellen* herausgefunden, dass diese durch eine Überexpression von HLA-F an den BK-Virus infizierten Zellen, die das Protein KIR3DS1 an den *natural-killer-Zellen* binden, aktiviert werden. Danach kommt es zu einer Ansammlung von neutralisierenden Antikörpern und HLA-spezifischen T-Lymphozyten. Durch die Zerstörung der infizierten Tubuluszellen, durch die neutralisierenden Antikörper, werden die Virus-Partikel freigesetzt und es kommt somit zur Aktivierung von CD4-T-Lymphozyten als auch von CD8 zytotoxischen Zellen. Diese führen eine Perforin-gesteuerte Lyse der infizierten Zelle durch (Comoli et al. 2006). BK-spezifische T-Zellen spielen in der Bekämpfung des BK-Virus ebenfalls eine führende Rolle (Krejci et al. 2018). Durch die Lyse der Zellen wird die donor-derived cell-free DNA freigesetzt und kann im Blut und Urin nachgewiesen werden (Oellerich et al. 2021). Im Verlauf kann die interstitielle Nephritis bis zur Tubulusatrophie und interstitiellen Fibrose voranschreiten und mit einer dauerhaften Transplantatverschlechterung einhergehen (Funahashi 2021). Früher kam es zum Verlust des Transplantates durch die Polyomavirusnephropathie (BKN) in ungefähr 50 % der Fälle (Chong et al. 2019). Heutzutage erreichen diese Zahlen immer noch bis zu 15 % (Kant et al. 2022). Der Gold-Standard für die Diagnose der BKN ist weiterhin die Transplantatnierenbiopsie mit mikroskopischen Untersuchungen des Gewebes (Burgos et al. 2010). Aber auch die histopathologische Diagnose ist erschwert, da das Virus nicht ubiquitär im Tubulus-Apparat auftritt, sondern nur fokal, sodass es falsch-negative Ergebnisse geben kann, wenn in der Biopsie kein infiziertes Material gewonnen wurde. Zur besseren Sensitivität wird daher empfohlen, jeweils zwei Biopsie-Stanzen zu entnehmen (Krejci et al. 2018). Histopathologisch sind in der Standard-H&E-Färbung klassischerweise Virus-Einschlusskörperchen zu finden. Diese charakterisieren sich in den Tubulusepithelzellen durch einen vergrößerten, hyperchromatösen Nucleus mit Einschlüssen, die wie Milchglas aussehen (Kant et al. 2022). Da die klassischen histologischen Veränderungen jedoch vor allem in den Anfangsstadien nicht immer vorhanden sind, wird bei negativen direkten Kriterien eine zusätzliche SV40-Immunohistochemie (ICH) durchgeführt. Diese detektiert das *large-T-Antigen*, welches in allen menschlichen Polyomaviridae (SV40-Virus, BK-Virus und JC-Virus) vorhanden ist (Kant et al. 2022). Auch die

Elektronenmikroskopie kann Virus-Einschlusskörperchen mit 40-45 nm in den Nuclei der Tubulusepithelzellen nachweisen (Hirsch 2002).

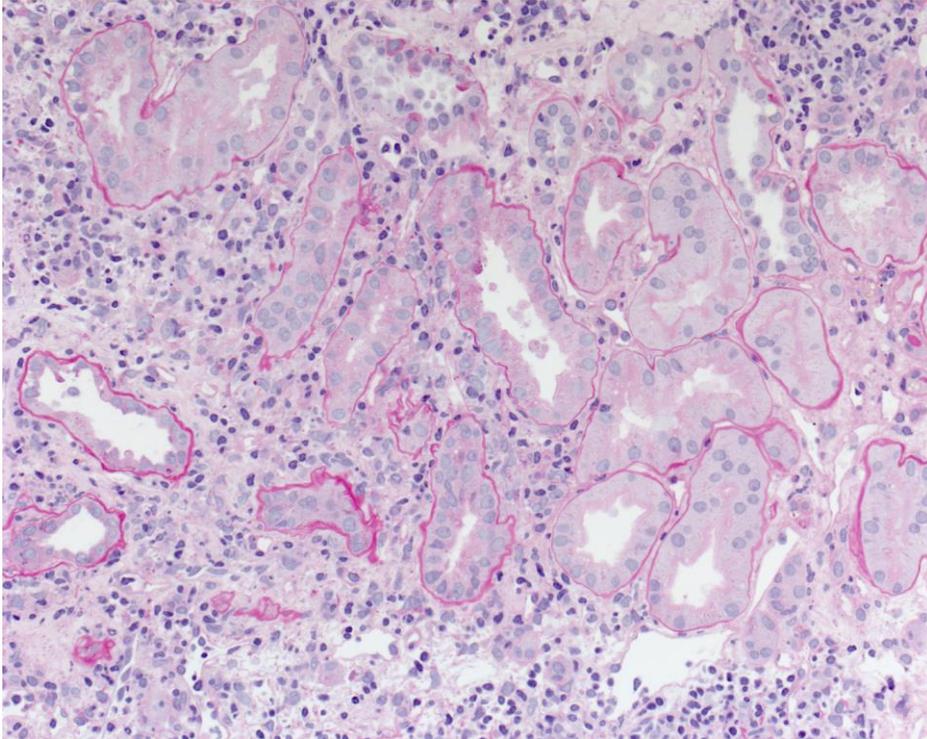


Abb. 3: Interstitielle Nephritis und Tubulitis bei der Polyomavirusnephropathie. Mit freundlicher Genehmigung von Prof. T. Wiech Sektion Nephropathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

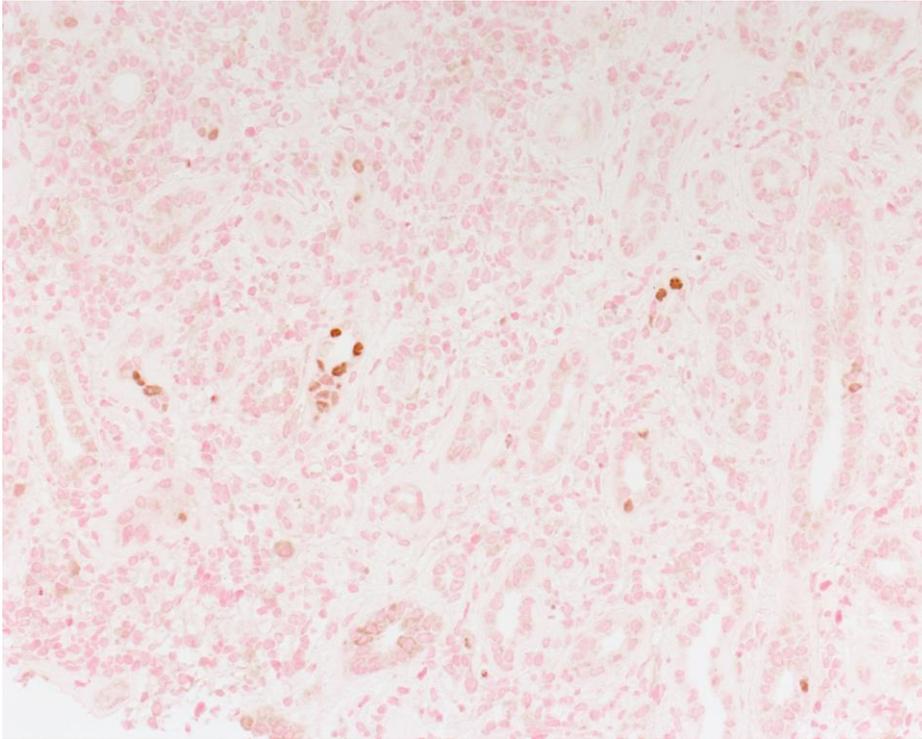


Abb. 4: Immunhistochemie: Nachweis des SV40-Antigens bei der Polyomavirusnephropathie. Mit freundlicher Genehmigung von Prof. T. Wiech Sektion Nephrologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

Zur besseren Klassifikation und Prognose der Polyomavirusnephropathie wurde ein Score von der *Banff Working Group Classification* entwickelt. Hierbei handelt es sich um eine Einteilung in drei Gruppen: PVN (Polyomavirusnephropathie) Klasse 1, PVN Klasse 2 und PVN Klasse 3. Je höher die Klasse, desto ausgeprägter ist der histologische Befund und je schlechter die Prognose. Zusammengestellt wurde der Score aus der histologischen Polyomavirusreplikation (pvl), definiert aus dem Anteil an Viruseinschlusskörperchen und/oder SV40-Positivität, berechnet aus der positiven Prozentzahl der gesamten Tubuluszellen und dem Banff-Score für Tubulitis und interstitielle Inflammation (Banff t0-t3) (Nickeleit et al. 2018).

Tabelle 1: Banff Working Group Klassifikation der Polyomavirusnephropathie. Selbst erstellt nach (Nickeleit et al. 2018)

Bioptisch gesicherte BKN					
Klasse 1		Klasse 2		Klasse 3	
Pvl	Banff ci Score	Pvl	Banff ci Score	Pvl	Banff ci Score
1	0-1	1	2-3	-	-
-	-	2	0-3	-	-
-	-	3	0-1	3	2-3

pvl 1: ≤ 1 % aller Tubuluszellen mit viraler Replikation pvl 2: >1 % to ≤ 10 % aller Tubuluszellen mit viraler Replikation; pvl 3: >10 % aller Tubuluszellen mit viraler Replikation. In den PVN Klassen 1–3, interstitielle Inflammation und Tubulitis können variieren nach dem Banff Score ti 0 zu ti 3/t 0 zu t 3 (Nickeleit et al. 2018).

Screening und Therapieoptionen der Polyomavirusnephropathie

Nach der Nierentransplantation sollte ein regelmäßiges Screening auf BK-Viren unternommen werden. Je nach Transplantationszentrum kann das Screening (im Blut oder im Urin) und auch der Zeitabstand zwischen den Kontrollen variieren, da keine offiziellen Leitlinien hierzu publiziert wurden (Saleh et al. 2020). Im Universitätsklinikum Düsseldorf wird in den ersten drei Monaten nach NTX alle zwei Wochen eine PCR-Kontrolle des BK-Virus im Blut bestimmt. Nach den ersten drei Monaten wird der Zeitrahmen auf alle vier Wochen ausgedehnt. Nach dem ersten Jahr post-NTX sollte quartalsweise auf BK-Viren im Blut getestet werden.

Eine spezifische antivirale Therapie gibt es bis heute nicht. Die vorherrschende Möglichkeit die Replikation des BK-Virus zu verhindern oder zu reduzieren und somit das Tubulusepithel vor einer Atrophie und Fibrose zu schützen, besteht in der Reduktion der Immunsuppression (Jahdali et al. 2017). Ab einer Viruslast von > 1000 BKV-Kopien/ml über vier Wochen sollte die immunsuppressive Therapie reduziert werden. Meistens besteht dies in der Reduktion der Dosis des Tacrolimus (FK-Spiegel Ziel < 6 ng/ml) oder des Ciclosporin (CSA-Spiegel < 150 ng/ml). Zusätzlich kann gleichzeitig oder nachfolgend die Dosis des Mycophenolat Mophetil (MMF) um 50 % reduziert

werden. Je nach Land oder Transplantationszentrum beginnt man auch mit der Reduktion des MMF und erst später mit dem Herabsetzen des Calcineurininhibitors (Sharma et al. 2016). Verbleiben diese Maßnahmen ohne Erfolg, so kann zusätzlich eine Umstellung von MMF auf einen mTOR-Inhibitor oder/und eine Umstellung von Tacrolimus auf Ciclosporin erwogen werden. In vitro haben sowohl die mTOR-Inhibitoren als auch das Ciclosporin eine Inhibition der Virusreplikation gezeigt (Hirsch and Randhawa 2019). Kleinere Studien haben ebenfalls einen Vorteil von intravenösen Immunglobulinen (ivIG), zusätzlich zu den oben genannten Maßnahmen, erbracht (Kable et al. 2017). Größere, multizentrische Studien sind diesbezüglich jedoch bislang nicht erfolgt, sodass diese Therapiemaßnahme nicht regulär durchgeführt wird. Studien bezüglich des Therapienutzens von Leflunomide oder Cidofovir zeigten divergente Ergebnisse. Auch diese Medikamente werden nicht regulär in der Polyomavirusnephropathie angewendet. Eine vermutete prophylaktische Wirkung von Fluoroquinolonen, mit der Hypothese der Störung der viralen DNA-Replikation konnte nicht bewiesen werden (Myint et al. 2022). Experimentell laufen derzeit Studien bezüglich spezifischer BK-Virus-T-Lymphozyten. Diese haben in der Phase I-Studie keine deutlichen Nebenwirkungen gezeigt. Die Phase II-Studie ist derzeit noch nicht beendet. Zusätzlich wird ein monoklonaler Antikörper gegen das Protein der Virus-Kapsid (VP1) des BK-Virus (MAU868) derzeit untersucht (Kurašová et al. 2022). Durch die Reduktion oder Umstellung der Immunsuppression ist das Risiko für eine Transplantat-Abstoßung höher (Shen et al. 2021). Eine Abstoßung wurde in 8-12 % nach Reduktion der Immunsuppression im Rahmen einer BKN beobachtet (Schaub et al. 2010).

1.4 Cell-free DNA

1.4.1 Definition und Eigenschaften

Bereits 1948 wurde durch Mandel und Metais das erste Mal die Präsenz von Nukleinsäuren außerhalb der Zelle beschrieben (Mandel and Metais 1948). Erst vier Jahre später wurde die klassische Doppelstrang-DNA entdeckt und die Daten dazu publiziert (Chan, Chiu, and Lo 2003). Cell-free DNA (cf-DNA) kann außerhalb der Zelle in verschiedenen Formen auftreten, entweder als freie DNA, gebunden an Proteine, zum Beispiel Nucleosome, HDL, LDL oder auch eingewickelt und gebunden an Vesikel, zum Beispiel Exosome, Mikrovesikel oder apoptische Zellen (Edwards et al. 2022). Die

Halbwertszeit beträgt zwischen 16 Minuten und 2,5 Stunden (Edwards et al. 2022). Die durchschnittliche Länge der cf-DNA beträgt ~167 Basenpaar (bp). Es wurden aber auch kürzere Fragmente dokumentiert, die nur zwischen 55-166 bp lagen. Längere Fragmente bis > 1000 bp sind eher selten, wurden jedoch ebenfalls beschrieben (Gawroński et al. 2019). Die mitochondriale cf-DNA ist kürzer mit 20-100 bp (Szilágyi et al. 2020).

Die cell-free DNA ist unter drei verschiedenen Formen in den Körperflüssigkeiten zu finden, die nukleäre cf-DNA, die mitochondriale cf-DNA und die mikrobielle cf-DNA. Die nukleäre cf-DNA wird in der Krebsdiagnostik, der Transplantationsdiagnostik, in autoimmunen Erkrankungen und in der pränatalen Diagnostik eingesetzt. Die mitochondriale cf-DNA dient vor allem in der Krebsforschung als Marker. Die mikrobielle cf-DNA wird in der Infektiologie als Marker für bakterielle und virale Infektionen verwendet (Szilágyi et al. 2020).

1.4.2 Ursprung der cf-DNA

Die cell-free DNA wird durch verschiedene Mechanismen freigesetzt. Führend ist die Nekrose der Zellen, die aufgrund von externen Faktoren wie oxydativem Stress, Hitze, Trauma, Infektionen oder Hypoxie zum schnellen Absterben der Zelle führt (Thierry et al. 2016). Zusätzlich wird die cf-DNA durch die geplante Apoptose der Zelle freigesetzt (Diaz and Bardelli 2014). Auch die aktive Freisetzung der cf-DNA aus lebenden Zellen ist beschrieben. Einer der Mechanismen besteht aus einer genomischen Instabilität und einer überhäuftten Ansammlung von Einzel- oder Doppelstrang-DNA im Zytoplasma. Ein weiterer Mechanismus ist die Freisetzung von NET (*neutrophil extracellular trap*). Dies sind extrazelluläre Fasern, die aus der DNA von neutrophilen Granulozyten bestehen und in der Bekämpfung von Viren, Bakterien oder Parasiten eingesetzt werden. Rezent wurden aber auch NET bei nicht-infektiösen Erkrankungen oder nach intensiver körperlicher Aktivität beschrieben. Durch die NET-ose wird die cf-DNA dann freigesetzt (de Miranda et al. 2021).

1.4.3 Anwendungsbereiche der cf-DNA außerhalb der Transplantationsdiagnostik

Bereits 1977 wurden erhöhte cf-DNA-Level bei Patienten mit einem malignen Tumor festgestellt. 1998 wurde von Lo et al. ergänzt, dass zumindest ein Teil der gemessenen cell-free DNA direkt von Tumorzellen stammt. Im weiteren Verlauf wurden spezifische Tumormarker in der cf-DNA festgestellt (Tp53, KRAS) und der Nutzen der *liquid biopsy* wurde verbreitet. Hiernach entstand der Begriff *circulating-tumor DNA* (ct-DNA) (Wan et al. 2017).

In der pränatalen Diagnostik wurde 1997 erstmalig die Präsenz von fetaler cf-DNA (cff-DNA) im Plasma der Mutter nachgewiesen. Zusätzlich wurde die cff-DNA im Rahmen einer Trisomie 21 höher gemessen als ohne chromosomale Mutation. Aktuell wird die cff-DNA regulär in der pränatalen Diagnostik für die Detektion von chromosomalen Mutationen eingesetzt (Sarzynska-Nowacka, Kosinski, and Wielgos 2019).

1.4.4 Donor-derived cell-free DNA

Allgemeines und aktueller Nutzen

Die *donor-derived cell-free DNA* (ddcf-DNA) wurde das erste Mal 1998 im Plasma eines nierentransplantierten Patienten nachgewiesen (Lo et al. 1998). Zusätzlich kann die ddcf-DNA aber ebenfalls im Serum und im Urin eines (Nieren-Herz-Lunge-Pankreas-) transplantierten Patienten gemessen werden (Gielis et al. 2015). Die ddcf-DNA wird, wie unter 1.4.2 beschrieben, durch Apoptose, Nekrose oder aktive Sekretion der Zellen des Transplantates freigesetzt (Gielis et al. 2015) (Abb. 5). Bei Schäden des Transplantates durch eine Abstoßung, Infektion oder chirurgische Komplikationen, kommt es zu den oben genannten Mechanismen der Zellen und zur Freisetzung der ddcf-DNA. Seit der Entdeckung in 1998, wurden zahlreiche Studien durchgeführt, um den Nutzen der ddcf-DNA im Rahmen der Transplantationsmedizin, hinsichtlich nicht-invasiver Diagnostik, besser einzustufen. In Bezug auf die Nierentransplantation konnte bisher in mehreren Studien gezeigt werden, dass die Antikörper-vermittelte humorale Abstoßung (ABMR) mit einer erhöhten ddcf-DNA-Fraktion einhergeht (Wijtvliet et al. 2020). In der multizentrischen DART-Studie konnte ein *cut-off* von < 1 % ddcf-DNA einen hohen

negativen prädiktiven Wert hinsichtlich einer humoralen Abstoßung zeigen (Bloom et al. 2017). Zusätzlich wird der Nutzen der ddcf-DNA zusammen mit der Bestimmung von donor-spezifischen HLA-Antikörpern zur Diagnostik einer ABMR empfohlen (Obrișcă et al. 2022). Seit 2017 wird die ddcf-DNA in den USA als diagnostischer Marker bei Nierentransplantierten bereits vergütet (Chopra and Sureshkumar 2021). Bei der zellulären Abstoßung (TCMR) sind die vorliegenden Daten aktuell noch zwiespältig. In der DART-Studie konnte $> 1\%$ ddcf-DNA einen prädiktiven positiven Wert für eine zelluläre Abstoßung Banff \geq Ib zeigen. Allerdings war keine Signifikanz hinsichtlich einer borderline-Abstoßung (Ia) zu vermerken (Bloom et al. 2017). Auch Huang et al. konnten keine Unterschiede in der ddcf-DNA zwischen einer zellulären Abstoßung und keiner Abstoßung nachweisen (Huang et al. 2019). Zwei große Studien (KAOR und ProActive) sind aktuell noch nicht beendet, die sich mit der Thematik der TCMR und der ddcf-DNA auseinandersetzen (Chopra and Sureshkumar 2021). Zusätzlich zur Abstoßungsreaktion wurde ein Anstieg der ddcf-DNA auch bei einer vorliegenden Infektion beobachtet. Goussous et al. beschrieben sieben Fälle von Nierentransplantierten mit Infektion (5x BK-Virämie und 2x Harnwegsinfektion) und erhöhten ddcf-DNA-Werten (Goussous et al. 2020). Auch weitere virale Infekte, z. B. SARS-COV2, können zu einer erhöhten ddcf-DNA führen (Bunnapradist et al. 2021).

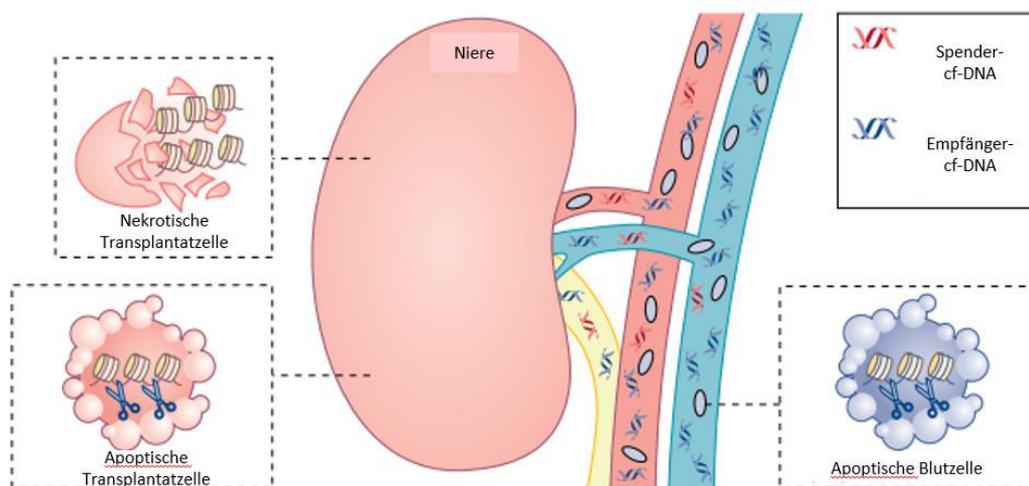


Abb. 5: Freisetzung der ddcf-DNA im Rahmen eines Transplantatschadens. Modifiziert nach Oellerich et al. (2021).

Quantifizierung der ddcf-DNA

In den Anfangsstadien wurde mittels *Polymerase chain reaction* (PCR) genetisches Material des Y-Chromosoms des Spenders bei einer weiblichen Empfängerin nachgewiesen und somit wurde der erste Baustein für die nicht-invasive Diagnostik eines Transplantatschadens gelegt (Kueht et al. 2022). Im weiteren Verlauf wurde, bei der oben genannten, limitierten Methode, auf eine Differenz mittels PCR zwischen der *Human* Leukozyten Antigene (HLA) des Spenders und Empfängers gesetzt. Auch hier ergaben sich jedoch Einschränkungen, wenn es sich um eine HLA-identische Spende handelte (Kueht et al. 2022). Aktuell wird die ddcf-DNA mittels Erkennung von single nucleotid polymorphisms (SNP's), die im Genom des Spenders und Empfängers verteilt sind, gemessen. Diese Methode ist unabhängig vom Geschlecht (Sharon et al. 2017). Da jedoch nicht immer Blut des Spenders zur Verfügung steht, um die SNP's direkt zu vergleichen, wurden weitere Methoden entwickelt. Zurzeit gibt es zwei verschiedene Modelle, die zur Messung der ddcf-DNA herangezogen werden können. Es handelt sich einerseits um eine willkürliche Methode (*random, shot-gun*). Hier wird entweder mittels Sequenzierung durch Ligation, also einer DNA-Sequenzierungsmethode, in der das Nukleotid durch die DNA-Ligase identifiziert wird, oder einer *Next-Generation-Sequenzierung* (NGS), die die SNP's der dd-cfDNA per Zufall im Plasma misst, die ddcf-DNA bestimmt (Oellerich et al. 2021). Die zweite Methode ist gezielt (*targeted*) und besteht entweder aus einer *droplet digital PCR*-Methode (ddPCR), bei der SNP's herausgesucht wurden, die nur minimale Veränderungen in den Allelen aufweisen (*minor allelic frequency, MAF*) und homozygot beim Empfänger auftreten, beim Spender jedoch nicht vorhanden sind (Beck et al. 2013), oder einer PCR mit NGS (Grskovic et al. 2016).

Die ddcf-DNA kann sowohl als Prozentsatz der gesamten cf-DNA dargestellt werden (% der cf-DNA) oder als absoluter Wert (Kopien/Mililiter; cp/ml). Beide Methoden haben Vor- und Nachteile. Die fraktionierte Angabe der ddcf-DNA in Prozent der cf-DNA ist abhängig von der gesamten cf-DNA, welche bei Autoimmunerkrankungen, Infektionen, psychologischem Stress oder nach dem Sport erhöht sein kann oder zum Beispiel durch eine Leukopenie erniedrigt sein kann (Osmanodja et al. 2021). Für die absolute

Quantifizierung der ddcf-DNA kann nur die ddPCR herangezogen werden. Die Quantifizierungsgrenze liegt bei 0,15 % (Oellerich et al. 2021).

1.5 Ziel und Fragestellung

Nach einer Nierentransplantation kann es zu mehreren Komplikationen kommen. Oft sind jedoch ein Anstieg des Serum-Kreatinins oder eine zunehmende Proteinurie die einzigen, nicht-invasiven, Nachweise einer Nierenschädigung. Das Kreatinin und die Proteinurie sind jedoch unzureichende Marker, da es in Bezug auf das Kreatinin eine fehlende Sensitivität im unteren oder normal geltenden Bereich gibt. Zudem bestehen Schwankungen in den laborchemischen Messungen und der Anstieg des Serumkreatinins wird erst deutlich, wenn bereits ein Transplantatschaden entstanden ist (Oellerich et al. 2021). Es hat also zum Zeitpunkt der Feststellung einer verschlechterten Transplantatfunktion bereits ein fortgeschrittener Zellschaden stattgefunden. Zusätzlich ist die Genese der verschlechterten Transplantatfunktion oft nur durch eine invasive Transplantatnierenbiopsie zu diagnostizieren. Es bestehen also erhöhte Risiken für eine Blutung oder gar den Verlust des Transplantates. Auch die Polyomavirusnephropathie kann aktuell nur durch eine Transplantatnierenbiopsie bestätigt werden.

Es werden also neue nicht-invasive Marker benötigt, die früher, effektiver und risikoarmer eine Polyomavirusnephropathie erkennen können, um somit die immunsuppressive Therapie besser und individueller zu steuern.

Die ddcf-DNA ist ein potenzieller nicht-invasiver Schädigungsmarker, der bereits zu verschiedenen Fragestellungen in der Transplantationsmedizin untersucht wurde. Hinsichtlich der Polyomavirusnephropathie gibt es allerdings nur wenige und oft divergente Studien. Daher soll die ddcf-DNA als nicht-invasiver Marker beim Vorliegen einer BK-Virämie und/oder BK-Nephropathie untersucht werden.

Die Dissertation sollte folgende Fragen klären:

- 1) Welche Spender-, Empfänger- oder Transplantationscharakteristiken haben einen Einfluss auf das Level der ddcf-DNA?**
- 2) Wie ist der natürliche Verlauf der ddcf-DNA an festgelegten Zeitpunkten nach der Nierentransplantation?**
- 3) Inwiefern korreliert die ddcf-DNA mit einer BK-Virämie?**

- 4) Ist die ddcf-DNA ein nicht-invasiver Marker für die Feststellung des Progresses einer BK-Virämie zu einer BK-Nephropathie?**
- 5) Gibt es Unterschiede in der ddcf-DNA je nach Biopsiebefund?**

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

2.1.1 Patientenkollektiv

Es handelte sich um eine monozentrische, klinische, prospektive Kohorten-Studie mit der Nummer: UKD-2018-03-4644. Zwischen Dezember 2018 und Oktober 2020 wurden insgesamt 141 Patienten in die Studie eingeschlossen. Für die Analyse der ddcf-DNA im Rahmen einer Transplantatnierenbiopsie wurden nach Oktober 2020 zwecks dieser spezifischen Fragestellung, weitere 27 Teilnehmer aus der fortlaufenden Datenbank ausgewertet.

2.1.2 Einschluss- und Ausschlusskriterien

Den Einschlusskriterien entsprachen Patienten, die eine Lebend- oder Leichennierenspende im Universitätsklinikum Düsseldorf (UKD) erhielten, mindestens 18 Jahre alt waren und eine schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an der Studie geben konnten. Die Teilnehmer wurden vor der Transplantation eingeschlossen. Bei der Lebendnierenspende konnte dies Tage oder Wochen vor geplanter Transplantation sein. Bei der Leichenspende wurden die Teilnehmer kurz vor der Transplantation im Rahmen der Vorstellung in der zentralen Notaufnahme eingeschlossen. Später wieder ausgeschlossen, wurden die Teilnehmer, die nach Einschluss in der Studie nicht transplantiert wurden (zum Beispiel aufgrund einer schlechten Spenderorgan-Qualität). Ebenfalls ausgeschlossen wurden die Spender, die eine Niere im Rahmen der Lebendnierentransplantation spendeten und zwecks anderer Fragestellungen mit in die Studie/Datenbank aufgenommen worden waren.

2.1.3 Einschlussuntersuchungen

Am Tag des Einschlusses, vor Transplantation, wurde eine körperliche Untersuchung, ein Elektrokardiogramm, eine Röntgen-Thorax-Aufnahme und eine Laborabnahme entsprechend dem internen Standard vor Nierentransplantation durchgeführt. Zusätzlich

erfolgte eine kalkulierte Anamnese bezüglich Vorerkrankungen, Gewicht, Größe, Medikamenteneinnahme, Herkunft und Alter des Teilnehmers. Laborchemisch wurden Natrium, Kalium, Calcium, Phosphat, Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure, Lactatdehydrogenase (LDH), *Parathyroid hormone* (PTH), Bilirubin, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), Gamma-GT (GGT), Blutgasanalyse (BGA), ein kleines Blutbild, Lactat, Glucose, INR, Partielle Thromboplastinzeit (PTT) und Quick abgenommen. Zusätzlich wurde mittels Urinstatus die Proteinurie bestimmt, soweit eine ausreichende Restdiurese vorlag. Eine virologische Diagnostik inklusive Hepatitis B und C Serologie, HIV-Serologie, CMV, VZV- und EBV Status wurden ebenfalls abgenommen. Die notwendigen Laborparameter für die Studie wurden in eine Datentabelle eingepflegt. Der Tag des Einschlusses wurde als Visite 1 (V1) gekennzeichnet.

2.1.4 Follow-up

Der erste Kontrolltermin fand an Tag 10 nach der NTX statt, gekennzeichnet als Visite 2 (V2). Der zweite Termin war nach 6 Wochen post-NTX, gekennzeichnet als Visite 3 (V3). Der dritte Kontrolltermin fand nach 3 Monaten statt, gekennzeichnet als Visite 4 (V4). Die vierte Kontrolle post-NTX wurde nach 6 Monaten durchgeführt, gekennzeichnet als Visite 5 (V5). Die letzte Kontrollvisite im Rahmen der Studie fand nach 12 Monaten statt und war gekennzeichnet als Visite 6 (V6). Zusätzlich zu diesen fest definierten Visiten wurden ebenfalls an jedem Ereignis, zum Beispiel bei stationärer Aufnahme zur Transplantatnierenbiopsie, bei Infektionen oder einer Abstoßung, eine außerplanmäßige Visite, gekennzeichnet als A-Visite, durchgeführt (Abb. 6).

Bezüglich der Fragestellung der ddcf-DNA zum Zeitpunkt der Biopsie wurden retrospektiv, bis November 2022, bereits in die fortlaufende Datenbank eingeschlossene Teilnehmer auf eine erfolgte Transplantatnierenbiopsie untersucht. Das Resultat der Biopsie wurde dann in drei Kategorien je nach Resultat aufgeteilt (Polyomavirusnephropathie, Tubulusschaden und zelluläre Abstoßung). Retrospektiv wurden dann die ddcf-DNA und das Kreatinin zum Zeitpunkt der Biopsie herausgesucht. Für die Fragestellung wurden die Teilnehmer eingeschlossen, die passende Kreatinin- oder ddcf-DNA-Werte ab drei Wochen vor der Biopsie bis zum Tag der Biopsie

aufwiesen. Ausgeschlossen wurden die Teilnehmer, bei denen erst nach erfolgter Biopsie ddcf-DNA und Kreatinin-Werte bestimmt worden waren.

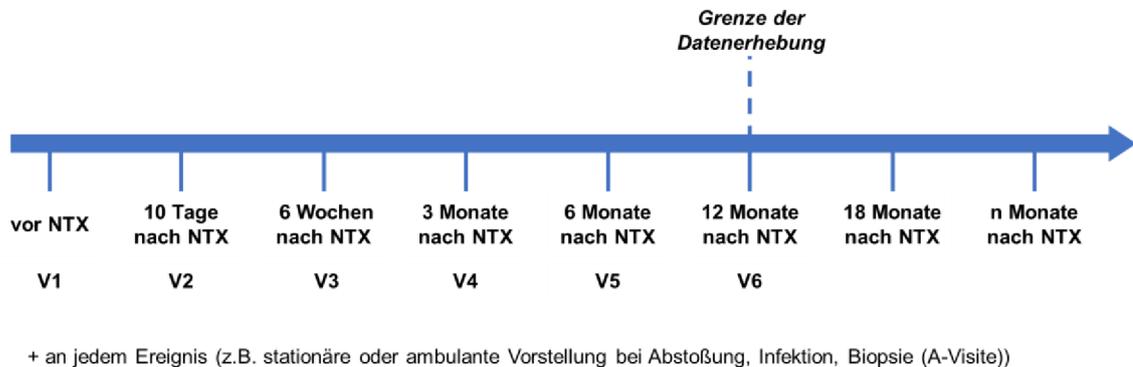


Abb. 6: Darstellung der geplanten Visiten mit Blutabnahme und die Grenze der Datenerfassung im Rahmen der Studie.

2.1.5 Bestimmung der Laborparameter

Nach erfolgter Nierentransplantation (NTX) wurden die Teilnehmer, wie bereits beschrieben, an definierten Abständen in der nephrologischen Ambulanz des UKD oder auf der nephrologischen Station des UKD zur Blutabnahme und klinischen Kontrolle einbestellt. An diesen Kontrollen wurden ähnliche Laborparameter als an V1, inklusive Kreatinin, Harnstoff und Proteinurie bestimmt. Zusätzlich wurden jedoch nach Beginn der immunsuppressiven Therapie die BK-Viren im EDTA (*Ethylendiamintetraessigsäure*)-Blut gemessen. Die Laborparameter wurden im Zentrallabor des UKD ausgewertet. Die virologischen Befunde wurden in dem Institut für Virologie am UKD ausgewertet. Die BK-Viren wurden mittels Real-Time PCR bestimmt und in K/ml angegeben.

2.1.6 Abnahme und Auswertung der ddcf-DNA

Zur Bestimmung der ddcf-DNA wurden an jeder Visite nach NTX zwei Streck-Röhrchen (Cell-Free DNA BCT®) (Abb. 7) mit jeweils 10 ml Fassungsvermögen aus dem Blut abgenommen. Die Streck-Röhrchen sind spezielle Blutabnahmeröhrchen, die die

kernhaltigen Blutzellen stabilisieren und somit die Freisetzung von genomischer DNA verhindert und die Bestimmung der cell-free DNA ermöglicht. Die cell-free DNA der befüllten Röhrchen ist 14 Tage stabil und kann bei Temperaturen zwischen 6 und 37 °C gelagert werden. Die beiden abgenommenen Proben wurden dann mittels Transportes nach Göttingen ins Labor zu *Chronix biomedical GmbH* versandt und dort ausgewertet. Die ddcf-DNA wurde mit der dd-PCR-Methode auf Basis von SNP's ausgewertet. Mittels zweifacher Zentrifugation wurde erst das Plasma vom Rest der Blutbestandteile getrennt. Die cell-free DNA konnte dann mit dem *High Pure viral nucleic acid extraction kit (Roche Applied Science)* extrahiert werden. Der Messprozess beginnt dann mit einer Prä-Amplifikation der cell-free-DNA. Hierfür wurde das *NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit (New England Biolabs)* benutzt und maximal 11 PCR-Zyklen durchgeführt, um gemittelt 1.000 ng cf-DNA zu generieren. An einem erreichten Plateau wurde die Amplifikation gestoppt. Danach konnte die eigentliche dd-PCR angewendet werden. Hierfür wurde das *QX100 ddPCR system (Bio-Rad)* benutzt. Um die droplets zu generieren, wurde der *QX100 droplet reader* verwendet (Beck et al. 2013). Die Werte der ddcf-DNA wurden sowohl in der absoluten Anzahl in Kopien/Mililiter angegeben, als auch in %-cf-DNA. Die ausgewerteten Werte der ddcf-DNA wurden per E-Mail in Form einer Excel-Tabelle zugesandt.



Abb. 7: Cell-Free DNA BCT®.

2.2 Gruppeneinteilung

Im Oktober 2020 wurde die Datenerfassung beendet. Nur für die zusätzlich Fragestellung der ddcf-DNA im Rahmen der Transplantatbiopsie wurden nach Oktober 2020 noch 27 weitere Teilnehmer eingeschlossen. Diese Teilnehmer sind jedoch in der Gruppeneinteilung nicht aufgeführt.

Die Teilnehmer wurden in zwei Gruppen aufgeteilt. Die eine Gruppe (n = 33) hatte im Verlauf der Datenerfassung eine BK-Virämie entwickelt, definiert durch einmalig ≥ 10.000 BK-Virus Kopien oder mindestens 3 Wochen persistierende ≥ 1000 Kopien. Die zweite Gruppe (n = 85) entwickelte keine BK-Virämie.

Die Gruppe mit BK-Virämie wurde dann in zwei Subgruppen unterteilt. Die eine Gruppe entwickelte eine histologisch gesicherte Polyomavirusnephropathie (n = 7), während die andere Gruppe (n = 26) entweder nicht biopsiert wurde, oder keine Polyomavirusnephropathie entwickelte (Abb. 8).

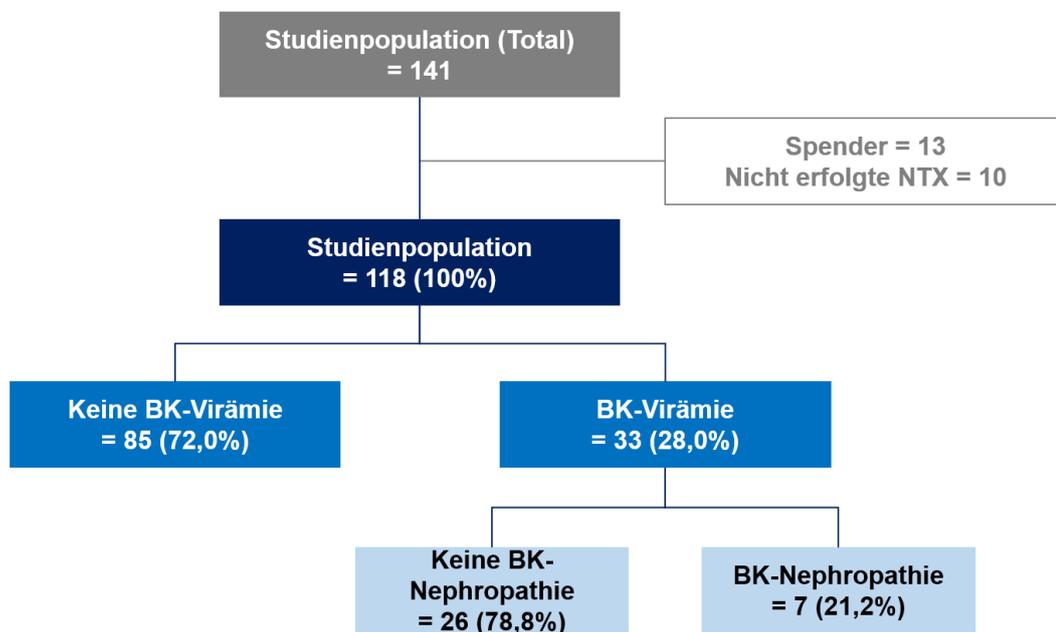


Abb. 8: Flussdiagramm mit Darstellung der Gruppeneinteilung. Die Teilnehmeranzahl ist in Prozent und absoluter Anzahl dargestellt.

2.3 Statistik

Zur statistischen Auswertung und graphischen Darstellung der Daten wurden die Programme MS Excel (Microsoft, Redmont, USA), SPSS 27 (SPSS Inc., Chicago, USA) Graph Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, USA) und EndNote 20 (Clarivate Analytics) verwendet.

MS Excel wurde zur Erstellung und Speicherung der Datenbank verwendet. SPSS diente den statistischen Auswertungen hinsichtlich der deskriptiven Statistik und teils induktiven Statistik mit Erstellung der Vergleiche bezüglich der Baselinecharakteristika in den verschiedenen Gruppen und der ddcf-DNA. Mit Graph Prism wurden die Graphiken und die zugehörigen induktiven statistischen Auswertungen erstellt. EndNote 20 diente der Verarbeitung der Literaturrecherche.

Zur Bestimmung der Verteilung der Daten wurde der Shapiro-Walk-Test benutzt. Hinsichtlich der Verteilung wurden normal verteilte Daten als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben und nicht-normal verteilte Daten als Median mit Perzentilen, Q1-Q3, (IQ) angegeben. Kategoriale Daten wurden als Prozente oder absolute Anzahl angegeben.

Zur deskriptiven Statistik der Parameter/Baselinecharakteristika in den verschiedenen Gruppen wurden Kreuztabellen verwendet. Die Signifikanz wurde bei unabhängigen Stichproben mittels Mann-Whitney-U-Test bestimmt. Bei abhängigen Stichproben erfolgte die Bestimmung der Signifikanz mit dem t-Test. Für gepaarte Analysen bei nicht-normal verteilten Parametern wurde der Wilcoxon-Test angewendet.

Als signifikant wurde ein p-Wert $< 0,05$ angesehen.

Zur Bestimmung einer Korrelation wurde bei nicht-normal verteilten Daten der Spearman R-Test verwendet.

2.4 Ethikvotum

Das Ethikvotum wurde bei klinischer Datenerhebung an Patienten genehmigt und liegt mit der Studiennummer: 2018-76-KFmgU vor.

3 Ergebnisse

3.1 Baselinecharakteristika

Zur besseren Charakterisierung beider Gruppen (BKV– und BKV+) und der Bestimmung von Risikofaktoren für die Entwicklung einer BK-Virämie wurden mehrere Parameter untersucht. Insgesamt waren 33 % (n = 39) der Teilnehmer weiblich und 67 % (n = 79) der Teilnehmer männlich. Zwischen den beiden Gruppen gab es keine Unterschiede hinsichtlich der Verteilung des Geschlechts (p = 0,408). Insgesamt 97 % (n = 114) der Teilnehmer waren Kaukasier. In Bezug auf die nephrologische Grunderkrankung vor Transplantation wiesen in beiden Gruppen die meisten Patienten eine immunologische Genese, zum Beispiel eine chronische Glomerulonephritis, auf (insgesamt 36 % (n = 43)). Als zweithäufigste Erkrankung waren in der BKV-negativen Gruppe (BKV-) die renovaskulären Erkrankungen vertreten (18 % (n = 15)). Diese waren im Vergleich zur BKV positiven Gruppe (BKV +) (3 % (n = 1)) deutlich häufiger festzustellen. In der BKV+ Gruppe war häufiger eine diabetische Nephropathie als Grunderkrankung Ursache für die chronische Nierenkrankheit (15 % (n = 5)) als in der BKV- Gruppe (7 % (n = 6)). Dies könnte als unabhängiger Risikofaktor für eine BK-Virämie gelten. Insgesamt hatten 77 % (n = 91) der Teilnehmer eine Leichenspende erhalten und 23 % (n = 27) eine Lebendspende. Hier zeigte sich kein Unterschied in den beiden Gruppen (p = 0,789). Es wurden insgesamt bei 3 % (n = 4) der Teilnehmer eine AB0-inkompatible Lebendnierenspende durchgeführt, auch hier gab es keine Unterschiede in den beiden Gruppen (p = 0,893). 14 % (n = 16) der Teilnehmer wurde präemptiv, also vor Einleitung einer Dialyse, transplantiert. Die Mehrheit der Teilnehmer hatte zuvor ein Nierenersatzverfahren mittels Hämodialyse (78 % (n = 92)). Die Peritonealdialyse erfolgte zuvor bei 8 % (n = 10) aller Teilnehmer. In beiden Gruppen wurde bei der Induktion eine gleich aufgeteilte immunsuppressive Therapie verwendet (p = 0,372). Die Standard Immunsuppression, bestehend aus einer Induktionstherapie mittels Basiliximab, wurde bei 90 % (n = 106) der Teilnehmer verwendet. Zum Verlust des Transplantats mit erneuter Dialysepflichtigkeit kam es in 1 % (n = 1) der Teilnehmer. Diese waren nur in der BKV+ Gruppe vertreten (p = 0,025). Eine CMV-Virämie wurde in 15 % (n = 18) der Fälle festgestellt. Hier ergaben sich keine Gruppenunterschiede (p = 0,557). Insgesamt kam es zu einem *lost-to-follow-up* bei 8 % (n = 10) der Teilnehmer. Es kam insgesamt

bei 4 % (n = 5) aller Teilnehmer zu einer zellulären Abstoßung. In der BK-Virämie-Gruppe waren es 9 % (n = 3), in der BK-negativen-Gruppe waren es insgesamt 2 % (n= 2). Der Unterschied war statistisch nicht signifikant (p = 0,104). Trotzdem besteht eine Tendenz zur erhöhten Rejektionsrate in der BK-Virämie-Gruppe (Tabelle 2).

Das Durchschnittsalter der Studienteilnehmer lag bei 55,7 (± 13,2) Jahren. Insgesamt wurden die Teilnehmer im Mittel 8,7 (± 8,4) Monate nachverfolgt. Die gemittelte Dialysezeit vor Transplantation betrug 5,7 (± 4,2) Jahre. Zwischen den Gruppen waren keine Unterschiede zu vermerken (p = 0,838). Die warme Ischämie-Zeit (Zeit zwischen dem Beenden der kalten Perfusion und dem Abklemmen der Aorta im Empfänger) betrug bei allen Teilnehmern im Mittel 36,9 (± 16,0) Minuten. Die kalte Ischämie-Zeit (Zeit zwischen Start der kalten Perfusion und Beginn der warmem Ischämie-Zeit) betrug im Mittel 602,2 (± 390,3) Minuten. In beiden Parametern gab es keine Unterschiede in der Gruppenverteilung. Das Durchschnittsgewicht lag bei 75,5 (± 13,4) Kilogramm. Die Durchschnittgröße bei allen Teilnehmern lag bei 172,9 (± 9,8) Zentimetern. Auch hier waren keine Differenzen zwischen beiden Gruppen zu vermerken (Tabelle 3).

Tabelle 2: Darstellung der Patientencharakteristika aufgeteilt in zwei Gruppen BKV- und BKV +. Darstellung der Ergebnisse in absoluter Anzahl und in Prozentsatz mit Signifikanzdarstellung, Signifikant p = < 0,05. BKV = BK-Virus, ADPKD = autosomic dominant polycystic kidney disease, CMV = Cytomegalievirus, NTX = Nierentransplantation, ATG = Anti-Thymozytenglobulin, TCMR = T- cell mediated rejection

	BKV-	BKV+	Total	Signifikanz
Anzahl der Teilnehmer (Einheiten; Prozentsatz)	85 (72%)	33 (28%)	118 (100%)	
Geschlecht (Einheiten; Teilnehmer; Prozentsatz)				p = 0,4
Weiblich	30 (35%)	9 (27%)	39 (33%)	
Männlich	55 (65%)	24 (73%)	79 (67%)	
Ethnizität (Einheiten; Teilnehmer; Prozentsatz)				p = 0,8
Kaukasisch	82 (96%)	32 (97%)	114 (97%)	
Asiatisch	1 (1%)	0 (0%)	1 (1%)	
Andere	2 (2%)	1 (3%)	3 (3%)	

Nephrologische Grunderkrankung (Einheiten; Teilnehmer; Prozentsatz)				p = 0,6
Reno vaskulär	15 (18%)	1 (3%)	16 (14%)	
Immunologisch	28 (33%)	15 (45%)	43 (36%)	
ADPKD	14 (16%)	3 (9%)	17 (14%)	
Diabetes	6 (7%)	5 (15%)	11 (9%)	
Chronische Infektion	3 (4%)	2 (6%)	5 (4%)	
Unbekannt	8 (9%)	0 (0%)	8 (7%)	
Andere	11 (13%)	7 (21%)	18 (15%)	
CMV-Status (Einheiten; Teilnehmer; Prozentsatz)				p = 0,7
D+/R+	37 (44%)	14 (42%)	51 (43%)	
D+/R-	16 (19%)	7 (21%)	23 (19%)	
D-/R+	17 (20%)	8 (24%)	25 (21%)	
D-/R-	15 (18%)	4 (12%)	19 (16%)	
Spender				p = 0,7
Lebend	20 (24%)	7 (21%)	27 (23%)	
Leiche	65 (76%)	26 (79%)	91 (77%)	
Präemptive NTX (Einheiten; Teilnehmer; Prozentsatz)				p = 0,7
Ja	12 (14%)	4 (12%)	16 (14%)	
Nein	73 (86%)	29 (88%)	102 (86%)	
AB0-kompatible NTX (Einheiten; Teilnehmer; Prozentsatz)				p = 0,8
Ja	82 (96%)	32 (97%)	114 (97%)	
Nein	3 (4%)	1 (3%)	4 (3%)	

Immunsuppression (Einheiten; Teilnehmer; Prozentsatz)				p = 0,3
Basiliximab	75 (88%)	31 (94%)	106 (90%)	
ATG	7 (8%)	1 (3%)	8 (7%)	
Rituximab	3 (4%)	1 (3%)	4 (3%)	
Dialyseregime (Einheiten; Teilnehmer; Prozentsatz)				p = 0,8
Hämodialyse	66 (78%)	26 (79%)	92 (78%)	
Peritonealdialyse	7 (8%)	3 (9%)	10 (8%)	
Keine Dialyse	12 (14%)	4 (12%)	16 (14%)	
Verlust des Transplantats (Einheiten; Teilnehmer; Prozentsatz)				p = 0,02
Ja	0 (0%)	1 (3%)	1 (1%)	
Nein	85 (100%)	32 (97%)	117 (99%)	
CMV-Virämie (Einheiten; Teilnehmer; Prozentsatz)				p = 0,5
Ja	14 (16%)	4 (12%)	18 (15%)	
Nein	71 (84%)	29 (88%)	100 (85%)	
Lost to follow up (Einheiten; Teilnehmer; Prozentsatz)				p = 0,1
Ja	5 (6%)	5 (15%)	10 (8%)	
Nein	80 (94%)	28 (85%)	108 (92%)	
TCMR (Einheiten; Teilnehmer; Prozentsatz)				p = 0,1
Ja	2 (2%)	3 (9%)	5 (4%)	
Nein	83 (98%)	30 (91%)	113 (96%)	

Tabelle 3: Darstellung der Patienteneigenschaften zwischen den Gruppen BKV- und BKV + mit Signifikanzdarstellung. Signifikant $p = < 0,05$. KIZ = kalte Ischämiezeit, WIZ = warme Ischämiezeit.

	BKV-	BKV+	Total	Signifikanz
Alter (Jahre; Mittel \pm Standard Deviation)	54,9 ($\pm 13,3$)	58,0 ($\pm 12,8$)	55,7 ($\pm 13,2$)	$p = 0,22$
Follow up (Monate; Mittel \pm Standard Deviation)	8,3 ($\pm 9,3$)	9,6 ($\pm 5,7$)	8,7 ($\pm 8,4$)	$p = 0,06$
Mismatch (Mittel \pm Standard Deviation)	3,1 ($\pm 1,5$)	3,5 ($\pm 1,1$)	3,2 ($\pm 1,4$)	$p = 0,21$
Anzahl der Transplantationen (Mittel \pm Standard Deviation)	1,1 ($\pm 0,4$)	1,2 ($\pm 0,5$)	1,1 ($\pm 0,4$)	$p = 0,36$
Größe (cm; Mittel \pm Standard Deviation)	173,3 ($\pm 8,7$)	172,0 ($\pm 12,3$)	172,9 ($\pm 9,8$)	$p = 0,83$
Gewicht (kg; Mittel \pm Standard Deviation)	74,7 ($\pm 13,1$)	77,7 ($\pm 14,0$)	75,5 ($\pm 13,4$)	$p = 0,22$
Zeit der Dialyse vor NTX (Jahre; Mittel \pm Standard Deviation)	5,8 ($\pm 4,4$)	5,4 ($\pm 3,5$)	5,7 ($\pm 4,2$)	$p = 0,83$
KIZ (min; Mittel \pm Standard Deviation)	605,0 ($\pm 392,3$)	594,3 ($\pm 392,2$)	602,2 ($\pm 390,3$)	$p = 0,77$
WIZ (min; Mittel \pm Standard Deviation)	37,0 ($\pm 17,2$)	37,3 ($\pm 12,0$)	36,9 ($\pm 16,0$)	$p = 0,57$

3.2 Verlauf der ddcf-DNA nach Nierentransplantation

Zur besseren Einstufung der ddcf-DNA als nicht-invasiver Marker nach Nierentransplantation und Beobachtung des natürlichen Verlaufs nach erfolgter NTX wurde die mediane ddcf-DNA an den jeweiligen Visiten untereinander verglichen. Die mediane ddcf-DNA ist an der zweiten Visite, 10 Tage nach NTX (V2), signifikant höher als in der Visite 3 (V3 = 6 Wochen nach NTX) 79 cp/ml (IQ: 47,7-140,8) vs 24 cp/ml (IQ: 16,7-48,5) $p = < 0,0001$, signifikant höher als an der Visite 4 (V4 = 3 Monate nach NTX) 79 cp/ml (IQ: 47,7-140,8) vs 30,5 cp/ml (IQ: 17,2-67,2) $p = < 0,0001$, signifikant höher als an der Visite 5 (V5 = 6 Monate nach NTX) 79 cp/ml (IQ: 47,7-140,8) vs 25

cp/ml (IQ: 11,5-48,5) $p = < 0,0001$ und signifikant höher als an der Visite 6 (V6 = 12 Monate nach NTX) 79 cp/ml (IQ: 47,7-140,8) vs 14,5 cp/ml (IQ: 7,7-36,2) $p = < 0,0001$ (Abb. 9). Zwischen den einzelnen Visiten V3-V6 gibt es keine signifikanten Unterschiede. Es kommt also bis zur 6. Woche nach NTX zu einem signifikanten Abfall der ddcf-DNA, welche sich dann im Verlauf im Median nicht mehr signifikant ändert. Hier stellt sich somit ein *Baseline*-Wert ein. Da die ddcf-DNA kurz nach der Transplantation deutlich erhöht ist, liegt in dem Zeitraum vermutlich ein postoperativer Zellschaden vor und der Nutzen als nicht-invasiver Marker ist in diesem Zeitraum, aufgrund von Interpretationsschwierigkeiten, nicht gegeben. Für die weiteren Auswertungen wurde die Visite 2 daher systematisch ausgeschlossen.

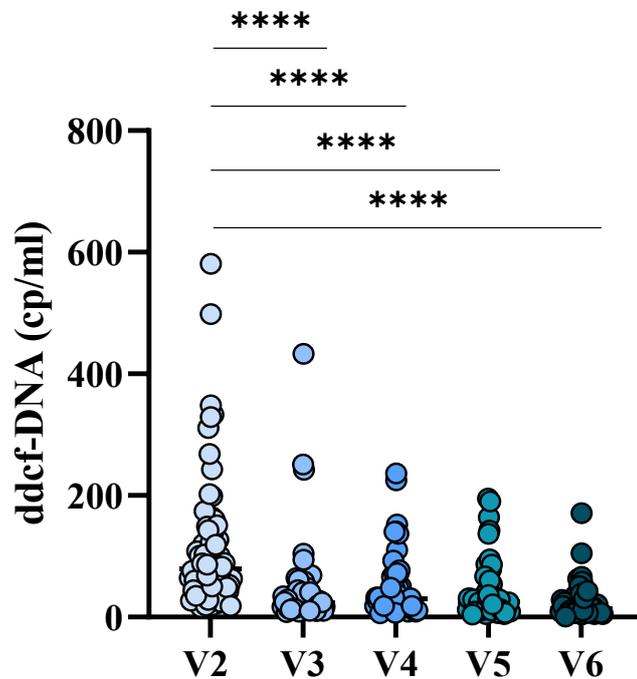


Abb. 9: Level der ddcf-DNA nach Nierentransplantation an den vorgesehenen Visiten. Angaben in cp/ml. Die ddcf-DNA (cp/ml) zeigt sich an der Visite 2 im Vergleich zu den folgenden Visiten (Visite 3-6) signifikant höher. ddcf-DNA = donor-derived cell-free DNA, V2 = Visite 2 (10 Tage nach NTX), V3 = Visite 3 (6 Wochen nach NTX), V4 = Visite 4 (3 Monate nach NTX), V5 = Visite 5 (6 Monate nach NTX), V6 = Visite 6 (12 Monate nach NTX)

3.3 Spender-, Empfänger- und Transplantationscharakteristiken und der Effekt auf die ddcf-DNA

Um herauszufinden, ob das Alter der Teilnehmer zum Zeitpunkt des Einschlusses in der Studie einen Effekt auf die ddcf-DNA hat, wurden die beiden Parameter korreliert. Hier zeigte sich, dass nach 10 Tagen, 6 Wochen und nach 3 Monaten nach Nierentransplantation die ddcf-DNA (% cf-DNA) eine negative Korrelation zum Alter aufweist. V2 = $r = -0,307$ $p = 0,01$ (Abb. 10), V3: $r = -0,512$ $p < 0,001$ (Abb. 11) und V4: $r = -0,523$ $p < 0,001$ (Abb. 12). In der absoluten Anzahl (cp/ml) war die Korrelation an den Visiten V3 und V4 nicht signifikant (V3: $p = 0,07$, V4: $p = 0,09$). An V2 war allerdings auch in der absoluten Zahl eine negative Korrelation zu sehen. ($r = -0,374$ $p = 0,02$). An den anderen Zeitpunkten nach Transplantation bestand keine Korrelation. Je älter also der Patient war, desto niedriger war die ddcf-DNA in der Anfangszeit nach Nierentransplantation.

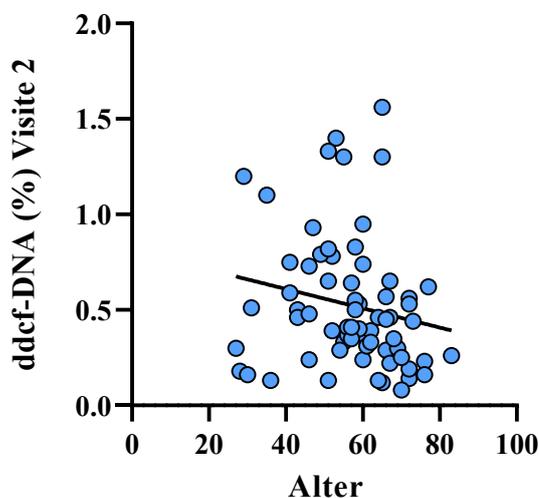


Abb. 10: Korrelation der ddcf-DNA zum Alter an der Visite 2 nach NTX. Angaben der ddcf-DNA in % cf-DNA und das Alter in Jahren. Es zeigt sich eine negative Korrelation zwischen dem Alter des Teilnehmers und der ddcf-DNA an Tag 10 nach NTX. ($p = 0,01$) ddcf-DNA = donor-derived cell-free DNA, NTX = Nierentransplantation, cf-DNA = cell-free DNA

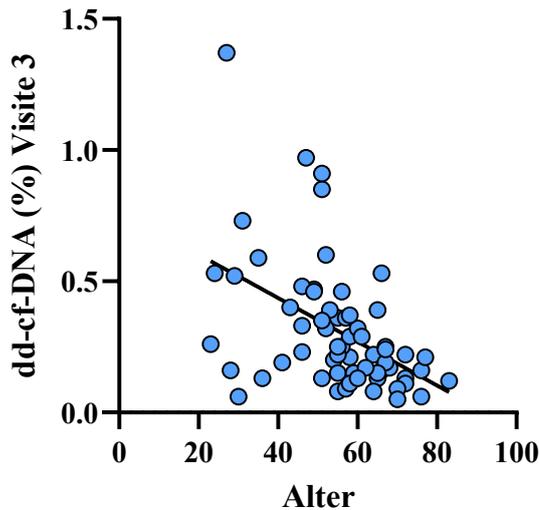


Abb. 11: Korrelation der ddcf-DNA zum Alter an der Visite 3 nach NTX. Angaben der ddcf-DNA in % cf-DNA und das Alter in Jahren. Es zeigt sich eine negative Korrelation zwischen dem Alter des Teilnehmers und der ddcf-DNA 6 Wochen nach NTX. ($p < 0,001$) ddcf-DNA = donor-derived cell-free DNA, NTX = Nierentransplantation, cf-DNA = cell-free DNA

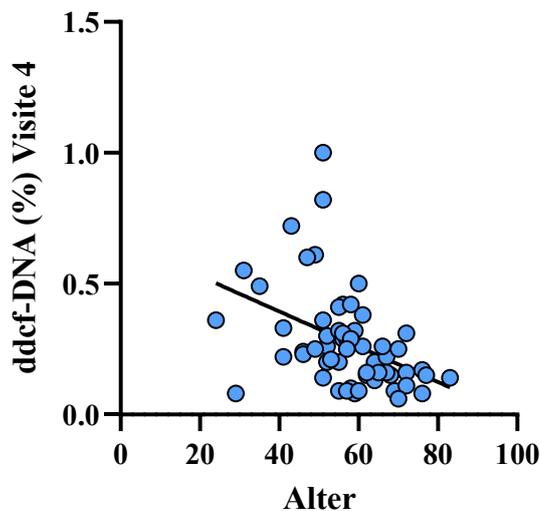


Abb. 12: Korrelation der ddcf-DNA zum Alter an der Visite 4 nach NTX. Angaben der ddcf-DNA in % cf-DNA und das Alter in Jahren. Es zeigt sich eine negative Korrelation zwischen dem Alter des Teilnehmers und der ddcf-DNA 3 Monate nach NTX. ($p < 0,001$) ddcf-DNA = donor-derived cell-free DNA, NTX = Nierentransplantation, cf-DNA = cell-free DNA

Zwischen dem BMI (ohne Aufteilung) und der ddcf-DNA konnte keine signifikante Korrelation an den verschiedenen Zeitpunkten nach Nierentransplantation gesehen werden. Nach Aufteilung des BMI auf \geq oder $< 30 \text{ kg/m}^2$ konnte eine negative Korrelation bei den Teilnehmern mit einem BMI von $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ und der ddcf-DNA an Visite 3 (6

Wochen nach NTX) nachgewiesen werden. Je höher der BMI, desto niedriger war die ddcf-DNA (%) (V3: $R = -0,264$, $p = 0,04$).

Zwischen der Dauer der kalten Ischämiezeit (Min) und dem Level der ddcf-DNA (cp/ml) an den verschiedenen Visiten bestand keine Korrelation (V3: $p = 0,375$, V4: $p = 0,114$, V5: $p = 0,874$, V6: $p = 0,601$). Ebenso fielen die Resultate bei der warmen Ischämiezeit (Min) aus (V3: $p = 0,699$, V4: $p = 0,392$, V5: $p = 0,935$, V6: $p = 0,383$), auch hier bestand in der vorliegenden Studie kein Zusammenhang.

Je länger die Teilnehmer vor der Transplantation dialysiert hatten, desto höher fiel das Level der ddcf-DNA (% cf-DNA) an der Visite 2 aus ($r = 0,263$ $p = 0,031$). Diese positive Korrelation konnte auch an Visite 5 in cp/ml festgestellt werden ($r = 0,376$ $p = 0,05$). An den anderen Visiten konnten zwischen der ddcf-DNA (in cp/ml oder %) und der Dauer der Dialyse keine signifikante Korrelation errechnet werden.

Die Anzahl der HLA-Mismatches oder die Anzahl der Transplantationen insgesamt hatten keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Level der ddcf-DNA ergeben.

In Bezug auf das Geschlecht konnte gezeigt werden, dass an Tag 10 nach Transplantation die ddcf-DNA (in % cf-DNA) bei den weiblichen Teilnehmern im Median höher lag als bei den männlichen Teilnehmern 0,63 % (IQ: 0,41-1,35 %) vs 0,39 % (IQ: 0,26- 0,64 %), $p = 0,021$. In der absoluten Anzahl (cp/ml) war die Differenz nicht signifikant ($p = 0,12$). Auch zeigte sich keine Signifikanz mehr diesbezüglich an den folgenden Visiten (V3-V6). Frauen haben also in der imminanten Zeit nach Transplantation eine erhöhte ddcf-DNA.

Je nach Ethnizität der Teilnehmer änderte sich der Wert der ddcf-DNA nicht signifikant.

Nach Aufteilung der Teilnehmer in Gruppen je nach Grunderkrankung vor NTX wurde das Level der ddcf-DNA an den verschiedenen Visiten unter den jeweiligen Gruppen verglichen. Zwischen den einzelnen Grunderkrankungen ergaben sich jeweils nur für die Visite 2, also 10 Tage nach NTX, signifikante Unterschiede. An den folgenden Visiten (Visite 3-6) waren diese Unterschiede in dem Level der ddcf-DNA nicht mehr festzustellen. Signifikant waren die Ergebnisse an V2 nur, wenn die ddcf-DNA in %-cf-DNA bestimmt wurde. Die ddcf-DNA (%) war bei der ADPKD im Vergleich zu der renovaskulären Grunderkrankung 0,63 % (IQ: 0,39-1,15 %) vs 0,25 % (IQ: 0,23-0,48 %) $p = 0,04$ oder dem Diabetes 0,63 % (IQ: 0,39-1,15 %) vs 0,30 % (IQ: 0,20- 0,46 %) $p =$

0,04 höher (Abb. 13). Die ADPKD scheint also in der Frühphase nach Transplantation eine vermehrte Ausschüttung von ddcf-DNA zu begünstigen.

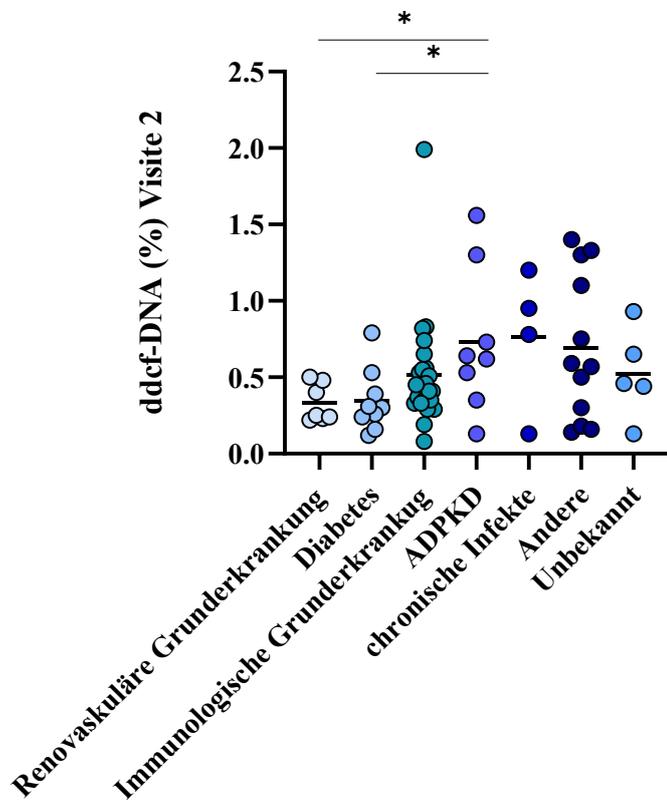


Abb. 13: Level der ddcf-DNA an der Visite 2 nach NTX je nach nephrologischer Grunderkrankung vor Transplantation. Angaben in % cf-DNA. Es zeigt sich ein erhöhtes Level der ddcf-DNA bei der ADPKD im Vergleich zur diabetischen Nephropathie oder der renovaskulären Grunderkrankung. ddcf-DNA = donor-derived cell-free DNA, NTX = Nierentransplantation, cf-DNA = cell-free DNA, ADPKD = autosomal dominant polycystic kidney disease

In Bezug auf den CMV-Status und das Level der ddcf-DNA konnte nachgewiesen werden, dass 12 Monate nach Transplantation die Teilnehmer mit dem Status Spender negativ (IgG CMV -) und Empfänger, also Studienteilnehmer, positiv (IgG CMV +) (D-/R+) im Median weniger hohe ddcf-DNA Werte (cp/ml) aufwiesen als die Teilnehmer mit dem Status Spender negativ, Empfänger negativ für das CMV-Virus (D-/R-) 9,5 cp/ml (IQ: 7-13 cp/ml) vs 25 cp/ml (IQ:15-52 cp/ml), $p = 0,005$. Bei den Teilnehmern mit dem Status D+/R+ waren die ddcf-DNA-Werte ebenfalls signifikant höher als bei den Teilnehmern mit dem Status D-/R+, 22,5 cp/ml (IQ: 9,5-39 cp/ml) vs 9,5 cp/ml (IQ: 7-13 cp/ml), $p = 0,02$. Der Status D-/R+ scheint also bei länger transplantierten Teilnehmern

zu einer geringeren Freisetzung der ddcf-DNA zu führen. Bei einer aktiven CMV-Replikation zum Zeitpunkt der jeweiligen Visite zeigten sich keine erhöhten ddcf-DNA-Werte im Vergleich zu den Patienten, die gerade keine CMV-Virämie aufwiesen (V3: $p = 0,476$, V4: $p = 0,528$, V5: $p = 0,154$, V6: $p = 0,714$).

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der ddcf-DNA, je nachdem, ob es sich um eine Lebend- oder Leichennierenspende handelte.

Im Rahmen einer präemptiven Spende, also vor Eintritt einer Dialysepflicht, zeigten sich die ddcf-DNA Werte nach 3 Monaten und nach 6 Monaten nach NTX signifikant niedriger als bei den Teilnehmern die vor NTX bereits dialysiert hatten. V4: 9,0 cp/ml (IQ: 8-17,5 cp/ml) vs 32 cp/ml (IQ: 18,3-69,8 cp/ml) $p = 0,002$, V5: 9,0 cp/ml (IQ: 6-28,5 cp/ml) vs 26 cp/ml (IQ: 14-57 cp/ml) $p = 0,018$.

Ob eine AB0-inkompatible Spende einen Effekt auf die ddcf-DNA beim Empfänger hat, konnte aufgrund von Teilnehmermangel in dieser Gruppe nicht differenziert analysiert werden.

Die Art der Induktions-Immunsuppression nach Nierentransplantation wurde ebenfalls in Bezug auf die ddcf-DNA untersucht. Es zeigten sich erhöhte ddcf-DNA-Werte (cp/ml) in der ATG-Gruppe 6 Wochen nach Transplantation gegenüber den Teilnehmern, die Basiliximab als Induktionstherapie erhielten V3: 47 cp/ml (IQ: 35,5-201 cp/ml) vs 22,5 cp/ml (IQ: 16,7-41,7 cp/ml) $p = 0,036$ (Abb. 14). Eine zusätzliche Gabe von Rituximab vor der Transplantation zeigte im Verlauf keinen signifikanten Unterschied im Level der ddcf-DNA.

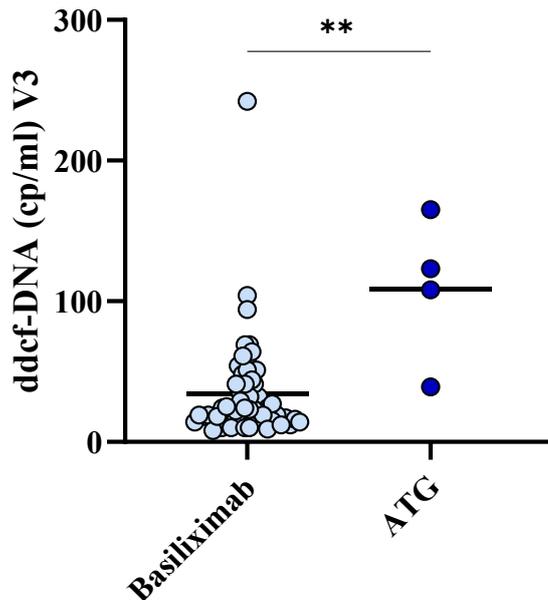


Abb. 14: Level der ddcf-DNA 6 Wochen nach NTX (Visite 3) je nach immunsuppressiver Induktionstherapie mit ATG oder Basiliximab. Es zeigen sich erhöhte ddcf-DNA-Werte bei den Teilnehmern, die zuvor ATG erhielten ($p = 0,036$). Angaben in cp/ml. ddcf-DNA = donor-derived cell-free DNA, ATG = Anti-Thymozytenglobulin, NTX = Nierentransplantation

Untersucht wurde ebenfalls der Effekt des Dialyseverfahrens vor Transplantation auf die ddcf-DNA nach erfolgter Nierentransplantation. Hier ergaben sich keine Unterschiede in der ddcf-DNA. Diese scheint also nicht durch die Hämodialyse oder Peritonealdialyse im Vorfeld beeinflusst zu werden.

3.4 Level der ddcf-DNA bei Teilnehmern mit oder ohne Komplikationen

Um die Hypothese, dass es bei einer Komplikation nach NTX zu einem Zelluntergang und somit zu einem Anstieg der ddcf-DNA kommt, zu untersuchen, wurden die Teilnehmer an den jeweiligen Visiten (V3-V6) aufgeteilt in eine Gruppe mit Komplikationen zu dem Zeitpunkt der Visite und eine Gruppe ohne Komplikationen. Als Komplikationen zählten eine BK-Virämie, eine Harnwegsinfektion, eine chirurgische Komplikation, z.B. Blutung, Hämatom, infizierte Lymphozele oder eine Abstoßung. An der Visite 4 war die mediane ddcf-DNA signifikant höher bei den Teilnehmern mit Komplikation als bei den Teilnehmern ohne Komplikation. 39 cp/ml (IQ: 21-75 cp/ml)

versus 18 cp/ml (IQ: 10,5-31,7 cp/ml) $p = 0,0038$. An den restlichen Kontrollvisiten konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden, die Tendenz war jedoch recht ähnlich zur Visite 4 (Abb. 15).

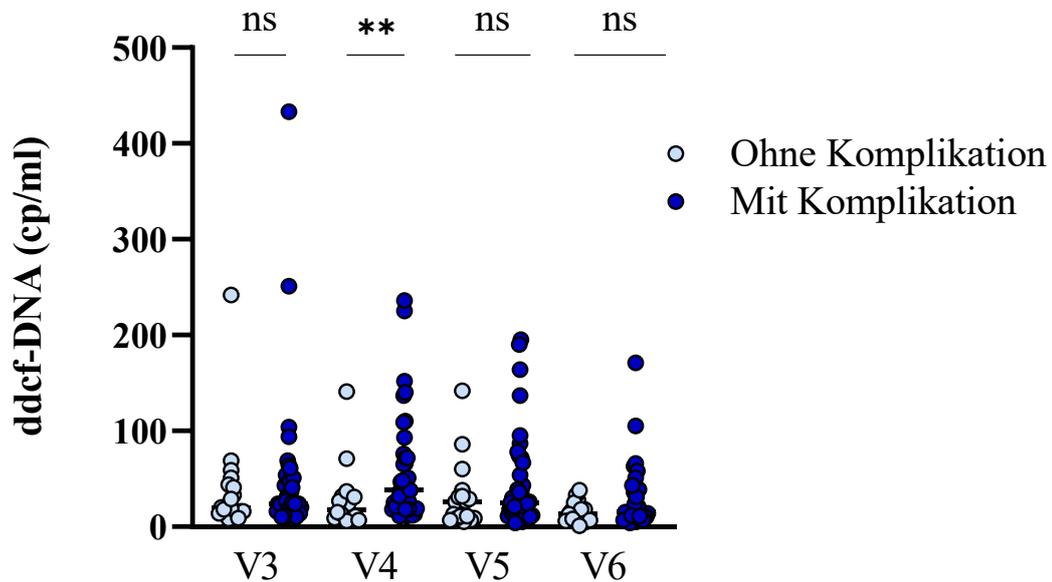


Abb. 15: Level der ddcf-DNA zwischen einer Gruppe mit einer post-NTX-Komplikation zum Zeitpunkt der Visite im Vergleich zu einer Gruppe ohne Komplikation. Als Komplikation zählten: BK-Virämie, Harnwegsinfektion, chirurgische Komplikationen oder eine Abstoßung. Die ddcf-DNA ist an der Visite 4 signifikant höher in der Gruppe mit Komplikation. ($p = 0,0038$). Angaben in cp/ml. ddcf-DNA = donor-derived cell-free DNA, NTX = Nierentransplantation

3.5 Ergebnisse der ddcf-DNA in Bezug auf das BK-Virus

3.5.1 ddcf-DNA und Kreatinin im Vergleich an der ersten dokumentierten BK-Virämie und der höchsten BK-Virämie

Wie in der vorherigen Analyse gezeigt, steigt die ddcf-DNA bei post-Transplantationskomplikationen zumindest teilweise signifikant an. Aus der bisherigen Erfahrung kann bei Transplantatschaden und BK-Virämie auch das Kreatinin ansteigen. Das Kreatinin diente also in dieser Analyse als Kontrollmarker/Vergleichsparameter. Um herauszufinden, ob auch die ddcf-DNA bei der BK-Virämie ansteigt, wurde die ddcf-DNA zum Zeitpunkt der ersten BK-Virämie des jeweiligen Teilnehmers genommen und die ddcf-DNA zum Zeitpunkt der höchsten erfassten BK-Virämie dieses Teilnehmers.

Als bereits verfügbaren Marker wurde gleichzeitig auch der Verlauf des Kreatinins unter den gleichen Bedingungen beobachtet. Die BK-Virus-Kopien sind im median signifikant ansteigend zwischen der ersten und der höchsten BK-Virämie 10.630 K/ml (IQ: 1.485-67.325 K/ml) vs 208.230 K/ml (IQ: 7.495- 868.075 K/ml) $p = 0,0010$ (Abb. 16). Auch das Kreatinin ist zwischen den beiden Zeitpunkten der ersten und höchsten BK-Virämie im median signifikant ansteigend 1,6 mg/dl (IQ: 1,34-2,5 mg/dl) vs 1,89 mg/dl (IQ: 1,4-2,9 mg/dl) $p = 0,0227$ (Abb. 17). Die mediane ddcf-DNA ist ebenfalls signifikant parallel zum Anstieg der BK-Viren und des Kreatinins angestiegen 16,5 cp/ml (IQ 12,0-22,75 cp/ml) vs 24 cp/ml (IQ: 12,75- 46,75 cp/ml) $p = 0,0254$ (Abb. 18). Somit zeigt sich, dass eine steigende BK-Virämie vermutlich einen Transplantatschaden auslöst, der sich sowohl in steigenden Kreatininwerten als auch steigenden ddcf-DNA-Werten widerspiegelt.

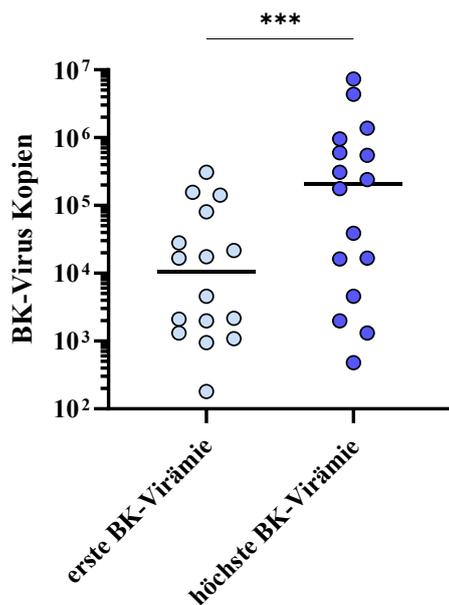


Abb. 16: Vergleich der BK-Virus-Kopien zum Zeitpunkt der ersten BK-Virämie und zum Zeitpunkt der höchsten gemessenen BK-Virämie beim jeweiligen Teilnehmer. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg zwischen den beiden Messungen. ($p = 0,001$). Angaben in log10 in absoluten Kopien.

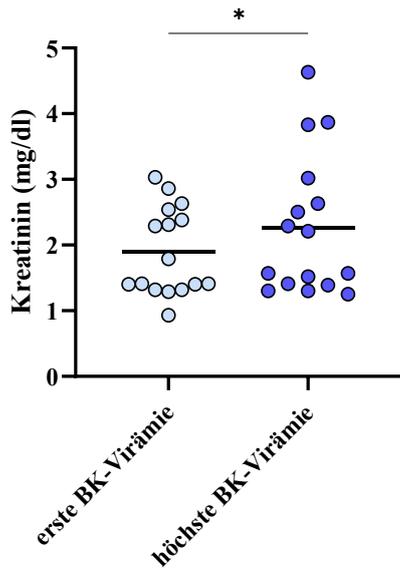


Abb. 17: Vergleich des Kreatinins zum Zeitpunkt der ersten BK-Virämie und zum Zeitpunkt der höchsten gemessenen BK-Virämie beim jeweiligen Teilnehmer. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg zwischen den beiden Messungen. ($p = 0,0227$). Angaben in mg/dl.

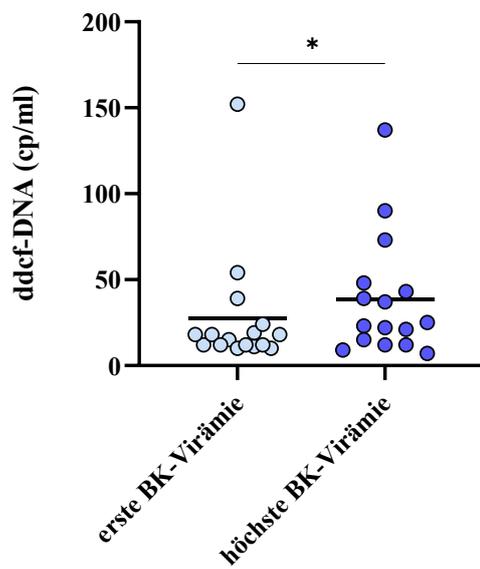


Abb. 18: Vergleich der ddcf-DNA zum Zeitpunkt der ersten BK-Virämie und zum Zeitpunkt der höchsten gemessenen BK-Virämie beim jeweiligen Teilnehmer. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg zwischen den beiden Messungen. ($p = 0,0254$). Angaben in cp/ml.

3.5.2 ddcf-DNA und Kreatinin im Vergleich an der höchsten BK-Virämie und der negativen BK-Virämie (negativ oder < 500 Kopien/ml)

Herauszufinden galt es, ob bei wieder abfallender/geheilter BK-Virämie, definiert durch nicht-nachweisbare BK-Virus-Kopien oder fast negative BK-Virus-Kopien (< 500 Kopien/ml), auch die ddcf-DNA wieder rückläufig ist. Die Hypothese bestand darin, dass der entstandene Zellschaden, der sich vermutlich teilweise erholt hat, durch die ddcf-DNA verfolgt werden kann. Auch diese Untersuchung wurde im Vergleich zu dem bekannten Marker, dem Kreatinin, durchgeführt. Beobachten konnte man, dass die mediane ddcf-DNA bei negativen oder < 500 BK-Viren/ml ebenfalls wieder signifikant rückläufig ist 18 cp/ml (IQ: 12-31 cp/ml) vs 12 cp/ml (IQ: 9,5-13,5 cp/ml) $p = 0,0355$. Auch das mediane Kreatinin war signifikant abfallend 2,29 mg/dl (IQ: 1,38-2,85 mg/dl) vs 1,92 mg/dl (IQ: 1,42-2,30 mg/dl) $p = 0,0391$. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die ddcf-DNA sowohl den Verlauf der BK-Virämie als auch des Kreatinins verfolgen kann und ein zusätzlicher Marker für eine Erholung eines zuvor entstandenen Transplantatschadens darstellt.

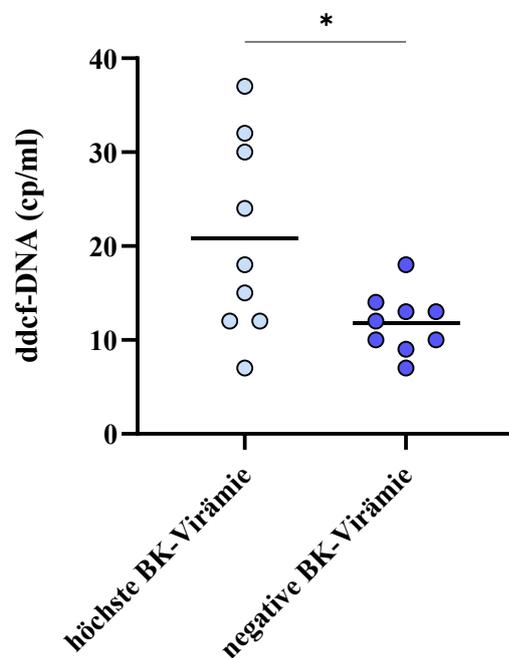


Abb. 19: Vergleich der ddcf-DNA bei dem jeweiligen Teilnehmer zum Zeitpunkt der höchsten BK-Virämie und der abfallenden/geheilten BK-Virämie (BK-Virus Kopien < 500 K/ml). Die ddcf-DNA fällt signifikant ab, wenn die BK-Virus-Kopien rückläufig sind. ($p = 0,0355$). Angaben in cp/ml. ddcf-DNA = donor-derived cell-free DNA.

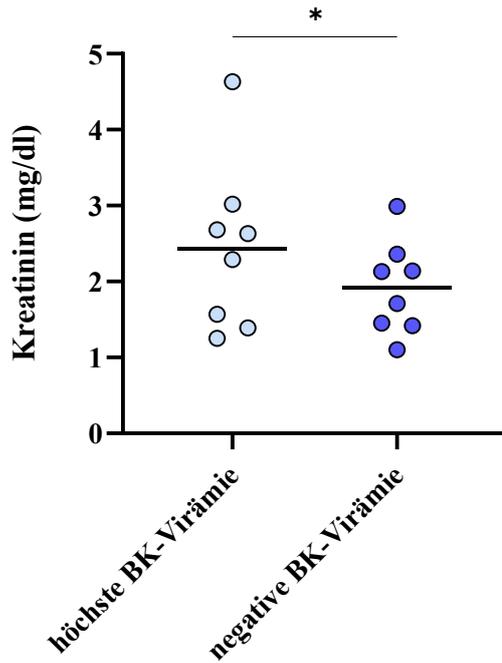


Abb. 20: Vergleich des Kreatinins bei dem jeweiligen Teilnehmer zum Zeitpunkt der höchsten BK-Virämie und der abfallenden/geheilten BK-Virämie (BK-Virus Kopien < 500 K/ml). Das Kreatinin fällt signifikant ab, wenn die BK-Virus Kopien rückläufig sind. ($p = 0,0391$). Angaben in mg/dl.

3.5.3 Korrelation zwischen ddcf-DNA und BK-Virus-Kopien

Die ddcf-DNA ist zum Zeitpunkt der höchsten BK-Virämie ebenfalls erhöht und bei negativen oder < 500 BK-Virus-Kopien/ml fällt sie wieder ab (siehe Ergebnisse 3.3.1 und 3.3.2). Somit wurde analysiert, ob eine Korrelation zwischen BK-Virus-Kopien und ddcf-DNA besteht. Hierfür wurden alle verfügbaren BK-Virus-Kopien mit *gematchter* ddcf-DNA analysiert. Zusätzlich für diese Analyse wurden verfügbare Werte aus den außerplanmäßigen Visiten (A-Visiten) eingeschlossen. Es zeigte sich eine positive Korrelation ($r = 0,2452$ CI: 0,01732 to 0,4489, $p = 0,035$) (Abb. 21). Je höher die BK-Virämie, desto ausgeprägter ist die Freisetzung der ddcf-DNA.

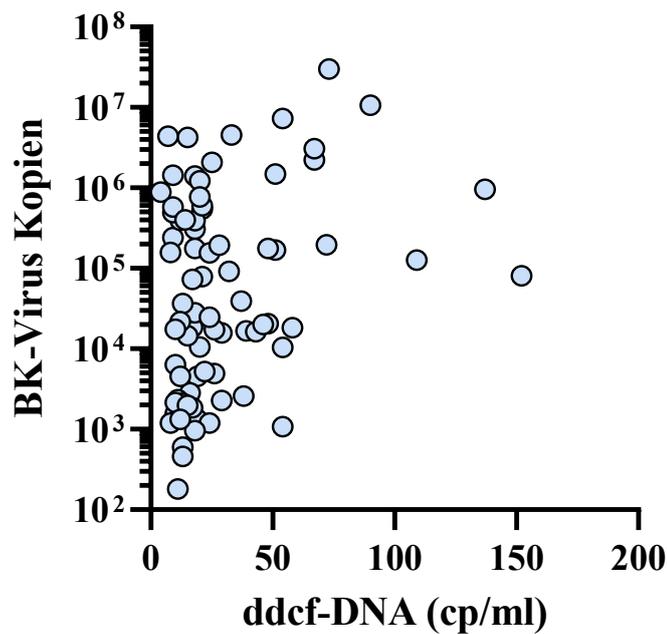


Abb. 21: Korrelation zwischen der ddcf-DNA und den BK-Virus-Kopien unabhängig ob eine BK-Nephropathie vorliegt oder nicht. Eingeschlossen sind auch außerplanmäßige Visiten. Es zeigt sich eine positive Korrelation zwischen der ddcf-DNA und den BK-Virus-Kopien. ($p = 0,035$). Angaben in absoluten Kopien log10 und in cp/ml. ddcf-DNA = donor-derived cell-free DNA.

3.5.4 Korrelation zwischen ddcf-DNA und Kreatinin

Um herauszufinden, ob die ddcf-DNA auch eine Korrelation zum Kreatinin aufweist, wurden alle *matching* Kreatininwerte und ddcf-DNA Werte analysiert, inklusive der A-Visiten. In den vorherigen Graphiken hatten sich die Kreatininwerte bei steigenden oder abfallenden BK-Viren nämlich parallel zur ddcf-DNA bewegt. Es besteht keine signifikante Korrelation zwischen ddcf-DNA und Kreatinin. ($r = 0,03829$ CI: - 0,1358 to 0,2101, $p = 0,658$) (Abb. 22). Auch zwischen der eGFR (ml/min) und der ddcf-DNA besteht keine Korrelation. ($r = - 0,02099$ CI: - 1922 to 0,1515, $p = 0,809$). Hierdurch erkennt man, dass die ddcf-DNA ein unabhängiger Marker für eine Transplantatschädigung durch BK-Viren darstellen kann.

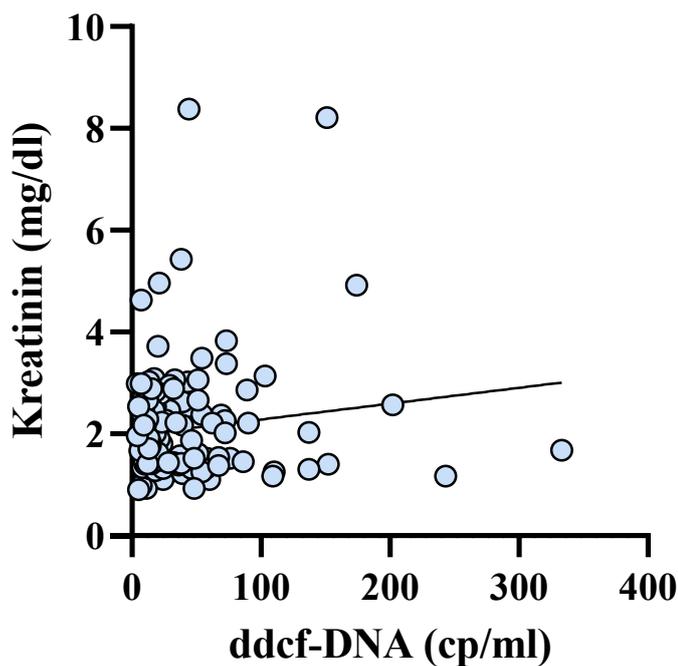


Abb. 22: Korrelation zwischen dem Kreatinin und der ddcf-DNA. Eingeschlossen sind auch Werte aus außerplanmäßigen Visiten. Es zeigt sich keine Korrelation ($p = 0,658$). Angaben in mg/dl und cp/ml.

3.5.5 Verlauf der ddcf-DNA und des Kreatinins bei steigenden BK-Viren in der BK-Virämie-Gruppe im Vergleich zur Polyomavirusnephropathie- Gruppe

Ziel war es herauszufinden, wie die ddcf-DNA sich in der BK-Virämie-Gruppe (ohne aktuellen oder zukünftigen Nachweis einer BK-Nephropathie) bei steigenden BK-Virus Kopien verhält, auch im Vergleich zum Kreatinin. Es wurden daher nur Teilnehmer in die Analyse eingeschlossen, deren BK-Viren, nach der Erstdiagnose der BK-Virämie (Zeitpunkt der ersten BK-Virämie = T0), angestiegen sind. Der erste ansteigende Wert wurde als T1 bezeichnet. Zwischen den beiden Werten T0 und T1 lagen im Median 1,37 Monate. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der medianen BK-Virus-Kopien zwischen dem Zeitpunkt T0 und T1 T0: 9.800 K/ml (IQ: 375-67325 K/ml) vs T1: 27.650 K/ml (IQ: 1.455-338.865 K/ml) $p = 0,007$ (Abb. 23), allerdings waren weder das mediane Kreatinin, T0: 1,37 mg/dl (IQ: 1,32-2,25 mg/dl) vs T1: 1,51 mg/dl (IQ: 1,26- 2,18 mg/dl) noch die mediane ddcf-DNA T0: 18 cp/ml (IQ: 11,5-26,2 cp/ml) vs T1: 29,5 cp/ml (IQ 18,2-56,70 cp/ml) $p > 0.210$ signifikant ansteigend (Abb. 24, Abb. 25).

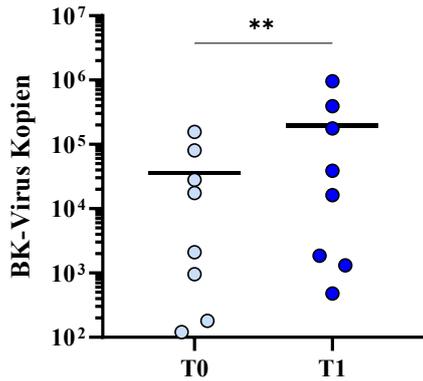


Abb. 23: Vergleich der BK-Virus-Kopien bei dem jeweiligen Teilnehmer (Gruppe BK-Virämie) in der Frühphase zwischen T0 (dem ersten gemessenen Wert) und T1 (dem zweiten gemessenen Wert). Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg ($p = 0,007$). Angaben in absoluten Kopien log10.

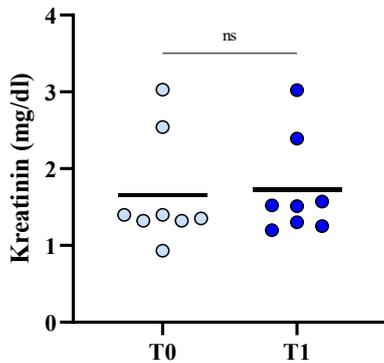


Abb. 24: Vergleich des Kreatinins bei dem jeweiligen Teilnehmer (Gruppe BK-Virämie) in der Frühphase zwischen T0 (dem ersten gemessenen Wert des BK-Virus) und T1 (dem zweiten gemessenen Wert des BK-Virus). Es zeigt sich kein signifikanter Anstieg ($p > 0,210$). Angaben in mg/dl.

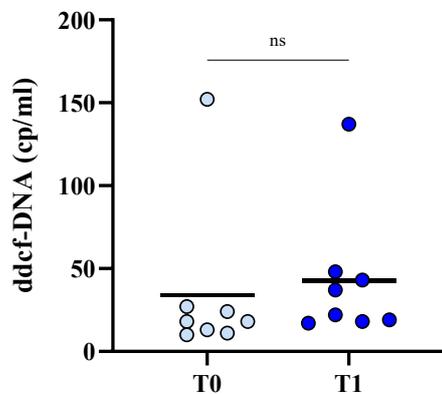


Abb. 25: Vergleich der ddcf-DNA bei dem jeweiligen Teilnehmer (Gruppe BK-Virämie) in der Frühphase zwischen T0 (dem ersten gemessenen Wert des BK-Virus) und T1 (dem zweiten gemessenen Wert des BK-Virus). Es zeigt sich kein signifikanter Anstieg ($p > 0,210$). Angaben in cp/ml.

Die gleiche Analyse erfolgte dann mit den Teilnehmern, die im Verlauf der Studie eine Polyomavirusnephropathie entwickelten. Auch hier wurde der Zeitpunkt der ersten BK-Virämie gewählt (T0) und dann der erste angestiegene Wert der BK-Virus-Kopien (T1) ausgewählt. Zwischen T0 und T1 lagen im Median 1,27 Monate, vergleichbar zur BK-Virämie-Gruppe. Die medianen BK-Viren waren nicht signifikant ansteigend zwischen T0 und T1, allerdings auch bei geringer Teilnehmeranzahl. T0: 11.930 K/ml (IQ: 1.350-236.425 K/ml) vs T1: 1.132.500 K/ml (IQ: 167.250- 3.705.000 K/ml) $p = 0,125$ (Abb. 26). Das mediane Kreatinin T0: 1,67 mg/dl (IQ: 1,44- 2,23 mg/dl) vs T1: 2,09 mg/dl (IQ: 1,52-2,73 mg/dl) $p = 0,625$ (Abb. 27) und die mediane ddcf-DNA T0: 15 cp/ml (IQ: 10,5-45 cp/ml) vs T1: 20 cp/ml (IQ: 9,7-60,2cp/ml) $p = 0,250$ (Abb. 28), waren zwar ansteigend, allerdings nicht statistisch signifikant. Somit konnte kein signifikanter Anstieg des Kreatinins und der ddcf-DNA zwischen T0 und T1 in dieser Analyse gesehen werden, so dass in der Frühphase mittels der ddcf-DNA kein Hinweis auf eine Entwicklung einer zukünftigen BK-Nephropathie vorausgesagt werden kann.

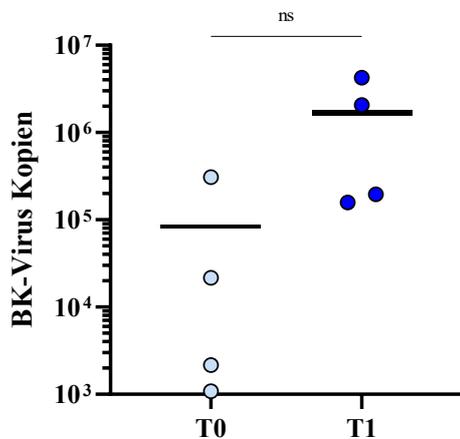


Abb. 26: Vergleich der BK-Virus-Kopien bei dem jeweiligen Teilnehmer (Gruppe BK-Nephropathie) in der Frühphase zwischen T0 (dem ersten gemessenen Wert) und T1 (dem zweiten gemessenen Wert). Es zeigt sich kein signifikanter Anstieg ($p = 0,125$). Angaben in absoluten Kopien \log_{10} .

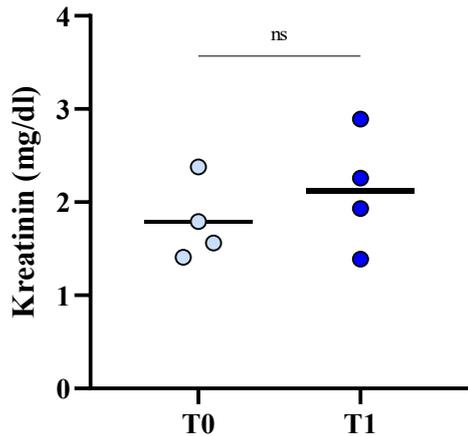


Abb. 27: Vergleich des Kreatinins bei dem jeweiligen Teilnehmer (Gruppe BK-Nephropathie) in der Frühphase zwischen T0 (dem ersten gemessenen Wert des BK-Virus) und T1 (dem zweiten gemessenen Wert des BK-Virus). Es zeigt sich kein signifikanter Anstieg ($p = 0,625$). Angaben in mg/dl.

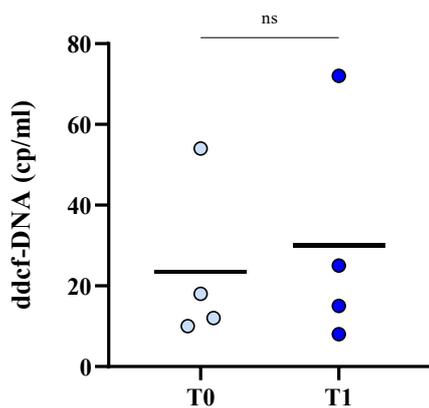


Abb. 28: Vergleich der ddcf-DNA bei dem jeweiligen Teilnehmer (Gruppe BK-Nephropathie) in der Frühphase zwischen T0 (dem ersten gemessenen Wert des BK-Virus) und T1 (dem zweiten gemessenen Wert des BK-Virus). Es zeigt sich kein signifikanter Anstieg ($p = 0,250$). Angaben in cp/ml.

3.6 Donor-derived cell-free DNA zum Zeitpunkt der Transplantatnierenbiopsie

3.6.1 Vergleich der ddcf-DNA nach Biopsiebefund

Zur weiteren Analyse wurde die ddcf-DNA jeweils zum Zeitpunkt der Transplantatnierenbiopsie bestimmt (A-Visite). Die Teilnehmer wurden dann in drei Gruppen je nach Biopsie-Ergebnis aufgeteilt. Es handelte sich um eine Gruppe mit Tubulusschaden, eine Gruppe mit zellulärer Abstoßung (TCMR) und eine Gruppe mit

Polyomavirusnephropathie. Die ddcf-DNA wurde dann unter den drei Gruppen verglichen. Es zeigte sich im Median ein signifikant höherer ddcf-DNA-Wert im Rahmen einer akuten zellulären Abstoßung als bei einer Polyomavirusnephropathie 89 cp/ml (IQ: 34-227 cp/ml) vs 20 cp/ml (IQ: 14-33 cp/ml) $p = 0,0115$ (Abb. 29). Zwischen der Abstoßung und dem Tubulusschaden gab es allerdings im Median der ddcf-DNA keinen signifikanten Unterschied 89 cp/ml (IQ: 34-227 cp/ml) vs 32 cp/ml (IQ: 22-119 cp/ml) $p = 0,9114$. Auch der Tubulusschaden erzeugte keine höheren medianen ddcf-DNA-Werte im Vergleich zur Polyomavirusnephropathie. 32 cp/ml (IQ: 22-119 cp/ml) vs 20 cp/ml (IQ: 14-33 cp/ml) $p = 0,1190$.

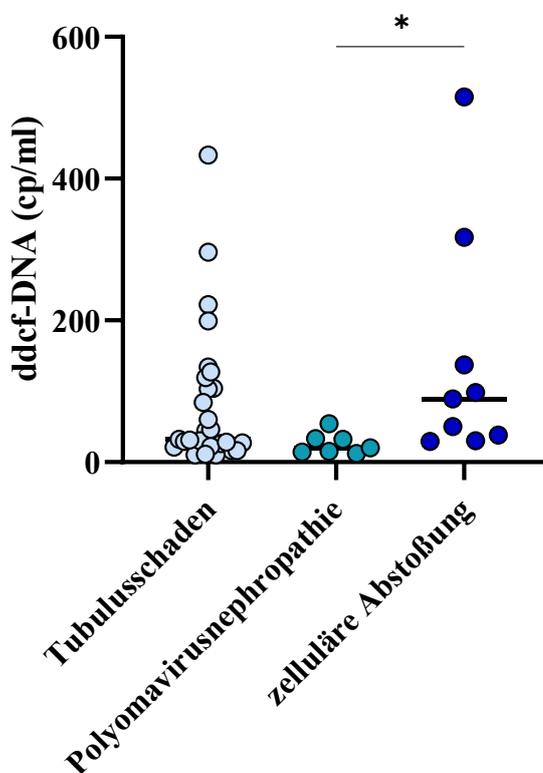


Abb. 29: Vergleich der ddcf-DNA zum Zeitpunkt der Biopsie je nach Biopsiebefund. Es zeigt sich ein signifikant höheres Level der ddcf-DNA bei der zellulären Abstoßung im Vergleich zu der Polyomavirusnephropathie ($p = 0,0115$) Angaben in cp/ml. ddcf-DNA = donor-derived cell-free DNA.

3.6.2 Vergleich der ddcf-DNA bei replikativer BK-Virämie nach Biopsie- Befund

Zur weiteren Unterscheidung, ob die ddcf-DNA zum Zeitpunkt der Biopsie bei der BK-Nephropathie höher liegt, als bei der reinen BK-Virämie und somit eine Biopsie

umgangen werden könnte, wurden bei den Teilnehmern, die eine BK-Virämie aufwiesen, zum Zeitpunkt der Biopsie die ddcf-DNA bestimmt. Hier zeigte sich keine signifikante Differenz zwischen den Teilnehmern, die nur eine BK-Virämie aufwiesen ohne Nachweis einer bioptisch gesicherten Polyomavirusnephropathie und denen, die die Diagnose einer Polyomavirusnephropathie erhielten. Die mediane ddcf-DNA beim Tubulusschaden lag bei 24,5 cp/ml (IQ: 6,7-88,2 cp/ml) vs bei der Polyomovirusnephropathie bei 17 cp/ml (IQ: 12,5- 32,7 cp/ml) $p = 0,776$ (Abb. 30).

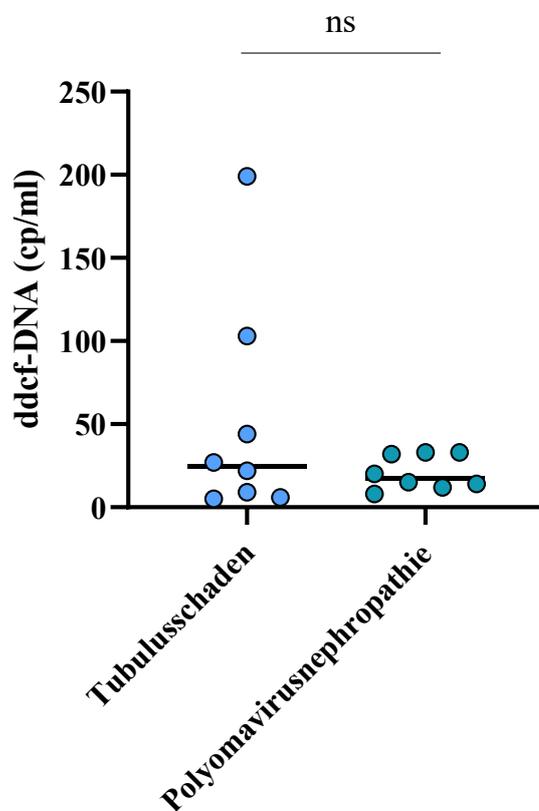


Abb. 30: Vergleich der ddcf-DNA zum Zeitpunkt der Biopsie bei den BKV+ Teilnehmern, je nach Biopsiebefund. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied der ddcf-DNA zwischen dem Tubulusschaden oder der bestätigten BK-Nephropathie ($p = 0,776$). Angaben in cp/ml. ddcf-DNA = donor-derived cell-free DNA, BKV+ = BK-Virus positive Replikation.

4 Diskussion

Nach erfolgter Nierentransplantation kann es trotz besserer Lebenserwartung und einer besseren Lebensqualität zu schwerwiegenden Komplikationen, vor allem aufgrund der immunsuppressiven Therapie, kommen. Hierzu zählen die infektiösen Komplikationen mit Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten, die teils auch opportunistisch sein können. Zusätzlich erhöht sich auch das Risiko für maligne Erkrankungen. Leider fehlt es in der Transplantationsmedizin an nicht-invasiven Markern, die sensitiv und spezifisch genug sind, solche Komplikationen erkennen oder ausschließen zu können. Oftmals kann nur mit Laborwerten, wie zum Beispiel dem Kreatinin, welches jedoch zu spät im Rahmen einer Komplikation ansteigt, ein Transplantatschaden gesehen werden. Die genaue Diagnose ist dann zurzeit oft nur mittels einer invasiven Biopsie festzustellen. Diese birgt jedoch ein Risiko für Komplikationen, wie zum Beispiel eine schwerwiegende Blutung. Die BK-Nephropathie ist einer der viralen Infekte, die nach Nierentransplantation in bis zu 10 % der Fälle auftritt, nur invasiv diagnostiziert werden kann und bei nicht adäquater Reduktion der Immunsuppression zum Verlust des Nierentransplantates führen kann. Diese Studie sollte die ddcf-DNA als nicht-invasiven Marker analysieren und in Bezug auf die BK-Nephropathie untersuchen.

4.1 Patientenkollektiv

Insgesamt waren 118 Patienten für die Auswertung der Daten in die Studie eingeschlossen worden. Im Verlauf entwickelten 33 Patienten eine BK-Virämie, insgesamt also 28 %. Diese Daten liegen im oberen Bereich der in der Literatur beschriebenen Inzidenz für die BK-Virämie nach Nierentransplantation mit 10-30 % nach (Kant et al. 2022). Durch die immunsuppressive Therapie steigt das Risiko einer BK-Virämie. Standardmäßig erhielten die Patienten der Kohorte fast alle eine tripple-Therapie mit einem Calcineurin-Hemmer, MMF und Glukokortikosteroiden. Die in der Literatur angegebenen Inzidenzen sind daher immer auch im Zusammenhang der immunsuppressiven Therapie zu werten. In der Kohorte waren insgesamt 7 Patienten eingeschlossen worden, die im Verlauf den histopathologischen Nachweis einer Polyomavirusnephropathie hatten. Dies entsprach knapp 6 % aller eingeschlossenen

Teilnehmer. Diese Anzahl deckt sich mit den bekannten Inzidenzzahlen der BKN nach Nierentransplantation zwischen 1-10 % (Gately et al. 2023). Grundsätzlich war die Kohorte zur Auswertung der Fragestellung relativ klein, sodass die Ergebnisse zum Teil kritisch gewertet werden müssen.

4.2 Zusammenhang der Charakteristiken und der ddcf-DNA

In der vorliegenden Kohorte wurde die Korrelation zwischen einem BMI > 30 kg/m² und der ddcf-DNA (in % der cf-DNA) an den verschiedenen Visiten untersucht. Es konnte eine negative Korrelation an Visite 3 (6 Wochen nach NTX) nachgewiesen werden. Je höher der BMI, desto niedriger war die ddcf-DNA (V3: $r = -0,264$, $p = 0,04$). Die Hypothese besteht darin, dass ein erhöhter Lipidstoffwechsel mit einer allgemein erhöhten cf-DNA bei inflammatorischen Prozessen einhergeht und somit der Prozentsatz der ddcf-DNA falsch niedrig ist. Wenn die ddcf-DNA in cp/ml angegeben wurde, gab es keine Korrelation. Grundsätzlich kann nach der formulierten Hypothese ein eventuelles Bias mit dem BMI umgangen werden, indem die ddcf-DNA in absoluter Anzahl angegeben wird. In einer Studie von Sureshkumar und al. wurde ebenfalls der BMI in Bezug auf die ddcf-DNA untersucht. Hier konnte ein positiver korrelierender Effekt gezeigt werden. Bei einem BMI von > 30kg/m² stieg die ddcf-DNA (%) linear an (Sureshkumar, Aramada, and Chopra 2020). Dies steht somit im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen und der aufgeführten Hypothese. Es fehlen also größere Studien, die diese spezifische Fragestellung erneut untersuchen.

Theoretisch schwierig wird die Interpretation der ddcf-DNA auch, wenn die Patienten mehr als ein Spenderorgan erhalten. (Zum Beispiel eine kombinierte Niere/Pankreastransplantation oder eine Herz/Lungentransplantation) (Keller and Agbor-Enoh 2021). Kommt es zu einer erhöhten ddcf-DNA, kann nicht sicher differenziert werden, welches Organ vom akuten Schaden betroffen ist. Zudem besteht auch die Frage, wie die ddcf-DNA zu werten ist, wenn ein funktionsloses Transplantat weiterhin in situ ist. In der vorliegenden Studie waren die Teilnehmer im Mittel $1,14 \pm 0,43$ -mal transplantiert. Es bestand im Median keine erhöhte ddcf-DNA (cp/ml) an den verschiedenen Visiten im Vergleich zur Ersttransplantation bei den Teilnehmern, die ≥ 2 Transplantationen erhielten ($p = 0,17$).

In der vorliegenden Studie konnte keine Korrelation der ddcf-DNA mit der KIZ nachgewiesen werden (V2: $p = 0,578$, V3: $p = 0,375$). Anand et al. beschäftigten sich ebenfalls mit mehreren klinischen Parametern und dem Level der ddcf-DNA (Anand et al. 2021). Es wurde unter anderem auch keine Korrelation zwischen der KIZ und der ddcf-DNA nach 1 Monat post-NTX beobachtet. Somit scheint eine längere Konservierung *ex vivo* im Eis keine erhöhte ddcf-DNA freizusetzen.

Bezüglich der Spendercharakteristika wurde kein Unterschied zwischen einer Lebend- oder Leichenspende in der Höhe der ddcf-DNA gesehen. In der vorliegenden Kohorte gab es eine Tendenz dazu, dass die median ddcf-DNA an den Visiten bei der Leichenspende höher waren also bei der Lebendspende, das Resultat war allerdings nicht signifikant. Zu erklären wäre die leicht erhöhte Tendenz nur durch einen ausgeprägteren Ischämie-Reperfusionsschaden, dies würde dann allerdings auch eine erhöhte Freisetzung der ddcf-DNA bei erhöhter KIZ bedeuten, welche nicht nachgewiesen wurde.

Es konnte gezeigt werden, dass die ddcf-DNA nach 6 Wochen post-NTX bei Induktion mit ATG im median höher lag, als bei den Teilnehmern, die Basiliximab erhielten. ($p = 0,036$). Anand et al. konnten dies ebenfalls nachweisen. Grundsätzlich muss angemerkt werden, dass oft die Teilnehmer mit bereits präformierten HLA-Antikörpern (zum Beispiel durch eine Transfusion, Schwangerschaft, gewissen Impfungen oder eine vorangegangene Transplantation) eine Induktion mit ATG erhalten. Es sind also oft die Teilnehmer, die im Verlauf ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von donorspezifischen Antikörpern mit humoraler Abstoßung haben. In Studien gehen die donorspezifischen Antikörper mit erhöhter ddcf-DNA einher (Halloran et al. 2023). Auch die ABMR ist mit einer erhöhten Freisetzung der ddcf-DNA verbunden (Oellerich et al. 2019). Die erhöhte ddcf-DNA nach einer ATG-Induktion kann also auch ein Bias sein, indem die ddcf-DNA durch die Präsenz von donorspezifischen Antikörpern oder einer chronischen humoralen Abstoßung erhöht ist. Schlussfolgernd ist die ddcf-DNA also von mehreren Spendern/Empfänger- oder Transplantationscharakteristiken abhängig. Weitere Untersuchungen sind in Zukunft notwendig um die ddcf-DNA besser einstufen zu können.

4.3 Zeitlicher Verlauf der ddcf-DNA nach Transplantation

In den ersten zwei Wochen nach Transplantation kommt es zu einem exponentiellen Abfall der ddcf-DNA (Oellerich et al. 2021). In der vorliegenden Studie zeigte sich der exponentielle Abfall ebenfalls, allerdings waren die Werte an Tag 10 nach Transplantation weiterhin signifikant höher als nach 6 Wochen. Das *Baseline* ist in der vorliegenden Kohorte im Mittelwert also erst nach 3,71 Wochen erreicht. In einer pädiatrischen Kohorte wurde eine *Baseline* der ddcf-DNA im Median nach 8 Tagen erreicht (Nie et al. 2021). Erklärt wird der Abfall der ddcf-DNA a.e. durch einen Ischämie-Reperfusionsschaden, der kurz nach der Transplantation entsteht und im Verlauf langsam wieder abnimmt (Oellerich et al. 2021). Die Aussagekraft der ddcf-DNA bezüglich weiterer Pathologien, wie zum Beispiel einer akuten Abstoßung oder einer akuten Infektion im Zeitrahmen kurz nach der Transplantation, ist dementsprechend deutlich eingeschränkt.

4.4 ddcf-DNA und BK-Virämie/ BK-Nephropathie

Es wurden bereits mehrere Studien publiziert, die die diagnostische Performanz der ddcf-DNA im Rahmen einer Polyomavirusnephropathie untersucht haben. Chen et al. untersuchten die ddcf-DNA im Urin und fanden heraus, dass die Urin-ddcf-DNA-Werte in der bioptisch gesicherten (SV-40 positiven) BKN höher lagen als bei den Teilnehmern, die nur eine mögliche BKN aufwiesen (definiert durch $> 7 \log_{10}$ BK DNA Virurie ohne Nachweis im Serum) (Chen et al. 2020). Die gleiche Gruppe zeigte diese Ergebnisse in einer erneuten Studie, hier war die Urin-ddcf-DNA bei der BKN höher als bei der TCMR oder im Rahmen eines Tubulusschadens. Die ddcf-DNA im Serum war in dieser Studie vor allem bei der zellulären Abstoßung erhöht (Chen et al. 2022). Die Urin-ddcf-DNA wurde in der unserer Kohorte nicht untersucht, somit ist es schwierig, die Ergebnisse dieser Studien mit den vorliegenden zu vergleichen. Das BK-Virus greift vor allem den tubulären Apparat in der Transplantatniere an, somit wird die durch Nekrose oder Apoptose freigesetzte ddcf-DNA direkt in den Urin abgegeben. Zusätzlich wird die ddcf-DNA durch die Basalmembran der Glomeruli filtriert und gelangt somit ebenfalls durch das Blut in den Harn. Bei der BK-Virämie wäre daher eine intensivere Untersuchung der

ddcf-DNA im Urin durchaus zielführend. Dagegen spricht jedoch, dass man nicht genau weiß, inwiefern die ddcf-DNA gegebenenfalls von der Urinkonzentration abhängt oder zu welchem Zeitpunkt die Urinprobe asserviert wurde. Die Konzentration kann daher sehr unterschiedlich ausfallen. Die Reproduktibilität und Aussagekraft sind daher in der klinischen Praxis deutlich schwieriger, als die Bestimmung der ddcf-DNA im Serum.

Mayer et al untersuchten die ddcf-DNA zwischen Teilnehmern mit einer bioptisch gesicherten BK-Nephropathie und einer gesicherten TCMR. Hier wurden keine Unterschiede im Median der ddcf-DNA gesehen (Mayer et al. 2022). Vielmehr wurde auch hier wieder die erhöhte ddcf-DNA bei ABMR + donorspezifischen Antikörpern im Vergleich zur BKN beschrieben. Das erste Resultat steht im Gegenteil zu unseren vorliegenden Ergebnissen, da in der vorliegenden Kohorte zum Zeitpunkt der Biopsie die mediane ddcf-DNA bei TCMR signifikant höher lag als bei den Patienten mit BKN. Hier könnte ein Bias sein, dass in der oben aufgeführten Studie der Zeitpunkt der Abnahme ddcf-DNA in Bezug auf die Biopsie nicht mitgeteilt wird. In der vorliegenden Kohorte wurden die ddcf-DNA entweder am Tag vorher oder höchstens im Abstand von 3 Wochen vor der Biopsie abgenommen. Die Proben der ddcf-DNA direkt nach Biopsie wurden nicht eingeschlossen, da hier durch die invasive Maßnahme eine Freisetzung von ddcf-DNA zu erwarten wäre und der Wert falsch hoch sein würde. Erklärlich für die höhere Freisetzung der ddcf-DNA im Rahmen einer TCMR gegenüber der BKN ist, nach vorliegenden Daten, dass der Schaden bei der BKN eher chronisch und unterschwellig stattfindet und die ddcf-DNA daher nicht so hoch ist, wie bei der akuten Abstoßung.

In der vorliegenden Kohorte waren keine Patienten mit ABMR eingeschlossen worden. Es gab zwei Patienten mit Nachweis einer ABMR in der Biopsie, allerdings fehlten zum Zeitpunkt der Biopsie passende ddcf-DNA-Werte zur korrekten Auswertung der Daten. Ob also eine vermehrte Freisetzung der ddcf-DNA bei der ABMR gegenüber der TCMR oder der BKN erfolgt, konnten in dieser Studie nicht untersucht werden.

Kant et al. (Kant et al. 2020) beschäftigten sich 2020 bereits mit der Frage, ob die ddcf-DNA einen Progress von der BK-Virämie zur BKN voraussagen kann. Hierzu wurden retrospektiv 10 Teilnehmer der DART-Studie mit BK-Virämie und BKN analysiert. In der Studie wurde die BKN, auch ohne bioptischen Nachweis, mit $> 10\log_4$ BKV-Kopien definiert. Dies stellt einen deutlichen Unterschied zu der vorliegenden Studie dar, da hier Patienten mit $>10\log_4$ BKV-Kopien ohne erfolgte bioptische Sicherung einer BKN noch in die BKV-Gruppe eingestuft wurden. Grundsätzlich besteht hiermit auch in der

vorliegenden Kohorte ein Bias, da es keinen definierten Zeitpunkt gab, an dem die Patienten biopsiert wurden. Dies erfolgte aufgrund individueller Entscheidungen bei Kreatinin Anstieg oder subjektiv bei sehr hohen BKV-Kopien. In den Leitlinien gibt es keinen festen Zeitpunkt, an dem eine Biopsie erfolgen sollte. Somit sind sowohl in der vorliegenden Studie als auch in der Studie von Kant et al. Patienten vermutlich nicht in der korrekten Gruppe eingestuft worden. In der vorliegenden Kohorte gibt es eventuell Patienten, die bereits eine BKN haben, aber aufgrund einer fehlenden Biopsie in der BKV-Gruppe eingestuft sind. Bei Kant und al. sind vermutlich Patienten ohne BKN in der BKN-Gruppe „gelandet“. Um diesem Problem, welches rezidivierend in den Studien vorkommt, vorzubeugen, wurden im Oktober 2022 in einer Studie neue Standard-Definitionen vorgeschlagen, um die BKN besser einzustufen. Hierbei handelt es sich um die gesicherte (*proven*) BKN, definiert durch einen histopathologischen Nachweis in der Transplantatbiopsie mit SV40-Positivität. Die zweite Stufe ist die mögliche (*probable*) BKN, die nur benutzt werden sollte, wenn eine Biopsie nicht möglich oder nicht aussagekräftig ist. Die Definition muss alle folgenden Kriterien enthalten: Nierentransplantiert mit aktiver Immunsuppressionstherapie, ein Anstieg des S-Kreatinin $> 20\%$ von der *Baseline* (Zeitraum undefiniert), keine alternative Erklärung für die Symptomatik oder die Transplantatnierenverschlechterung und Nachweis von repetitiv relevante BK-Virus-Kopien im Blut (kein *cut-off* beschrieben) (Imlay et al. 2022). Grundsätzlich lässt auch diese Definition ein weites Spektrum an Bias zu, da kein *cut-off* für eine relevante BK-Virämie angegeben wird. Auch bei nicht gleichen Voraussetzungen konnten Kant et al. eine positive Korrelation zwischen den BK-Viren und der ddcf-DNA beschreiben. Dies konnte auch in der vorliegenden Kohorte bestätigt werden bei deutlich mehr verfügbaren Proben zur Analyse. Bei Kant et al. war der Median ddcf-DNA-Wert in der BKN-Gruppe höher als in der BKV-Gruppe. Dies konnten in unsrer Kohorte nicht signifikant nachgewiesen werden. (Median- ddcf-DNA für BKV: 21 cp/ml (IQ: 13-35 cp/ml) vs BKN: 21 cp/ml (IQ: 12- 54), $p= 0,531$). Vielmehr scheint die ddcf-DNA im Rahmen der BKN ein chronischer, unterschwelliger und aber auch dynamischer Marker zu sein, der bei dem Übergang einer BK-Virämie zur BKN nicht deutlich ansteigt. Zusätzlich ist auch je nach *Baseline*-ddcf-DNA des jeweiligen Teilnehmers die ddcf-DNA anders zu werten.

Dies wird auch erneut verdeutlicht, wenn die Studie von Xie et al. betrachtet wird (Xie et al. 2021). Hier wurden retrospektiv Teilnehmer analysiert, die eine *normale* ddcf-DNA,

definiert durch $< 1 \%$ aufwiesen und im Folgemonat eine Komplikation entwickelten (Abstoßung, BK-Nephropathie, Kreatinin Anstieg $> 20 \%$ von der *Baseline*, DSA, CMV-Virämie). Die BK-Virämie wurde als häufigste Komplikation mit normaler ddcf-DNA angegeben (24/51 Teilnehmer), allerdings hatten davon die Hälfte der Teilnehmer nur < 1.500 BK-Virus-Kopien. Eine weitere Kontrolle der Viruslast und der ddcf-DNA ist im Verlauf nicht erfolgt. Es wurde also postuliert, dass die BK-Virämie oft ohne Anstieg der ddcf-DNA einhergeht. Diese Ergebnisse bekräftigen jedoch, dass die ddcf-DNA im Rahmen der BK-Virämie eher korrelierend zur Viruslast ansteigt und ein dynamischer, aber unterschwelliger Marker ist. Eine einmalige Bestimmung vor einer Komplikation ohne weiteren Verlauf ist nicht aussagekräftig. Zudem wurde der *cut-off* $> 1 \%$ nur für die humorale Abstoßung vorgeschlagen und ist gegebenenfalls im Rahmen der BK-Nephropathie zu hoch angesetzt.

Wen et al. (Wen et al. 2022) haben, ähnlich wie in der vorliegenden Kohorte, eine mögliche BK-Nephropathie durch ein regelmäßiges Monitoring mit Bestimmung der ddcf-DNA im Urin an geregelten Visiten untersucht. Die Patienten wurden in dieser Studie jedoch systematisch biopsiert ab einem *cut-off* von $> 7 \log_{10}$ BK-Virus Kopien im Urin (Kopien/ml). Danach wurden die Ergebnisse der Biopsie in 3 verschiedene Kategorien hinsichtlich der Probabilität einer BK-Nephropathie aufgeteilt. Diese verschiedenen Subgruppen wurden dann bezüglich des ddcf-DNA-Werts im Blut an dem Tag vor der Biopsie analysiert. Hier ergab sich, dass die ddcf-DNA in der gesicherten (*proven*) Gruppe höher ist als bei der nur möglichen BK-Nephropathie. Dies konnte in der vorliegenden Kohorte nicht bestätigt werden. Hier lag zwar keine Aufteilung in 3 Kategorien der BKN vor, allerdings konnte bei bekannter BK-Virämie grundsätzlich zwischen der gesicherten und der nicht-gesicherten BKN nach erfolgter Biopsie unterschieden werden. Zum Zeitpunkt der Biopsie gab es im Median keinen signifikanten Unterschied zwischen der bioptisch gesicherten BK-Nephropathie und der nicht-vorhandenen BKN, also dem reinen Tubulusschaden ($p = 0,776$). Die BK-Virus-Kopien in der vorliegenden Auswertung zum Zeitpunkt der Biopsie waren nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,09$) zwischen den zwei Gruppen, exakt wie in der Studie von Wen et al. Da in jeder Gruppe allerdings nur $n = 8$ Teilnehmer waren, wäre eine größere Kohorte notwendig, um die Ergebnisse erneut prüfen zu können. Interessanterweise hat auch die Gruppe um Wen et al. die ddcf-DNA als dynamischen Marker gekennzeichnet, der bereits früher ansteigt, bevor sich ein Kreatininanstieg bemerkbar macht. Daher

wurde ebenfalls die Δ ddcf-DNA zwischen der letzten geplanten Kontrolle vor Biopsie und der Baseline-ddcf-DNA bestimmt. Hier ergaben sich höhere Werte in der gesicherten BKN-Gruppe als in der möglichen BKN-Gruppe. Es gibt also schlussendlich nur wenig verfügbare Daten in der Literatur, die sich bisher mit der Fragestellung ddcf-DNA und BK-Nephropathie auseinandergesetzt haben. Die Ergebnisse sind zum Teil noch sehr divergent und auch kontradiktorisch. Auch ist die ddcf-DNA in den allermeisten Studien in %-cf-DNA angegeben, welche mit erhöhten Schwankungen einhergeht.

5 Schlussfolgerung

Es konnte durch diese prospektive Studie der Stellenwert der ddcf-DNA im Rahmen einer BK-Virämie und BKN weiter gefestigt werden. Zudem konnte die ddcf-DNA durch Analyse und Korrelation mit den verschiedenen Patienteneigenschaften und Transplantationsfaktoren besser charakterisiert werden.

Die ddcf-DNA ist zum Zeitpunkt einer Biopsie bei der BKN gegenüber der TCMR signifikant erniedrigt. Werden also vor einer Biopsie hohe ddcf-DNA Werte festgestellt, weist dies eher auf eine zelluläre Abstoßung, als auf eine BKN hin.

Die ddcf-DNA hat zum Zeitpunkt der Biopsie in der vorliegenden Kohorte keinen Unterschied gezeigt bezüglich der Diagnose einer BKN oder eines Tubulusschadens bei replikativer BK-Virämie. In unserer Studie kann also eine Transplantatnierenbiopsie nicht durch Messung der ddcf-DNA ersetzt werden.

Die ddcf-DNA scheint ein dynamischer Marker zu sein, der je nach Teilnehmer und Baseline- ddcf-DNA-Wert individuell gewertet werden muss. Zusätzlich besteht bei der BKN eher ein unterschwelliger Transplantatschaden, der nicht mit einer stark erhöhten ddcf-DNA einhergeht. Der Übergang einer BK-Virämie zu einer BK-Nephropathie ist also nicht mit einer deutlichen oder frühzeitigen Freisetzung der ddcf-DNA festzustellen.

Eine positive Korrelation mit den BK-Virus-Kopien ist jedoch festzuhalten. Nach Erholung der BK-Virämie oder -Nephropathie zeigt sich auch ein Abfall der ddcf-DNA und des Kreatinins, somit könnte die ddcf-DNA zusammen mit dem Kreatinin auch einen Monitor für eine Genesung bei der BK-Virus-Infektion oder der BKN darstellen.

Es besteht ein signifikanter Abfall der ddcf-DNA in den ersten 6 Wochen nach Transplantation. In diesem Zeitrahmen ist die ddcf-DNA nur eingeschränkt als nicht-invasiver Marker für die Diagnose jeglicher Transplantatschäden einzusetzen.

Die vorliegende Studie hatte einige Limitationen. Zu erwähnen gilt führend, dass es keinen festgelegten Zeitpunkt gab, an dem die Teilnehmer mit BK-Virämie biopsiert wurden. Hierdurch können Teilnehmer falsch negativ in der BK-Virämie-Gruppe eingeordnet sein und dennoch eine BKN haben.

Die ddcf-DNA hat also einen Stellenwert in der Diagnostik und dem Monitoring der BK-Virämie und der BK- Nephropathie. Eine Kohorte mit mehr BK-Nephropathie-Patienten wäre notwendig, um die hier herausgefundenen Ergebnisse zu überprüfen.

6 Literaturverzeichnis

- Afify, Z. A. M., M. M. Taj, M. Orjuela-Grimm, K. Srivatsa, T. P. Miller, H. J. Edington, M. Dalal, J. Robles, J. B. Ford, M. J. Ehrhardt, T. J. Ureda, J. D. Rubinstein, S. McCormack, J. M. Rivers, K. M. Chisholm, M. K. Kavanaugh, A. J. Bukowinski, E. D. Friehling, M. C. Ford, S. N. Reddy, L. J. Marks, C. M. Smith, and C. C. Mason. 2023. 'Multicenter study of pediatric Epstein-Barr virus-negative monomorphic post solid organ transplant lymphoproliferative disorders', *Cancer*, 129: 780-89.
- Agrawal, A., M. G. Ison, and L. Danziger-Isakov. 2022. 'Long-Term Infectious Complications of Kidney Transplantation', *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 17: 286-95.
- Ahmad, I. 2004. 'Biopsy of the transplanted kidney', *Semin Intervent Radiol*, 21: 275-81.
- Ambalathingal, G. R., R. S. Francis, M. J. Smyth, C. Smith, and R. Khanna. 2017. 'BK Polyomavirus: Clinical Aspects, Immune Regulation, and Emerging Therapies', *Clinical Microbiology Reviews*, 30: 503-28.
- Anand, S., F. Lopez-Verdugo, J. Sanchez-Garcia, L. Dong, M. Fife, J. Krong, D. Morris, and T. R. Srinivas. 2021. 'Longitudinal variance of Donor-Derived Cell-Free DNA (dd-cfDNA) in Stable Kidney Transplant (KTx) patients are influenced by donor/recipient variables', *Clinical Transplantation*, 35: e14395.
- Antunes, A. M., C. Teixeira, M. L. Corvo, R. Perdigoto, E. Barroso, and P. Marcelino. 2014. 'Prophylactic use of liposomal amphotericin B in preventing fungal infections early after liver transplantation: a retrospective, single-center study', *Transplantation Proceedings*, 46: 3554-9.
- Augustine, J. 2018. 'Kidney transplant: New opportunities and challenges', *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 85: 138-44.
- Beck, J., S. Bierau, S. Balzer, R. Andag, P. Kanzow, J. Schmitz, J. Gaedcke, O. Moerer, J. E. Slotta, P. Walson, O. Kollmar, M. Oellerich, and E. Schütz. 2013. 'Digital droplet PCR for rapid quantification of donor DNA in the circulation of

- transplant recipients as a potential universal biomarker of graft injury', *Clinical Chemistry*, 59: 1732-41.
- Behzad, D., A. Hakimeh, R. Hossein, and A. Khaledi. 2020. 'A middle east systematic review and meta-analysis of bacterial urinary tract infection among renal transplant recipients; Causative microorganisms', *Microbial Pathogenesis*, 148: 104458.
- Benjamens, S., C. Moers, Rhja Slart, and R. A. Pol. 2020. 'Kidney Transplantation and Diagnostic Imaging: The Early Days and Future Advancements of Transplant Surgery', *Diagnostics (Basel)*, 11.
- Birdwell, K. A., and M. Park. 2021. 'Post-Transplant Cardiovascular Disease', *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 16: 1878-89.
- Bloom, R. D., J. S. Bromberg, E. D. Poggio, S. Bunnapradist, A. J. Langone, P. Sood, A. J. Matas, S. Mehta, R. B. Mannon, A. Sharfuddin, B. Fischbach, M. Narayanan, S. C. Jordan, D. Cohen, M. R. Weir, D. Hiller, P. Prasad, R. N. Woodward, M. Grskovic, J. J. Sninsky, J. P. Yee, and D. C. Brennan. 2017. 'Cell-Free DNA and Active Rejection in Kidney Allografts', *Journal of the American Society of Nephrology*, 28: 2221-32.
- Bunnapradist, S., N. Datta, J. Schaenman, N. Ioannou, M. S. Bloom, M. Malhotra, H. Tabriziani, P. Gauthier, E. Ahmed, P. R. Billings, and E. L. Lum. 2021. 'Extremely High Cell-free DNA Levels Observed in Renal Allograft Patient With SARS-CoV-2 Infection', *Transplant Direct*, 7: e691.
- Burgos, D., C. Jironda, M. Martín, M. González-Molina, and D. Hernández. 2010. '[BK-virus-associated Nephropathy]', *Nefrologia*, 30: 613-7.
- Buxeda, A., D. Redondo-Pachón, M. J. Pérez-Sáez, M. Crespo, and J. Pascual. 2021. 'Sex differences in cancer risk and outcomes after kidney transplantation', *Transplantation Reviews (Orlando, Fla.)*, 35: 100625.
- Calne, R. 2005. 'Clinical transplantation: current problems, possible solutions', *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 360: 1797-801.
- Chan, A. K., R. W. Chiu, and Y. M. Lo. 2003. 'Cell-free nucleic acids in plasma, serum and urine: a new tool in molecular diagnosis', *Annals of Clinical Biochemistry*, 40: 122-30.
- Chapman, T. M., and G. M. Keating. 2003. 'Basiliximab: a review of its use as induction therapy in renal transplantation', *Drugs*, 63: 2803-35.

- Chen, X. T., W. F. Chen, J. Li, R. H. Deng, Y. Huang, S. C. Yang, P. S. Chen, T. Y. Jiang, H. T. Liu, C. X. Wang, L. Z. Chen, J. Qiu, and G. Huang. 2020. 'Urine Donor-Derived Cell-Free DNA Helps Discriminate BK Polyomavirus-Associated Nephropathy in Kidney Transplant Recipients With BK Polyomavirus Infection', *Frontiers in Immunology*, 11: 1763.
- Chen, X. T., J. Qiu, Z. X. Wu, H. Zhang, T. Chen, S. C. Yang, G. D. Zhao, Y. He, X. Shen, J. Q. Luo, Y. Huang, C. X. Wang, L. Z. Chen, C. L. Wu, and G. Huang. 2022. 'Using Both Plasma and Urine Donor-Derived Cell-Free DNA to Identify Various Renal Allograft Injuries', *Clinical Chemistry*, 68: 814-25.
- Chong, S., M. Antoni, A. Macdonald, M. Reeves, M. Harber, and C. N. Magee. 2019. 'BK virus: Current understanding of pathogenicity and clinical disease in transplantation', *Reviews in Medical Virology*, 29: e2044.
- Chopra, B., and K. K. Sureshkumar. 2021. 'Emerging role of cell-free DNA in kidney transplantation', *World J Exp Med*, 11: 55-65.
- Cohen, E., M. Korah, G. Callender, R. Belfort de Aguiar, and D. Haakinson. 2020. 'Metabolic Disorders with Kidney Transplant', *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 15: 732-42.
- Comoli, P., S. Binggeli, F. Ginevri, and H. H. Hirsch. 2006. 'Polyomavirus-associated nephropathy: update on BK virus-specific immunity', *Transplant Infectious Disease*, 8: 86-94.
- Cozzi, M., P. Donato, G. Ugolini, R. E. Nguefouet Momo, F. Nacchia, Z. Ballarini, P. Piccoli, M. Cantini, C. Caletti, S. Andreola, G. Gandini, G. Gambaro, and L. Boschiero. 2022. 'Outcomes in ABO Incompatible Living Donor Kidney Transplantation: A Case - Control Study', *Front Med (Lausanne)*, 9: 932171.
- de Miranda, F. S., V. G. Barauna, L. Dos Santos, G. Costa, P. F. Vassallo, and L. C. G. Campos. 2021. 'Properties and Application of Cell-Free DNA as a Clinical Biomarker', *International Journal of Molecular Sciences*, 22.
- Diaz, L. A., Jr., and A. Bardelli. 2014. 'Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA', *Journal of Clinical Oncology*, 32: 579-86.
- Edwards, R. L., J. Menteer, R. M. Lestz, and L. A. Baxter-Lowe. 2022. 'Cell-free DNA as a solid-organ transplant biomarker: technologies and approaches', *Biomarkers in Medicine*, 16: 401-15.
- Fatthy, M., A. Saleh, R. A. Ahmed, S. Abouzeid, S. Bakry, and T. Abdelaziz. 2022. 'Incidence and Determinants of Complications of Percutaneous Kidney Biopsy

- in a Large Cohort of Native Kidney and Kidney Transplant Recipients', *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 22: 268-73.
- Feldkamp, T, and A Linkermann. 2013. 'Immunsuppressive Therapie nach Nierentransplantation', *Nephrologe*, 8: 217-25.
- Funahashi, Y. 2021. 'BK Virus-Associated Nephropathy after Renal Transplantation', *Pathogens*, 10.
- Furmaga, J., M. Kowalczyk, T. Zapolski, O. Furmaga, L. Krakowski, G. Rudzki, A. Jaroszyński, and A. Jakubczak. 2021. 'BK Polyomavirus-Biology, Genomic Variation and Diagnosis', *Viruses*, 13.
- Ganong, Barrett, Barman, Boitano, and Brook. 2012. *Physiologie médicale*.
- Gately, R., E. Milanzi, W. Lim, A. Teixeira-Pinto, P. Clayton, N. Isbel, D. W. Johnson, C. Hawley, S. Campbell, and G. Wong. 2023. 'Incidence, Risk Factors, and Outcomes of Kidney Transplant Recipients With BK Polyomavirus-Associated Nephropathy', *Kidney Int Rep*, 8: 531-43.
- Gawroński, A. R., Y. Y. Lin, B. McConeghy, S. LeBihan, H. Asghari, C. Koçkan, B. Orabi, N. Adra, R. Pili, C. C. Collins, S. C. Sahinalp, and F. Hach. 2019. 'Structural variation and fusion detection using targeted sequencing data from circulating cell free DNA', *Nucleic Acids Research*, 47: e38.
- Geissler, E. K. 2015. 'Skin cancer in solid organ transplant recipients: are mTOR inhibitors a game changer?', *Transplant Res*, 4: 1.
- Gielis, E. M., K. J. Ledeganck, B. Y. De Winter, J. Del Favero, J. L. Bosmans, F. H. Claas, D. Abramowicz, and M. Eikmans. 2015. 'Cell-Free DNA: An Upcoming Biomarker in Transplantation', *American Journal of Transplantation*, 15: 2541-51.
- Goussous, N., W. Xie, N. Dawany, J. R. Scalea, A. Bartosic, A. Haririan, R. Kalil, C. Drachenberg, N. Costa, M. R. Weir, and J. S. Bromberg. 2020. 'Donor-derived Cell-free DNA in Infections in Kidney Transplant Recipients: Case Series', *Transplant Direct*, 6: e568.
- Grskovic, M., D. J. Hiller, L. A. Eubank, J. J. Sninsky, C. Christopherson, J. P. Collins, K. Thompson, M. Song, Y. S. Wang, D. Ross, M. J. Nelles, J. P. Yee, J. C. Wilber, M. G. Crespo-Leiro, S. L. Scott, and R. N. Woodward. 2016. 'Validation of a Clinical-Grade Assay to Measure Donor-Derived Cell-Free DNA in Solid Organ Transplant Recipients', *Journal of Molecular Diagnostics*, 18: 890-902.

- Halloran, P. F., J. Reeve, K. S. Madill-Thomsen, Z. Demko, A. Prewett, P. Gauthier, P. Billings, C. Lawrence, D. Lowe, and L. G. Hidalgo. 2023. 'Antibody-mediated Rejection Without Detectable Donor-specific Antibody Releases Donor-derived Cell-free DNA: Results From the Trifecta Study', *Transplantation*, 107: 709-19.
- Hamid, R. B., S. Javaid, M. T. Khan, N. Lal, S. Luxmi, and S. Sarfaraz. 2020. 'Multiple Drug Resistant Urinary Tract Infection in Kidney Transplant Recipients: A Retrospective Cohort Study', *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*, 31: 905-16.
- Hariharan, S. 2006. 'BK virus nephritis after renal transplantation', *Kidney International*, 69: 655-62.
- Harrison, J. J., B. Hamandi, Y. Li, O. Famure, and S. J. Kim. 2014. 'Timing of rabbit antithymocyte globulin induction therapy in kidney transplantation: an observational cohort study', *Transplant Res*, 3: 1.
- Held, P. J., F. McCormick, A. Ojo, and J. P. Roberts. 2016. 'A Cost-Benefit Analysis of Government Compensation of Kidney Donors', *American Journal of Transplantation*, 16: 877-85.
- Hirsch, H. H. 2002. 'Polyomavirus BK nephropathy: a (re-)emerging complication in renal transplantation', *American Journal of Transplantation*, 2: 25-30.
- Hirsch, H. H., and P. S. Randhawa. 2019. 'BK polyomavirus in solid organ transplantation-Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice', *Clinical Transplantation*, 33: e13528.
- Hogan, J. J., M. Mocanu, and J. S. Berns. 2016. 'The Native Kidney Biopsy: Update and Evidence for Best Practice', *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 11: 354-62.
- Huang, E., S. Sethi, A. Peng, R. Najjar, J. Mirocha, M. Haas, A. Vo, and S. C. Jordan. 2019. 'Early clinical experience using donor-derived cell-free DNA to detect rejection in kidney transplant recipients', *American Journal of Transplantation*, 19: 1663-70.
- Imlay, H., P. Baum, D. C. Brennan, K. E. Hanson, M. R. Hodges, A. C. Hodowanec, T. E. Komatsu, P. Ljungman, V. Miller, Y. Natori, V. Nickeleit, J. O'Rear, A. P. Pikis, P. S. Randhawa, D. Sawinski, H. K. Singh, G. Westman, and A. P. Limaye. 2022. 'Consensus Definitions of BK Polyomavirus Nephropathy in Renal

- Transplant Recipients for Clinical Trials', *Clinical Infectious Diseases*, 75: 1210-16.
- Jahdali, S., N. Al Oudah, K. O. Alsaad, H. Kfoury, S. Qurashi, and A. Al Sayyari. 2017. 'Biopsy-Proven BK Virus-Associated Nephropathy: Clinico-Pathologic Correlations', *Experimental and Clinical Transplantation*, 15: 289-94.
- Kable, K., C. D. Davies, J. O'Connell P, J. R. Chapman, and B. J. Nankivell. 2017. 'Clearance of BK Virus Nephropathy by Combination Antiviral Therapy With Intravenous Immunoglobulin', *Transplant Direct*, 3: e142.
- Kaltenborn, A., and H. Schrem. 2013. 'Mycophenolate mofetil in liver transplantation: a review', *Annals of Transplantation*, 18: 685-96.
- Kant, S., J. Bromberg, M. Haas, and D. Brennan. 2020. 'Donor-derived Cell-free DNA and the Prediction of BK Virus-associated Nephropathy', *Transplant Direct*, 6: e622.
- Kant, S., A. Dasgupta, S. Bagnasco, and D. C. Brennan. 2022. 'BK Virus Nephropathy in Kidney Transplantation: A State-of-the-Art Review', *Viruses*, 14.
- KDIGOCW, G. 2012. 'Clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease': 1-163.
- Keddis, M. T., G. Bhutani, and Z. M. El-Zoghby. 2014. 'Cardiovascular disease burden and risk factors before and after kidney transplant', *Cardiovascular & Hematological Disorders Drug Targets*, 14: 185-94.
- Keller, and Geberth. 2010. *Praxis der Nephrologie* (Springer Verlag Berlin Heidelberg 2007, 2010).
- Keller, M., and S. Agbor-Enoh. 2021. 'Donor-Derived Cell-Free DNA for Acute Rejection Monitoring in Heart and Lung Transplantation', *Curr Transplant Rep*: 1-8.
- Kesiraju, S., P. Paritala, U. M. Rao Ch, S. M. Athmakuri, V. S. Reddy, and S. Sahariah. 2014. 'Anti-thymocyte globulin versus basiliximab induction in renal transplant recipients: Long-term outcome', *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*, 25: 9-15.
- Khaled, A. S. 2004. 'Polyomavirus (BK virus) nephropathy in kidney transplant patients: a pathologic perspective', *Yonsei Medical Journal*, 45: 1065-75.
- Kostro, J. Z., A. Hellmann, J. Kobiela, I. Skóra, M. Lichodziejewska-Niemierko, A. Dębska-Ślizień, and Z. Śledziński. 2016. 'Quality of Life After Kidney Transplantation: A Prospective Study', *Transplantation Proceedings*, 48: 50-4.

- Koyro, T. F., E. Kraus, S. Lunemann, A. Hölzemer, S. Wulf, J. Jung, P. Fittje, F. Henseling, C. Körner, T. B. Huber, A. Grundhoff, T. Wiech, U. Panzer, N. Fischer, and M. Altfeld. 2021. 'Upregulation of HLA-F expression by BK polyomavirus infection induces immune recognition by KIR3DS1-positive natural killer cells', *Kidney International*, 99: 1140-48.
- Krejci, K., T. Tichy, J. Bednarikova, K. Zamboch, and J. Zadrazil. 2018. 'BK virus-induced renal allograft nephropathy', *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 162: 165-77.
- Kueht, M. L., L. P. Dongur, M. Cusick, H. L. Stevenson, and M. Mujtaba. 2022. 'The Current State of Donor-Derived Cell-Free DNA Use in Allograft Monitoring in Kidney Transplantation', *J Pers Med*, 12.
- Kuhlmann, U., D. Walb, J. Böhler, and F.C. Luft. 2008. *Nephrologie* (Georg Thieme Verlag KG
- Kurašová, E., J. Štěpán, K. Krejčí, F. Mrázek, P. Sauer, J. Janečková, and T. Tichý. 2022. 'Current Status, Prevention and Treatment of BK Virus Nephropathy', *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 65: 119-24.
- Lo, Y. M., M. S. Tein, C. C. Pang, C. K. Yeung, K. L. Tong, and N. M. Hjelm. 1998. 'Presence of donor-specific DNA in plasma of kidney and liver-transplant recipients', *Lancet*, 351: 1329-30.
- Mandel, P., and P. Metais. 1948. '[Nuclear Acids In Human Blood Plasma]', *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de Ses Filiales*, 142: 241-3.
- Mayer, K. A., H. Omic, L. Weseslindtner, K. Doberer, R. Reindl-Schwaighofer, T. Viard, A. Tillgren, S. Haindl, S. Casas, F. Eskandary, A. Heinzl, N. Kozakowski, Ž Kikić, G. A. Böhmig, and M. Eder. 2022. 'Levels of donor-derived cell-free DNA and chemokines in BK polyomavirus-associated nephropathy', *Clinical Transplantation*, 36: e14785.
- Medeiros, E., and B. Merhi. 2021. 'Malignancy After Renal Transplantation: A Review', *R I Med J (2013)*, 104: 25-30.
- Metter, C., and J. R. Torrealba. 2020. 'Pathology of the kidney allograft', *Seminars in Diagnostic Pathology*, 37: 148-53.
- Morgan, T. A., S. Chandran, I. M. Burger, C. A. Zhang, and R. B. Goldstein. 2016. 'Complications of Ultrasound-Guided Renal Transplant Biopsies', *American Journal of Transplantation*, 16: 1298-305.

- Myint, T. M., C. H. Y. Chong, M. Wyld, B. Nankivell, K. Kable, and G. Wong. 2022. 'Polyoma BK Virus in Kidney Transplant Recipients: Screening, Monitoring, and Management', *Transplantation*, 106: e76-e89.
- Nel, J. D., and S. Epstein. 2016. 'Metabolic Bone Disease in the Post-transplant Population: Preventative and Therapeutic Measures', *Medical Clinics of North America*, 100: 569-86.
- Nickeleit, V., H. K. Singh, P. Randhawa, C. B. Drachenberg, R. Bhatnagar, E. Bracamonte, A. Chang, W. J. Chon, D. Dadhania, V. G. Davis, H. Hopfer, M. J. Mihatsch, J. C. Papadimitriou, S. Schaub, M. B. Stokes, M. F. Tungekar, and S. V. Seshan. 2018. 'The Banff Working Group Classification of Definitive Polyomavirus Nephropathy: Morphologic Definitions and Clinical Correlations', *Journal of the American Society of Nephrology*, 29: 680-93.
- Nie, W., X. Su, L. Liu, J. Li, Q. Fu, X. Li, C. Wu, J. Wang, R. Deng, E. Chen, S. Yang, S. Li, H. Zhang, and C. Wang. 2021. 'Dynamics of Donor-Derived Cell-Free DNA at the Early Phase After Pediatric Kidney Transplantation: A Prospective Cohort Study', *Front Med (Lausanne)*, 8: 814517.
- Obrișcă, B., M. Butiu, L. Sibulesky, R. Bakthavatsalam, K. D. Smith, I. Gimferrer, P. Warner, G. Ismail, and N. Leca. 2022. 'Combining donor-derived cell-free DNA and donor specific antibody testing as non-invasive biomarkers for rejection in kidney transplantation', *Scientific Reports*, 12: 15061.
- Oellerich, M., K. Sherwood, P. Keown, E. Schütz, J. Beck, J. Stegbauer, L. C. Rump, and P. D. Walson. 2021. 'Liquid biopsies: donor-derived cell-free DNA for the detection of kidney allograft injury', *Nat Rev Nephrol*, 17: 591-603.
- Oellerich, M., M. Shipkova, T. Asendorf, P. D. Walson, V. Schauerte, N. Mettenmeyer, M. Kabakchiev, G. Hasche, H. J. Gröne, T. Friede, E. Wieland, V. Schwenger, E. Schütz, and J. Beck. 2019. 'Absolute quantification of donor-derived cell-free DNA as a marker of rejection and graft injury in kidney transplantation: Results from a prospective observational study', *American Journal of Transplantation*, 19: 3087-99.
- Orlando, G., P. Di Cocco, M. D'Angelo, K. Clemente, T. M. Manzia, R. Angelico, G. Tisone, J. Romagnoli, F. Citterio, A. Famulari, and F. Pisani. 2010. 'Surgical antibiotic prophylaxis after renal transplantation: time to reconsider', *Transplantation Proceedings*, 42: 1118-9.

- Osmanodja, B., A. Akifova, K. Budde, M. Choi, M. Oellerich, E. Schütz, and J. Beck. 2021. 'Absolute or Relative Quantification of Donor-derived Cell-free DNA in Kidney Transplant Recipients: Case Series', *Transplant Direct*, 7: e778.
- Park, S. Y., J. H. Jung, H. Kwon, S. Shin, Y. H. Kim, Y. P. Chong, S. O. Lee, S. H. Choi, Y. S. Kim, J. H. Woo, S. H. Kim, and D. J. Han. 2020. 'Epidemiology and risk factors associated with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in kidney transplant recipients after 6-month trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis: A case-control study', *Transplant Infectious Disease*, 22: e13245.
- Piselli, P., D. Serraino, G. P. Segoloni, S. Sandrini, G. B. Piredda, M. P. Scolari, P. Rigotti, G. Busnach, P. Messa, D. Donati, F. P. Schena, M. C. Maresca, G. Tisone, M. Veroux, V. Sparacino, F. Pisani, and F. Citterio. 2013. 'Risk of de novo cancers after transplantation: results from a cohort of 7217 kidney transplant recipients, Italy 1997-2009', *European Journal of Cancer*, 49: 336-44.
- Primc, D., S. Rački, M. Arnol, M. Marinović, A. Fućak-Primc, A. Muzur, S. Hawlina, and D. Markić. 2020. 'THE BEGINNINGS OF KIDNEY TRANSPLANTATION IN SOUTH-EAST EUROPE', *Acta Clinica Croatica*, 59: 135-40.
- Randhawa, P., and D. C. Brennan. 2006. 'BK virus infection in transplant recipients: an overview and update', *American Journal of Transplantation*, 6: 2000-5.
- Redondo-Pachón, D., E. Calatayud, A. Buxeda, M. J. Pérez-Sáez, C. Arias-Cabrales, J. Gimeno, C. Burballa, M. Mir, L. Llinàs-Mallol, S. Outon, J. Pascual, and M. Crespo. 2023. 'Evolution of kidney allograft loss causes over 40 years (1979-2019)', *Nefrologia (Engl Ed)*, 43: 316-27.
- Rostkowska, O. M., R. Kuthan, A. Burban, J. Salińska, M. Ciebiera, G. Młynarczyk, and M. Durlík. 2020. 'Analysis of Susceptibility to Selected Antibiotics in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Causing Urinary Tract Infections in Kidney Transplant Recipients over 8 Years: Single-Center Study', *Antibiotics (Basel)*, 9.
- Rusnak, F., and P. Mertz. 2000. 'Calcineurin: form and function', *Physiological Reviews*, 80: 1483-521.
- Saleh, A., M. S. El Din Khedr, A. Ezzat, A. Takou, and A. Halawa. 2020. 'Update on the Management of BK Virus Infection', *Experimental and Clinical Transplantation*, 18: 659-70.

- Sarzynska-Nowacka, U., P. Kosinski, and M. Wielgos. 2019. 'Is there a future for cell-free fetal dna tests in screening for preeclampsia?', *Ginekologia Polska*, 90: 55-60.
- Schaub, S., H. H. Hirsch, M. Dickenmann, J. Steiger, M. J. Mihatsch, H. Hopfer, and M. Mayr. 2010. 'Reducing immunosuppression preserves allograft function in presumptive and definitive polyomavirus-associated nephropathy', *American Journal of Transplantation*, 10: 2615-23.
- Schneider, M. P., K. F. Hilgers, M. Schmid, S. Hübner, J. Nadal, D. Seitz, M. Busch, H. Haller, A. Köttgen, F. Kronenberg, S. Baid-Agrawal, G. Schlieper, U. Schultheiss, T. Sitter, C. Sommerer, S. Titze, H. Meiselbach, C. Wanner, and K. U. Eckardt. 2018. 'Blood pressure control in chronic kidney disease: A cross-sectional analysis from the German Chronic Kidney Disease (GCKD) study', *PLoS One*, 13: e0202604.
- Sharma, R., S. Tzetzio, S. Patel, M. Zachariah, S. Sharma, and T. Melendy. 2016. 'BK Virus in Kidney Transplant: Current Concepts, Recent Advances, and Future Directions', *Experimental and Clinical Transplantation*, 14: 377-84.
- Sharon, E., H. Shi, S. Kharbanda, W. Koh, L. R. Martin, K. K. Khush, H. Valentine, J. K. Pritchard, and I. De Vlaminck. 2017. 'Quantification of transplant-derived circulating cell-free DNA in absence of a donor genotype', *PLoS Computational Biology*, 13: e1005629.
- Shen, C. L., B. S. Wu, T. J. Lien, A. H. Yang, and C. Y. Yang. 2021. 'BK Polyomavirus Nephropathy in Kidney Transplantation: Balancing Rejection and Infection', *Viruses*, 13.
- Shi, Y., A. H. Lerner, R. Rogers, K. Vieira, B. Merhi, K. Mecadon, A. J. Osband, G. Bayliss, R. Gohh, P. Morrissey, and D. Farmakiotis. 2021. 'Low-Dose Valganciclovir Prophylaxis Is Safe and Cost-Saving in CMV-Seropositive Kidney Transplant Recipients', *Progress in Transplantation*, 31: 368-76.
- Siddiqui, S., J. Cox, R. Herzig, S. Palaniyandi, G. C. Hildebrandt, and R. Munker. 2019. 'Anti-thymocyte globulin in haematology: Recent developments', *Indian Journal of Medical Research*, 150: 221-27.
- Solis, M., F. Gallais, A. Velay, and S. Fafi-Kremer. 2019. '[BK-virus and pathophysiology of associated diseases]', *Virologie (Montrouge)*, 23: 7-22.
- statistics.eurotransplant.org. 2023a. 'Active kidney waiting list (at year-end) in 2022, by country, by organ combination', Accessed 23.01.2023.

- . 2023b. 'Kidney transplants in 2022, by country, by donor type, by organ combination'.
- . 2023c. 'Reported by year of death. Includes patients with active or nonactive urgency at removal. Includes removals while waiting for living or deceased donor transplants.'.
- Sureshkumar, K. K., H. R. Aramada, and B. Chopra. 2020. 'Impact of body mass index and recipient age on baseline donor-derived cell free DNA (dd-cfDNA) in kidney transplant recipients', *Clinical Transplantation*, 34: e14101.
- Szilágyi, M., O. Pös, É Márton, G. Buglyó, B. Soltész, J. Keserű, A. Penyige, T. Szemes, and B. Nagy. 2020. 'Circulating Cell-Free Nucleic Acids: Main Characteristics and Clinical Application', *International Journal of Molecular Sciences*, 21.
- Thierry, A. R., S. El Messaoudi, P. B. Gahan, P. Anker, and M. Stroun. 2016. 'Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology', *Cancer and Metastasis Reviews*, 35: 347-76.
- Ume, A. C., T. Y. Wenegieme, and C. R. Williams. 2021. 'Calcineurin inhibitors: a double-edged sword', *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 320: F336-f41.
- Wan, J. C. M., C. Massie, J. Garcia-Corbacho, F. Mouliere, J. D. Brenton, C. Caldas, S. Pacey, R. Baird, and N. Rosenfeld. 2017. 'Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA', *Nature Reviews: Cancer*, 17: 223-38.
- Wen, J., R. Sun, H. Yang, Q. Ran, and Y. Hou. 2022. 'Detection of BK polyomavirus-associated nephropathy using plasma graft-derived cell-free DNA: Development of a novel algorithm from programmed monitoring', *Frontiers in Immunology*, 13: 1006970.
- Wijtvliet, Vpwm, P. Plaeke, S. Abrams, N. Hens, E. M. Gielis, R. Hellemans, A. Massart, D. A. Hesselink, B. Y. De Winter, D. Abramowicz, and K. J. Ledeganck. 2020. 'Donor-derived cell-free DNA as a biomarker for rejection after kidney transplantation: a systematic review and meta-analysis', *Transplant International*, 33: 1626-42.
- Wolfe, R. A., V. B. Ashby, E. L. Milford, A. O. Ojo, R. E. Ettenger, L. Y. Agodoa, P. J. Held, and F. K. Port. 1999. 'Comparison of mortality in all patients on dialysis,

patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant', *New England Journal of Medicine*, 341: 1725-30.

Xie, W. Y., K. Kim, N. Goussous, C. B. Drachenberg, J. R. Scalea, M. R. Weir, and J. S. Bromberg. 2021. 'Causes of Renal Allograft Injury in Recipients With Normal Donor-derived Cell-free DNA', *Transplant Direct*, 7: e679.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Stadien der chronischen Nierenkrankheit. Modifiziert nach KDIGO CW 2012.	1
Abb. 2: Wirkungsmechanismen der verschiedenen Immunsuppressiva. Modifiziert nach Feldkamp et al. (2013).	10
Abb. 3: Interstitielle Nephritis und Tubulitis bei der Polyomavirusnephropathie. Mit freundlicher Genehmigung von Prof. T. Wiech Sektion Nephropathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.	14
Abb. 4: Immunhistochemie: Nachweis des SV40-Antigens bei der Polyomavirusnephropathie. Mit freundlicher Genehmigung von Prof. T. Wiech Sektion Nephropathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.	15
Abb. 5: Freisetzung der ddcf-DNA im Rahmen eines Transplantatschadens. Modifiziert nach Oellerich et al. (2021).	20
Abb. 6: Darstellung der geplanten Visiten mit Blutabnahme und die Grenze der Datenerfassung im Rahmen der Studie.	27
Abb. 7: Cell-Free DNA BCT®.	28
Abb. 8: Flussdiagramm mit Darstellung der Gruppenaufteilung. Die Teilnehmeranzahl ist in Prozent und absoluter Anzahl dargestellt.....	29
Abb. 9: Level der ddcf-DNA nach Nierentransplantation an den vorgesehenen Visiten. Angaben in cp/ml. Die ddcf-DNA (cp/ml) zeigt sich an der Visite 2 im Vergleich zu den folgenden Visiten (Visite 3-6) signifikant höher. ddcf-DNA = donor-derived cell-free DNA, V2 = Visite 2 (10 Tage nach NTX), V3 = Visite 3 (6 Wochen nach NTX), V4 = Visite 4 (3 Monate nach NTX), V5 = Visite 5 (6 Monate nach NTX), V6 = Visite 6 (12 Monate nach NTX).....	36

- Abb. 10: Korrelation der ddcf-DNA zum Alter an der Visite 2 nach NTX.** Angaben der ddcf-DNA in % cf-DNA und das Alter in Jahren. Es zeigt sich eine negative Korrelation zwischen dem Alter des Teilnehmers und der ddcf-DNA an Tag 10 nach NTX. ($p = 0,01$) ddcf-DNA = donor-derived cell-free DNA, NTX = Nierentransplantation, cf-DNA = cell-free DNA 37
- Abb. 11: Korrelation der ddcf-DNA zum Alter an der Visite 3 nach NTX.** Angaben der ddcf-DNA in % cf-DNA und das Alter in Jahren. Es zeigt sich eine negative Korrelation zwischen dem Alter des Teilnehmers und der ddcf-DNA an Tag 10 nach NTX. ($p = < 0,001$) ddcf-DNA = donor-derived cell-free DNA, NTX = Nierentransplantation, cf-DNA = cell-free DNA 38
- Abb. 12: Korrelation der ddcf-DNA zum Alter an der Visite 4 nach NTX.** Angaben der ddcf-DNA in % cf-DNA und das Alter in Jahren. Es zeigt sich eine negative Korrelation zwischen dem Alter des Teilnehmers und der ddcf-DNA an Tag 10 nach NTX. ($p = < 0,001$) ddcf-DNA = donor-derived cell-free DNA, NTX = Nierentransplantation, cf-DNA = cell-free DNA 38
- Abb. 13: Level der ddcf-DNA an der Visite 2 nach NTX je nach nephrologischer Grunderkrankung vor Transplantation.** Angaben in % cf-DNA. Es zeigt sich ein erhöhtes Level der ddcf-DNA bei der ADPKD im Vergleich zur diabetischen Nephropathie oder der renovaskulären Grunderkrankung. ddcf-DNA = donor-derived cell-free DNA, NTX = Nierentransplantation, cf-DNA = cell-free DNA, ADPKD = autosomal dominant polycystic kidney disease 40
- Abb. 14: Level der ddcf-DNA 6 Wochen nach NTX (Visite 3) je nach immunsuppressiver Induktionstherapie mit ATG oder Basiliximab.** Es zeigen sich erhöhte ddcf-DNA-Werte bei den Teilnehmern, die zuvor ATG erhielten ($p = 0,036$). Angaben in cp/ml. ddcf-DNA = donor-derived cell-free DNA, ATG = Anti-Thymozytenglobulin, NTX = Nierentransplantation 42
- Abb. 15: Level der ddcf-DNA zwischen einer Gruppe mit einer post-NTX-Komplikation zum Zeitpunkt der Visite im Vergleich zu einer Gruppe ohne Komplikation.** Als Komplikation zählten: BK-Virämie, Harnwegsinfektion, chirurgische Komplikationen oder eine Abstoßung. Die ddcf-DNA ist an der Visite 4 signifikant höher in der Gruppe mit Komplikation. ($p = 0,0038$). Angaben in cp/ml. ddcf-DNA = donor-derived cell-free DNA, NTX = Nierentransplantation 43
- Abb. 16: Vergleich der BK-Virus-Kopien zum Zeitpunkt der ersten BK-Virämie und zum Zeitpunkt der höchsten gemessenen BK-Virämie beim jeweiligen**

Teilnehmer. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg zwischen den beiden Messungen. (p = 0,001). Angaben in log10 in absoluten Kopien.	44
Abb. 17: Vergleich des Kreatinins zum Zeitpunkt der ersten BK-Virämie und zum Zeitpunkt der höchsten gemessenen BK-Virämie beim jeweiligen Teilnehmer. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg zwischen den beiden Messungen. (p = 0,0227). Angaben in mg/dl.....	45
Abb. 18: Vergleich der ddcf-DNA zum Zeitpunkt der ersten BK-Virämie und zum Zeitpunkt der höchsten gemessenen BK-Virämie beim jeweiligen Teilnehmer. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg zwischen den beiden Messungen. (p = 0,0254). Angaben in cp/ml.....	45
Abb. 19: Vergleich der ddcf-DNA bei dem jeweiligen Teilnehmer zum Zeitpunkt der höchsten BK-Virämie und der abfallenden/geheilten BK-Virämie (BK-Virus Kopien < 500 K/ml). Die ddcf-DNA fällt signifikant ab, wenn die BK-Virus-Kopien rückläufig sind. (p = 0,0355). Angaben in cp/ml. ddcf-DNA = donor-derived cell-free DNA.....	46
Abb. 20: Vergleich des Kreatinins bei dem jeweiligen Teilnehmer zum Zeitpunkt der höchsten BK-Virämie und der abfallenden/geheilten BK-Virämie (BK-Virus Kopien < 500 K/ml). Das Kreatinin fällt signifikant ab, wenn die BK-Virus Kopien rückläufig sind. (p = 0,0391). Angaben in mg/dl.....	47
Abb. 21: Korrelation zwischen der ddcf-DNA und den BK-Virus-Kopien unabhängig ob eine BK-Nephropathie vorliegt oder nicht. Eingeschlossen sind auch außerplanmäßige Visiten. Es zeigt sich eine positive Korrelation zwischen der ddcf-DNA und den BK-Virus-Kopien. (p = 0,035). Angaben in absoluten Kopien log10 und in cp/ml. ddcf-DNA = donor-derived cell-free DNA.	48
Abb. 22: Korrelation zwischen dem Kreatinin und der ddcf-DNA. Eingeschlossen sind auch Werte aus außerplanmäßigen Visiten. Es zeigt sich keine Korrelation (p = 0,658). Angaben in mg/dl und cp/ml.	49
Abb. 23: Vergleich der BK-Virus-Kopien bei dem jeweiligen Teilnehmer (Gruppe BK-Virämie) in der Frühphase zwischen T0 (dem ersten gemessenen Wert) und T1 (dem zweiten gemessenen Wert). Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg (p = 0,007). Angaben in absoluten Kopien log10.....	50
Abb. 24: Vergleich des Kreatinin bei dem jeweiligen Teilnehmer (Gruppe BK-Virämie) in der Frühphase zwischen T0 (dem ersten gemessenen Wert des BK-	

Virus) und T1 (dem zweiten gemessenen Wert des BK-Virus). Es zeigt sich kein signifikanter Anstieg ($p > 0,210$). Angaben in mg/dl.	50
Abb. 25: Vergleich der ddcf-DNA bei dem jeweiligen Teilnehmer (Gruppe BK-Virämie) in der Frühphase zwischen T0 (dem ersten gemessenen Wert des BK-Virus) und T1 (dem zweiten gemessenen Wert des BK-Virus). Es zeigt sich kein signifikanter Anstieg ($p > 0,210$). Angaben in cp/ml.	50
Abb. 26: Vergleich der BK-Virus-Kopien bei dem jeweiligen Teilnehmer (Gruppe BK-Nephropathie) in der Frühphase zwischen T0 (dem ersten gemessenen Wert) und T1 (dem zweiten gemessenen Wert). Es zeigt sich kein signifikanter Anstieg ($p = 0,125$). Angaben in absoluten Kopien \log_{10}	51
Abb. 27: Vergleich des Kreatinins bei dem jeweiligen Teilnehmer (Gruppe BK-Nephropathie) in der Frühphase zwischen T0 (dem ersten gemessenen Wert des BK-Virus) und T1 (dem zweiten gemessenen Wert des BK-Virus). Es zeigt sich kein signifikanter Anstieg ($p = 0,625$). Angaben in mg/dl.	52
Abb. 28: Vergleich der ddcf-DNA bei dem jeweiligen Teilnehmer (Gruppe BK-Nephropathie) in der Frühphase zwischen T0 (dem ersten gemessenen Wert des BK-Virus) und T1 (dem zweiten gemessenen Wert des BK-Virus). Es zeigt sich kein signifikanter Anstieg ($p = 0,250$). Angaben in cp/ml.	52
Abb. 29: Vergleich der ddcf-DNA zum Zeitpunkt der Biopsie je nach Biopsiebefund. Es zeigt sich ein signifikant höheres Level der ddcf-DNA bei der zellulären Abstoßung im Vergleich zu der Polyomavirusnephropathie ($p = 0,0115$) Angaben in cp/ml. ddcf-DNA = donor-derived cell-free DNA.	53
Abb. 30: Vergleich der ddcf-DNA zum Zeitpunkt der Biopsie bei den BKV+ Teilnehmern, je nach Biopsiebefund. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied der ddcf-DNA zwischen dem Tubulusschaden oder der bestätigten BK-Nephropathie ($p = 0,776$). Angaben in cp/ml. ddcf-DNA = donor-derived cell-free DNA, BKV+ = BK-Virus positive Replikation.	54

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Banff Working Group Klassifikation der Polyomavirusnephropathie. 16

Tabelle 2: Darstellung der Patientencharakteristika aufgeteilt in zwei Gruppen

BKV – und BKV +. Darstellung der Ergebnisse in absoluter Anzahl und in Prozentsatz mit Signifikanzdarstellung. Signifikant $p = < 0,05$. BKV = BK-Virus, ADPKD = autosomic dominant polycystic kidney disease, CMV = Cytomegalievirus, NTX = Nierentransplantation, ATG = Anti-Thymozytenglobulin, TCMR = T- cell mediated rejection 32

Tabelle 3: Darstellung der Patienteneigenschaften zwischen den Gruppen BKV –

und BKV + mit Signifikanzdarstellung. Signifikant $p = < 0,05$. KIZ = kalte Ischämiezeit, WIZ = warme Ischämiezeit. 35

Danksagung

Mein Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Johannes Stegbauer für das Überlassen des Themas für die Doktorarbeit. Insbesondere, möchte ich mich aber für die stetige Anleitung und Begleitung durch die Höhen und Tiefen dieser Arbeit, die ungebremste wissenschaftliche Motivation und die Geduld bedanken. Auch Herrn Prof. L.C. Rump gilt mein Dank, für die Möglichkeit der Promotion in der Nephrologie und das gezeigte Interesse an meiner Arbeit.

Ein weiterer Dank gilt Frau Dr. Julia Beck aus Göttingen, für die gute und unkomplizierte Zusammenarbeit.

Danke auch an die Mitarbeiter und die studentischen Hilfskräfte des Studienzentrums für die gute Zusammenarbeit und Hilfe.

Weiterführend möchte ich mich bei meiner Arbeitskollegin und Freundin Dr. Marta Kantauskaite bedanken, die mich in die Welt der Statistik eingeführt hat und mir immer bei Fragen und Problemen zur Seite stand.

Mein Dank gilt auch besonders meinem Freund Christopher, meiner lieben Familie und meinen engen Freunden, die mich in der Zeit immer wieder motiviert und unterstützt haben. Ohne sie wäre ich nicht bis hierhin gekommen. Ich danke euch von Herzen!

Gewidmet wird die Doktorarbeit meinem Opa, der den heutigen Tag leider nicht mehr miterlebt.

Düsseldorf, den 18.03.2024