

Diplomarbeit

TITEL

**Evaluierung des Spender- und Empfänger-
PNPLA3 (rs738409) Polymorphismus
bei Lebertransplantation:
eine explorative, retrospektive Pilotstudie**

eingereicht von

Claudia Vanni Martini

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Klinischen Abteilung für Transplantationschirurgie

unter der Anleitung von Betreuerin

PD. Dr. Daniela Kniepeiss

Graz, 27.04.2016

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 27.04.2016

Claudia V.Martini eh

Danksagung

Zunächst möchte ich mich an dieser Stelle bei denen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Diplomarbeit unterstützt und motiviert haben.

Ganz besonders gilt dieser Dank meiner Erstbetreuerin Frau PD. Dr. Daniela Kniepeiss und meinem Zweitbetreuer Assoz.Prof. Dr. Wilfried Renner, die meine Arbeit und somit auch mich betreut haben. Sie gaben mir immer wieder durch kritisches Hinterfragen wertvolle Hinweise - auch Ihre moralische Unterstützung und kontinuierliche Motivation haben einen großen Teil zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen. Vielen Dank.

Nicht zuletzt gebührt meinen Eltern Dank, insbesondere meiner Mutter, die nie aufgehört hat, an mich zu glauben.

Speziellen Dank gilt meinen Kindern Simon, Stina, Luca, Mika, Matteo und Marco, ohne deren Liebe und Geduld das Alles nicht möglich gewesen wäre. Ich liebe Euch!

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungen	5
2. Abbildungsverzeichnis	7
3. Tabellenverzeichnis	8
4. Zusammenfassung	9
5. Abstract	10
6. Einleitung	11
6.1. PNPLA3-Gen	11
6.2. Klinische Bedeutung des PNPLA3 Polymorphismus	13
6.3. Lebertransplantation	23
6.4. Forschungsfragen	31
7. Material und Methoden	32
7.1. PatientInnen	32
7.2. Immunsuppression	32
7.3. Abstoßung	34
7.4. Nachsorge	38
7.5. Methoden zur Genotypbestimmung	38
7.6. Statistik	45
8. Ergebnisse	45
9. Diskussion	49
10. Literaturverzeichnis	51
11. Anhang	56
11.1. Projektplan	56

1. Abkürzungen

AC	alcoholic cirrhosis
ADPN	Adiponutrin
ALC	alcoholic liver cirrhosis
ALD	alcoholic liver disease
ALI	alcoholic-liver injury
ALT	Alanin-Aminotransferase
ASP	Asparagin
ERCP	endoskopische, retrograde Cholangiopankreatikographie
FPR	Fibroseprogressionsrate
GWA	Genomweite Assoziationsanalyse
GWAS	Genom wide Association Studies
HALT C	Hep.C Antiviral long_term treatment against Cirrhosis
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C-Virus
Hep.C	Hepatitis C
kDA	Kilodalton
LTX	Lebertransplantation
MELD	Model of End Stage Liver Disease
NAFLD	non alcoholic fat liver disease
NASH	non alcoholic Steatohepatitis
p-anca	anti neutrophile cytoplasmatische Antikörper
PNPLA3	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3

PSC	primär sklersosierende Cholangitis
SER	Serin
SNP	single nucleotide polymorphism
SREBP-1c	sterol regulatory element binding protein

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chromosom22	11
Abbildung 2: Hypothetischer Mechanismus der hepatischen Fettakkumulation bei PNPLA3 Polymorphismus	12
Abbildung 3: Studiendesign, Metaanalyse	14
Abbildung 4: Zusammenhang zwischen NASH und rs738409 ethnischer Gruppen	15
Abbildung 5: Einfluss des Alters und der Infektion auf die FPR	17
Abbildung 6: Kaplan Meier Schätzung bei HCC	19
Abbildung 7: Ishak stage categorical description	21
Abbildung 8: Situs nach Entfernen der zirrhotischen Leber	28
Abbildung 9: Implantierte Leber	28
Abbildung 10: ERCP nach LTX	29
Abbildung 11: Intra Assay	42
Abbildung 12: Keine Intra oder Inter Assay Varianten	43
Abbildung 13: Darstellung der Verteilung der Indikationen zur Lebertransplantation	46
Abbildung 14: Ergebnisse Empfänger/Innen	48
Abbildung 15: Ergebnisse Spender/Innen	48

3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Child pugh score	26
Tabelle 2: MELD score	27
Tabelle 3: BANFF Schema globale Einschätzung des Schweregrades der Abstoßungsreaktion	35
Tabelle 4: Abstoßungsaktivitätsindex	36, 37

4. Zusammenfassung

Einleitung: Der rs738409 G>C Einzel-Nukleotid-Polymorphismus im Patatin-Phospholipase 3-Gen wurde als neuer genetische Marker für ein höheres Risiko von ungünstigen Veränderungen in der Leber identifiziert. Die meisten bisherigen Studien evaluierten den Zusammenhang des Polymorphismus mit verschiedenen Grunderkrankungen der Leber. Derzeit gibt es kaum Erfahrungen damit im Bereich der Lebertransplantation.

Methode: In die retrospektive Pilotstudie wurden PatientInnen inkludiert, welche an unserem Zentrum lebertransplantiert wurden. Sowohl bei den EmpfängerInnen als auch – wenn möglich- bei den dazugehörigen SpenderInnen wurden PNPLA3-Genotypisierungen durchgeführt. Die Genotypisierungen erfolgten mittels der 5'-Exonuclease Methode ("TaqMan") aus Blutproben. Die statistische Auswertung wurde mit dem chi²-Test durchgeführt.

Ergebnisse: Insgesamt wurden bei 147 PatientInnen nach Lebertransplantation und bei 56 DonatorInnen die Genotypbestimmungen durchgeführt. Die Verteilung der Genotypen war bei den EmpfängerInnen wie folgt: II: 36,7%, IM: 43,2%, MM: 20,1%. Die Verteilung bei den DonatorInnen war II: 64,3%, IM: 25,0% und MM: 10,7%. Der Unterschied der PNPLA3-Genotyp-Frequenzen zwischen EmpfängerInnen und SpenderInnen war hoch signifikant (chi²-Test; p=0,002).

Zusammenfassung: Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der PNPLA3 Genotypfrequenzen zwischen SpenderInnen und EmpfängerInnen. Das heißt, PatientInnen, die eine Lebertransplantation benötigen, haben einen ungünstigeren Genotyp als die lebergesunde Vergleichspopulation. In einem weiteren Schritt werden die Genotypen der EmpfängerInnen und SpenderInnen miteinander gematcht und hinsichtlich des Langzeitüberlebens und des Auftretens von Fibrose und Steatose evaluiert werden.

5. Abstract

Introduction: The rs738409 G>C single nucleotide polymorphism within the patatin-phospholipase 3 gene was identified as a new genetic marker for higher risk for steatohepatitis. Most of the recent studies evaluated the association of the polymorphism with several liver dysfunctions. There are only a few data concerning liver transplantation.

Methods: We included patients after liver transplantation to our retrospective study and performed genotyping. Furthermore we evaluated genotypes of donors as a control group and to match with the recipients. The gene sequencing was carried out with the 5'-exonuclease method („TaqMan“) from blood samples of our patients. The statistical evaluation was performed with chi2 testing method.

Results: We included 147 recipients and 56 donors. The distribution of PNPLA3 genotypes in the recipient group was II: 36.7%, IM: 43.2% and MM: 20.1% and in the donor group II: 64.3%, IM: 25.0% and MM: 10.7%. The difference between both groups was significant with a p-value of 0,002.

Conclusion: PNPLA3 polymorphism plays a role in steatosis and end-stage liver disease. The influence of donor genotypes on the results after liver transplantation is not clear. We are going to evaluate long-time results of our recipients with regard to PNPLA3 polymorphisms. Genetic testing of patients on the liver waiting list might be beneficial for the long-term results of these patients.

6. Einleitung

6.1. PNPLA3 Gen:

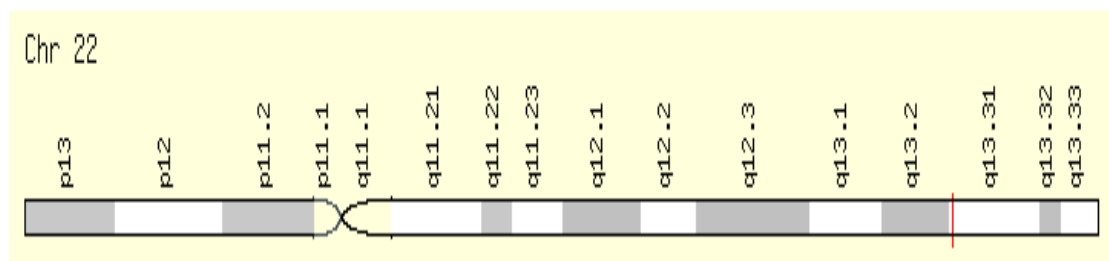
Das PNPLA3-Gen (patatin-like phospholipase domain-containing protein) kodiert für ein multifunktionelles Enzym, welches eine Rolle im Lipidstoffwechsel von Leber- und Fettgewebe spielt. Es ist auch bekannt als Adiponutrin (ADPN), Acylglycerol-O-Acyltransferase oder Calcium-unabhängige Phospholipase Epsilon (1, 2).

Es gehört zu einer Familie von Proteinen, die einer evolutionär sehr alten Domäne angehören. Identifiziert wurde es in Patatin, dem Hauptprotein der Kartoffelknolle. Patatin unterscheidet sich von den klassischen Lipasen in der Verwendung einer katalytischen Diade (SER ASP) und nicht einer katalytischen Triade um eine Hydrolyse zu bewirken (3).

Lokalisation:

Das PNPLA3 Gen sitzt am langen Arm des Chromosoms 22 (22q13.31). Das Hauptprotein ist 481 Aminosäuren lang und hat ein Molekulargewicht von 52,865 Kilo-Dalton (kDA). Es sind bisher zwei Isoformen beschrieben worden, wobei die funktionelle Bedeutung derer nicht genau bekannt ist (4, 5).

Abbildung 1: Chromosom 22



Molekulare Funktion:

Das kodierte Protein gehört zu den Single-Pass Typ 2 Membranproteinen und ist ein multifunktionales Enzym. Es besitzt eine Triacylglycerollipase-Aktivität als auch Acylglycerol-O-Acyltransferase-Aktivität. PNPLA3 beeinflusst die Triacylglycerolhydrolyse in den Adipocyten und spielt daher eine Rolle im Fettmetabolismus (3).

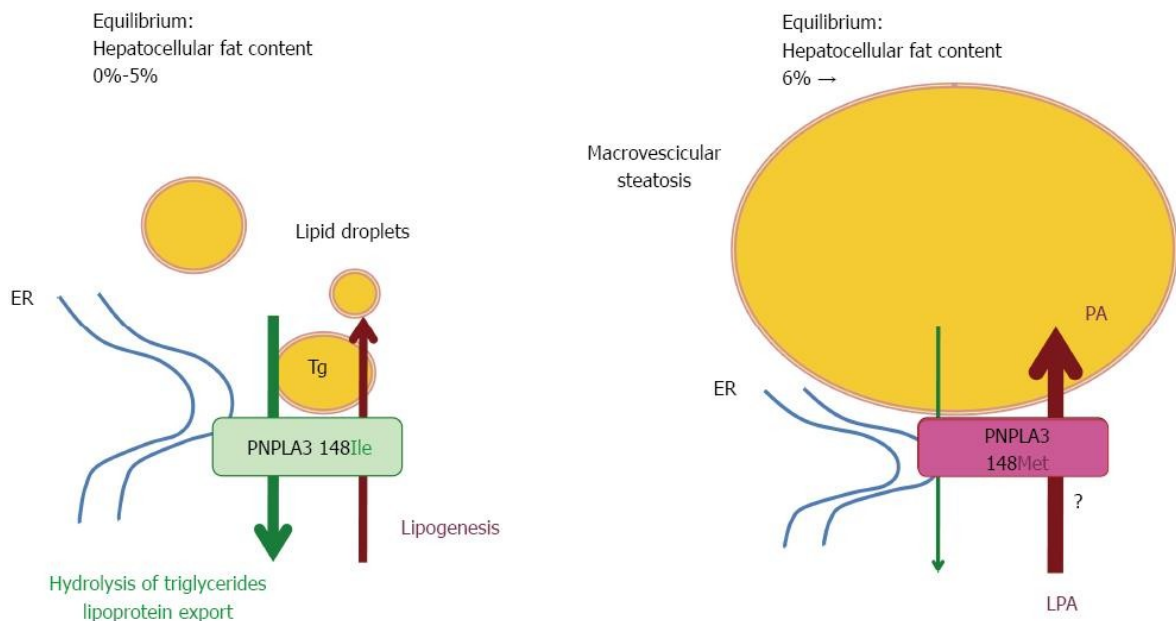
Vorkommen:

PNPLA3 wird zum größten Teil in der Leber exprimiert, moderate Expression findet sich auch in Niere, Gallenblase, exokrinem Pankreas, Prostata, Speicheldrüsen und Darm, eher gering in Duodenum und Magen. Der intrazelluläre Nachweis erfolgt auf Proteinebene.

Polymorphismus:

Eine Isoleucin-zu-Methionin-Mutation an der Position 148 des PNPLA3-Gens (rs738409) ist möglich. Demnach unterscheidet man verschiedene Genotypen des PNPLA3-Gens, welche in der Bevölkerung unterschiedlich aufgeteilt sind und möglicherweise einen Einfluss auf die Abläufe in der Leber haben könnten (6).

Abbildung 2: Hypothetischer Mechanismus der hepatischen Fettakkumulation bei PNPLA3 Polymorphismus (7).



6.2. Klinische Bedeutung des PNPLA3 Polymorphismus

Die hauptsächliche Expression des PNPLA3 Gens auf Leberzellen lässt einen engen Zusammenhang zwischen Mutationen auf dem Gen und typischen Lebererkrankungen vermuten. Mehrere rezente Forschungen auf diesem Gebiet betreffen den Zusammenhang zwischen dem PNPLA3 Polymorphismus und dem Grad der Schädigung der Leber bei alkoholischer und nicht alkoholischer Steatohepatitis oder einer Prädisposition dieser PatientInnen an einer ALI, AC oder einem HCC zu erkranken (8, 9)

Das Protein wird als Antwort auf Nahrungsstimuli, sowohl auf transkriptionaler als auch auf posttranslationaler Ebene reguliert. So passiert es, dass z.B. während des Fastens, durch eine sehr niedrige Transkriptionsrate der PNPLA3 mRNA, sehr wenig PNPLA3 auf der Leber exprimiert wird. Kohlenhydrate regen wiederum durch den Transkriptionsfaktor SREBP-1c die PNPLA3 Transkription an und regulieren gleichzeitig die Fettsäurebiosynthese nach oben.

6.2.1 PNPLA3 und NAFLD, NASH

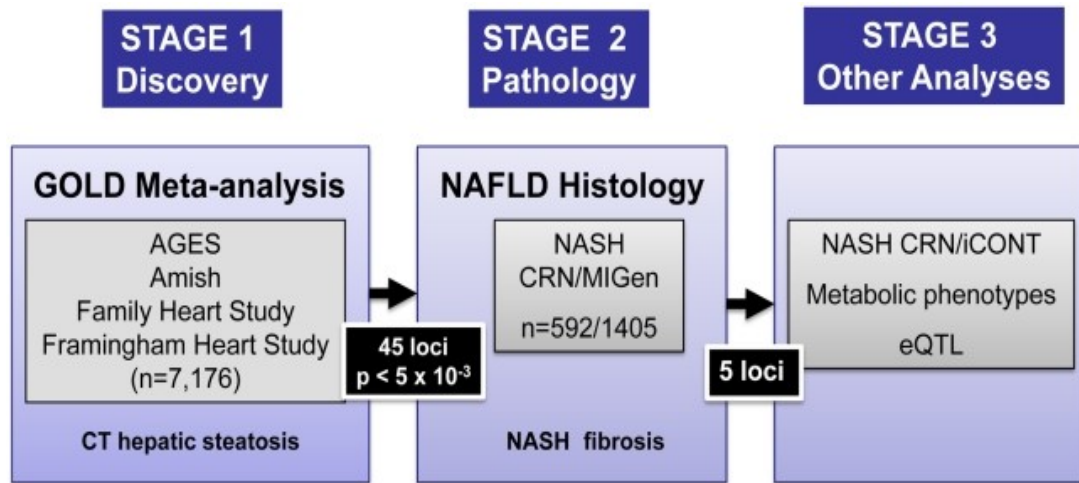
Erste Berichte über einen Zusammenhang zwischen PNPLA3 IM148 Variante in der NAFLD kam von der GWAS von Romeo et al (10). Diese Autoren identifizierten erstmals die Beziehung zwischen dieser SNP und dem Leberfettgehalt.

In den letzten Jahren gab es immer mehr Forschungen das PNPLA 3 und seine Mutationen betreffend, sowie dem Zusammenhang mit Lebererkrankungen, vor allem der nicht alkoholischen Fettleber. (NAFLD)

Die einzige bekannte genetisch gemeinsame Variante, von beeinflussenden Risiken in Familien mit gehäuft vorkommender NAFLD, waren nahe dem PNPLA3.

In dieser nicht invasiven Studie (genomweite Assoziationsanalyse, GWA, mit Computertomografie gemessene Hepatosteatose) wurde ein Versuch gestartet, zusätzliche genetische Varianten zu identifizieren. Dazu bediente man sich großer populationsbasierter Proben. (11)

Abbildung 3:



Es zeigten sich signifikante Assoziationen mit histologisch nachgewiesenen NAFLD in und in der Nähe der Genloci NCAN, GCKR, LYPAL1 und PNPLA3. Es konnten also in dieser Studie gemeinsame genetische Heterogenitäten in der Beeinflussung der Steatose und des Risikos an NAFLD zu erkranken, sowie verschiedene Effekte auf abnorme Serumlipide oder glykämische und antropometrische Merkmale, nachgewiesen werden.

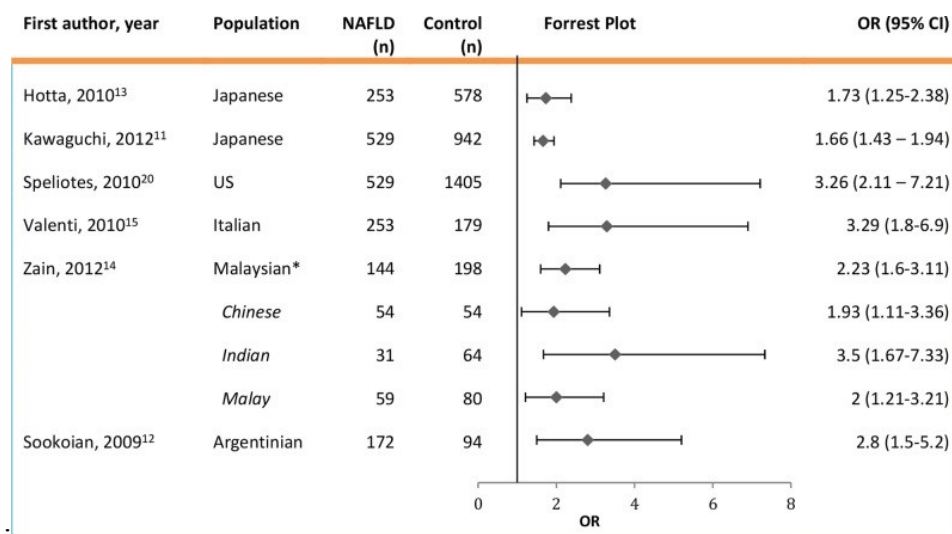
Abb3 zeigt das Studiendesign. Meta Analyse von genomweiten Assoziationsdaten wurden in Stufe 1 über die gezeigten Kohorten durchgeführt. Die am besten zugeordneten Loci wurden in der histologisch basierten NAFLD Proben (Stufe 2) von der NASH CRN Genotyp und MIGen Kontrollen abgestimmt. Die Effekte der 5 Loci, metabolische Phänotypen und eQTLs (expression quantitative trait loci) in Leber und Fettgewebe wurde in Stufe 3 durchgeführt.

Durch das Phänomen der zunehmenden Verbreitung der nicht-alkoholischen Fettleber in westlichen Ländern, teilweise bis zu 20% der Bevölkerung, machten es sich WissenschaftlerInnen auf der ganzen Welt zu ihrem Ziel, die möglichen genetischen Einflüsse, die Anfälligkeit an der nicht-alkoholischen Fettleber und nicht-alkoholisch induzierten Steatohepatitis zu erkranken, zu erforschen. In einer Studie der Universität Dundee in England (12) wurden die Medline und Scopus Datenbanken durchsucht, um Kandidaten-Genstudien zu histologisch nicht-alkoholischen Fettleber zu identifizieren. In dieser Studie wurden insgesamt 85 Artikel zusammengefasst und auf der Basis eines allgemeinen Weges, welches jedes Kandidaten Gen das in

- Lipidmetabolismus
- Lipoproteinverarbeitung
- Cholesterinsynthese
- Glucosehomöostase
- Entzündungsreaktion
- Schutz gegen oxidativen Stress und
- Ganzen Körpermetabolismus

involviert ist, kategorisiert.

Auch hier zeigte sich eine konsequente Assoziation von PNPLA3 mit NAFLD und nicht-alkoholischer Steatohepatitis (NASH). Auch die Rolle der Erbllichkeit wurde weithin von mehreren epidemiologischen, familiären und Zwillingsstudien, sowie Fallserien aufgezeigt. Darüber hinaus haben die Rasse und ethnischen Unterschiede in der Prävalenz von NAFLD großen Einfluss. Am häufigsten betroffen ist die Bevölkerung aus Ostasiatischen Ländern, gefolgt von Hispanics, Asiaten, Kaukasiern, weniger häufig Afro-Amerikaner. Die vielen genomweiten Assoziationsstudien haben hier eindeutig die patatin like phospholipase domain containing 3 Genvariante I148M als einen wichtigen Akteur in der Entwicklung und Progression von NAFLD identifiziert. Abbildung 4 zeigt Studien in denen der Zusammenhang zwischen NASH und rs 738409 des PNPLA3 bei malaysischen, chinesischer, indischer Bevölkerung, sowie malaysischer ethnischer Untergruppen.



In jüngster Zeit wurde der 2E167K Aminosäuren Variante ,einem Transmembran 6 superfamily member 2 (TM6SF2) Protein, auch eine relevante Rolle sowohl in der Pathogenese der NAFLD, als auch bei zahlreichen kardiovaskulären Ereignissen zugestanden.(13)

6.2.2 PNPLA3 und HepatitisC

Interessanterweise scheint der PNPLA3 Genotyp die Steatose, Progression der Fibrose, nicht aber die Entstehung eines Hepatozellulären Karzinoms (HCC) zu beeinflussen. Getestet wurden Patienten mit chronischer Hepatitis C. (14) In einer Sekundäranalyse wurden die Daten von HCV infizierten Patienten, die an einer HALT-C Studie teilnahmen analysiert. Das Ergebnis dieser randomisierten Studie ergab schließlich einen Zusammenhang des PNPLA3 (rs738409) mit der Progression der Leberfibrose, jedoch keine signifikante Entwicklung einer HCC.

Eine Veröffentlichung von August 2015 aus Japan(15), in der der Effekt vonPNPLA3 rs 738409 Variante (I148M) auf NAFLD, Fibrose sowie Nekrose und Entzündung der Leber, bei ausschließlich japanischen PatientInnen mit chronischer Hepatitis C, untersucht wurde, ergab, dass auch hier der Einfluss dieser Genvariante nachzuweisen war. Die GG Homozygotenträger haben definitiv ein höheres Risiko für NAFLD, massive Nekrose und Entzündung, sowie fortschreitende Fibrose der Leber.

Ebenso wurde eine Interaktion der PNPLA3 Variante und dem Alter der PatientInnen bei der Infektion mit Hepatitis C nachgewiesen. (16) HCV infizierte Patienten leiden an einer beschleunigten Fibroseprogressionsrate. Die FPR (Fibroseprogressionsrate) wurde in einer prospektiven Kohorte von 247 CHC-Patienten, ohne Alkoholkonsum und Diabetes, geschätzt und nach einer sorgfältigen Abschätzung des Alters bei der Hep C Infektion und Bestimmung des Fibrorestadiums, mit dem Ishak-Score, untersucht. Die Auswertung ergab, dass die stärkste Determinante einer FPR ein höheres Alter bei der Infektion mit der Hepatitis C ist.



Abbildung 5 zeigt graphisch den Einfluss des Alters und der Infektion mit der Fibroseprogression bei homozygoten Patienten über 21a und nicht homozygoten gleichen Infektionsalters.

6.2.3 PNPLA3 und HepatitisB

In einer Studie über den PNPLA3 Polymorphismus im Zusammenhang mit NAFLD und chronischer Hepatitis B (17) wurde kürzlich folgendes beschrieben: Analysiert wurde eine Kohorte mit biopsieverifizierter Hepatitis B, mit oder ohne NAFLD. Die Patienten kamen alle aus China und ihre PNPLA3 Polymorphismen wurde durch Gen Sequenzierung genotypisiert. Das Ergebnis dieser Studie ergab, dass nicht weniger als 4 SNPs von PNPLA3, nämlich

- rs738409
- rs3747206
- rs4823173
- rs2072906

mit Anfälligkeiten für NASH, NAFLD, Leberfibrose und der Dynamik der Hepatitis B, im mit Hepatitis B infizierten Patienten, korrelieren. Eine ähnliche Veröffentlichung vom Okt.2015 gibt es aus Neapel (18), in der ausschliesslich italienische Hepatitis B TrägerInnen untersucht worden waren. Eine Kohorte von 99 PatientInnen wurde untersucht und genotypisiert. Das Ergebnis zeigte auch hier einen signifikanten Einfluss

des rs738409 auf die NAFLD aber auch auf den Cholesterol Level, nicht aber auf die Fibrose.

Jedoch: Die homozygoten Hep.B infizierten TrägerInnen des PNPLA3 zeigten im Vergleich zu den Heterozygoten (G Allel vs C Allel), eine massivere Steatose. Alle G-Allel TrägerInnen wiesen interessanterweise einen erhöhten Serum ALT (Alanin Aminotransferase) Spiegel auf. Ebenso wurde ein Zusammenhang mit dem Bauchumfang nachgewiesen.

Auch das Alter des Patienten scheint keinerlei Rolle zu spielen, wobei 288 übergewichtige, adipöse Jugendliche und Erwachsene, mit oder ohne metabolischem Syndrom, untersucht wurden.(19) Gezeigt hat sich, dass die vermehrte Anzahl der Homozygoten GG Träger sowohl das metabolische Syndrom, als auch einen signifikant erhöhten ALT Spiegel aufwiesen und das sogar bei PatientInnen, die unter 20 Jahren waren. Eine Identifizierung des rs 738409 bei übergewichtigen Jugendlichen sollte demnach so früh wie möglich verifiziert werden und mit einer rigorosen lifestyle Änderung einhergehen.

6.2.4 PNPLA3 und HCC

Auch das Leberzellkarzinom, das mit chronischen Lebererkrankungen eng im Zusammenhang steht, wurde mit der PNPLA3 Variante mehrmals abgehandelt und erforscht. So beschreibt eine Publikation aus dem Jahr 2013 (20) das Vorkommen des HCC, sowie eine Risikomodellvorhersage bei Patienten mit Zirrhose und rs 738409. Von 279 Patienten mit alkoholischer und 253 Patienten mit HCV induzierter Zirrhose wurde eine Genotypisierung durchgeführt. Die Patienten wurden nach Risiko auf HCC gescreent und der Einfluß von rs 738409 auf die Entstehung des HCC mit der Kaplan-Meier Methode und mit dem Cox Modell beurteilt.

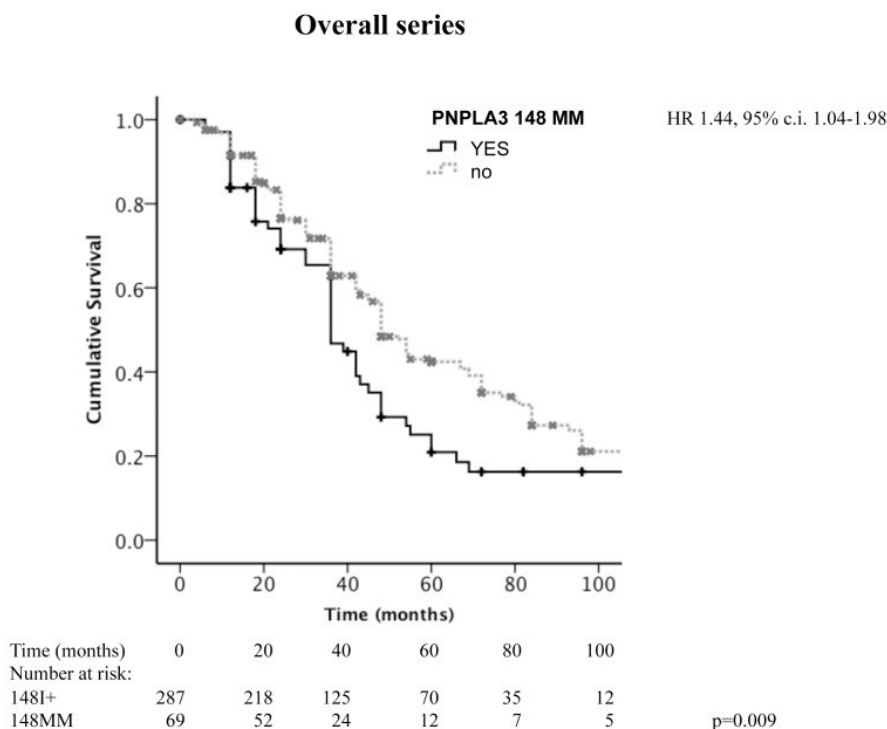
In dieser Abhandlung zeigte sich, dass Patienten , die an einer HCV induzierten Leberzirrhose litten, trotz des Genotypen, kein erhöhtes Risiko hatten an einem HCC zu erkranken, wohingegen PatientInnen mit einer alkoholischen Zirrhose, die den gleichen Genotyp, der als unabhängiger Risikofaktor fungierte, aufwiesen, zusammen mit höherem Alter, männlichem Geschlecht und höherem BMI ,ein definitiv höheres Risiko an einer HCC zu erkranken, zeigten. Somit liefert diese Studie wichtige Daten im Zusammenhang der PNPLA3 Variante mit alkoholischer Leberzirrhose und Hepatozellulärem Karzinom.

In der Kombination mit den klinischen Merkmalen lässt sich somit die Gruppe der Patienten, die ein erhöhtes Risiko haben, aussortieren.

In Italien versuchte man den PNPLA3 Polymorphismus und seinen Einfluss auf das Überleben und der klinischen Präsentation des Hepatozellulären Karzinoms herauszufinden (21). Es zeigte sich, dass Homozygotie für PNPLA3 I148M der einzig negative Prädiktor für das Überleben bei PatientenInnen mit ALD (alkoholischer Fettleber) und NAFLD ist. Die heterozygoten PatientenInnen mit ALD und NAFLD hingegen zeigten ein jüngeres Alter, eine weniger fortgeschrittene Zirrhose bei der HCC Diagnose und einen niedrigeren Differenzierungsgrad des HCC.

Zusammengefasst lässt sich bei dieser Untersuchung feststellen, dass PNPLA3 148M in Patienten mit ALD und NAFLD induzierten HCC überexprimiert wird und mit einem reduzierten Überleben einhergeht.

Abbildung 6 zeigt eine Kaplan Meier Schätzung für das Überleben bei HCC Patienten. HR: Hazard Ratio für den Tod bei Homozygotie. Die Zahlen am unteren Rand betreffen Patienten die in diesem Zeitintervall unter Beobachtung stehen.



6.2.5 PNPLA3 und Lebertransplantation

Für unsere Arbeit wichtig und interessant war auch die Publikation einer Studie, die den Zusammenhang von SpenderInnen und EmpfängerInnen rs738409 auf die Progression der Leberfibrose bei Hepatitis C nach einer Transplantation zeigt. (22)




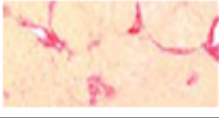



In dieser amerikanischen Kohortenstudie untersuchte man 101 PatientInnen mit HCV, die sich im Zeitraum Jänner 2008 bis Juni 2011 einer Lebertransplantation unterzogen. SpenderInnen und EmpfängerInnen rs738409 wurde aus SpenderInnen wedge Biopsien und EmpfängerInnen Explantationsbiopsien genotypisiert und analysiert und nach dem Cox Modell ausgewertet, wobei man

- ❖ den HCV Spender Risiko Index
- ❖ warme ischämie Zeit
- ❖ MELD Score
- ❖ Und die Virus Ausprägung

anpasste, und die Zeit bis zum Auftreten einer Ishak 3 Score Fibrose und/oder einer HCV Mortalität oder eines Transplantatverlusts analysierte.

Die Nachbeobachtungszeit betrug hierbei 620 Tage. Insgesamt entwickelten 39 PatientInnen eine Ishak3 Score Fibrose, HCV Mortalität oder einen Transplantatverlust.

Abbildung 7 (Medicine » Pathology » "Liver Biopsy", book edited by Hirokazu Takahashi, ISBN 978-953-307-644-7, Published: September 6, 2011 under CC BY-NC-SA 3.0 license. © The Author(s).

Appearance	Ishak stage: Categorical description	ISHAK	METAVIR
	No fibrosis (Normal)	0	F0
	Fibrosis expansion of some portal areas ± short fibrous septa	1	F1
	Fibrosis expansion of most portal areas ± short fibrous septa	2	F2
	Fibrosis expansion of most portal areas with occasional portal to portal (P-P) bridging	3	
	Fibrosis expansion of portal areas with marked portal to portal (P-P) bridging as well as portal to central (P-C)	4	F3
	Marked bridging (P-P and/or P-C) with occasional nodules (incomplete cirrhosis)	5	
	Cirrhosis, probable or definite	6	F4

Das Fazit dieser Studie zeigte, dass der rs738409 Genotyp des/r Spenders/In ein wichtiger Prognosefaktor im „Outcome“ nach einer Lebertransplantation bei HCV stellt.

Wichtig für die Auswahl des/r Spenders/in und einer möglichst frühen Entscheidung für eine antivirale Therapie.

Eine andere Veröffentlichung vom November 2014 beschreibt eine nicht invasive Untersuchung der Steatose nach Transplantation (23) mittels transientser Elastografie (TE), dabei erzeugt ein Niederfrequenzschallkopf einen Impuls, der sich in der Leber ausbreitet. Ein Ultraschalltastkopf misst im Lebergewebe diese Ausbreitungsgeschwindigkeit, je höher diese Geschwindigkeit desto fibrosierter die Leber. Und mittels controlled attenuation parameter. (CAP) Das ist die Ultraschallbasierte Methode der Leberfettquantifizierung, die als Softwaremodul in der TE integriert ist.

Die nicht-invasive Diagnostik gewinnt zunehmend an klinischer Bedeutung, da eine perkutane Leberbiopsie, aufgrund der doch begrenzten therapeutischen Konsequenzen, einer strengen Indikationsstellung unterliegt und deshalb nicht zur Verlaufsbeobachtung (regelmäßige Wiederholungen) geeignet ist.

Bei dieser Studie wurden 204 PatientInnen untersucht. 102 mit NAFLD, 102 mit ALC. 42% weiblich, mittleres Alter 57, 8a, mittlere Zeit nach Transplantation 66 Monate. Die EmpfängerInnen wurden für rs738409 (PNPLA3), rs8099917 und rs12979860 (IL28B - GEN=Prognosemarker bei Hep C Infektion) genotypisiert. Auch die Ergebnisse dieser Studie ergaben, dass die EmpfängerInnen, die den Genotyp rs738409 exprimierten, vermehrt eine Fibrose, Komponenten des metabolischen Syndroms und Steatose nach einer Lebertransplantation aufwiesen. Für IL28B Polymorphismus wurden keine Assoziationen nachgewiesen.

6.2.6 PNPLA3 und PSC

Eine der Indikationen für eine Lebertransplantation ist die primär sklerosierende Cholangitis. Der Entstehungsmechanismus dieser Entzündung und Sklerosierung der Gallenwege ist bis dato weitgehend ungeklärt. Gehäuft assoziiert mit p-ANCA und entzündlichen Darmerkrankungen tritt die PSC vermehrt beim männlichen Geschlecht auf. Hat auch diese Erkrankung mit einer PNPLA3 Variante zu tun und wenn ja, ist diese Variante auch geschlechtsspezifisch?

Diese Frage zu beantworten versuchten sich deutsche WissenschaftlerInnen in einer Studie (24). Dabei wurde die rs738409 Variante in 121 deutschen PSC PatientInnen (Langzeitprospektive Kohorte) und 347 norwegischen PSC PatientInnen genotypisiert.

Patienten, die I148M Träger waren, zeigten bei Entwicklung einer dominanten Stenose, eine statistisch verminderte Überlebensrate ohne Lebertransplantation. In Bezug auf die Geschlechtsspezifität konnte man bei den weiblichen Patienten mit I148M Polymorphismus und DS keinerlei Effekte auf das Überleben nachweisen. Somit kam man zu der Erkenntnis, dass bei männlichen, I148M tragenden PSC Patienten mit schwerer Gallengangstenose (DS), die eine Intervention verlangt, das Überleben gesamt vermindert ist. Bei Trägern ohne DS, der I148M Genotyp jedoch keinen Einfluss auf das Überleben hat.

6.3. Lebertransplantation

Die erste Lebertransplantation (LTX) wurde 1963 von Thomas Starzl durchgeführt (25). Mit der Lebertransplantation wurde die Behandlung von PatientInnen mit fortgeschrittener terminaler Leberinsuffizienz möglich und sie ist inzwischen die effektivste Therapie für diese PatientInnen (26). Es konnten in den letzten Jahrzehnten beachtliche Fortschritte bezüglich der chirurgischen Technik, dem peri-und postoperative Management und der Immunsuppression erzielt werden. Die Überlebenschancen sind besser und auch die Lebensqualität verbessert sich nach Lebertransplantation signifikant.

Indikationen:

Für eine Lebertransplantation gibt es 3 wesentliche Indikationsgruppen:

- Chronisches Leberversagen
- Akutes Leberversagen
- Lebertumor

Chronisches Leberversagen

PatientInnen mit Leberzirrhose und einer möglichen Komplikation (Aszites, Varizenblutung, hepatische Enzephalopathie, hepatorenales Syndrom) und einem Child Score von mindestens 7 Punkten bzw. einem MELD Score (Prognosemodell zur Einschätzung der Schwere der Lebererkrankung und Überlebenschancen) von 10 Punkten kann bei Fehlen von Kontraindikationen eine Lebertransplantation angeboten werden (27).

Mögliche Ursachen für eine Leberzirrhose:

Erkrankungen, die mit Leberparenchymschaden einhergehen

- Alkoholische Leberzirrhose
- Idiopathische Leberzirrhose
- Autoimmunhepatitis bedingte Leberzirrhose
- Posthepatitisch bedingte Leberzirrhose (Hepatitis D,B,C)

Erkrankungen, die primär das Gallenwegssystem betreffen oder davon ausgehen

- Primär biliäre Zirrhose
- Primär sekundäre Zirrhose
- Primär sklerosierende Cholangitis
- Extrahepatische Gallengangsatriesie
- Progressive intrahepatische familiäre Cholestase(Mb.Byler)
- Alagille-Syndrom(intrahepatische Gallengangshypoplasie)
- Kongenitale Fibrosen
- Cholestatisch verlaufende Sarkoidose
- Carolisyndrom (zystische dilatation der intrahepatischen Gallengänge)
- Medikamentös-toxische Cholestase
- Chronische Abstossung (nach vorangegangener LTX)

Primäre Stoffwechselerkrankungen

- MB.Wilson
- Hämochromatose
- Galaktosämie
- Alpha1-Antitrypsinmangel
- Glykogen Speicherkrankheiten
- Erythroetische Porphyrrie
- Familiäre Amyloidose
- Tyrosinämie
- Lysosomale Speicherkrankheiten
- Primäre Blutungsstörungen(ggf mit Budd Chiari Syndrom)

Vaskuläre Erkrankungen

- Budd Chiari Syndrom
- Mb.Osler

Akutes Leberversagen

Bei akutem Leberversagen sollte jede Chance zu einer Erholung der Leberfunktion genutzt werden. Ist die Prognose schlecht, sollte möglichst rasch eine Transplantation vor dem Auftreten lebensbedrohlicher Komplikationen wie Hirnödem, Blutungen oder Multiorganversagen angestrebt werden. Die Abschätzung der Transplantationsnotwendigkeit erfolgt nach Prognosekriterien (Clichy-Kriterien, Kings-College-Kriterien) (28, 29).

Mögliche Ursachen für akute Lebererkrankungen:

- Fulminante Virushepatitis (A,B,C,D,E)
- Akute Intoxikationen (Paracetamol, Ecstasy...)
- Akute Schwangerschaftsfettleber
- HELLP Syndrom
- Primäre Nicht-Funktion nach Lebertransplantation
- Budd Chiari Syndrom

Lebertumor

In diese Kategorie fallen das hepatozelluläre Karzinom (HCC) unter bestimmten Kriterien und Lebermetastasen bei einem neuroendokrinen Tumor.

Kriterien für die Listung von PatientInnen mit HCC:

Die Lebertransplantation ist für ausgesuchte PatientInnen mit hepatozellulärem Karzinom eine kurative Maßnahme: sie heilt den Tumor und die als Präkanzerose zugrunde liegende Leberzirrhose. Geeignet sind PatientInnen mit entweder einer einzigen HCC Läsion < 5cm oder bis zu 3 Knoten je < 3 cm angesehen (Mazzaferro oder Mailand-Kriterien). Damit kann eine 70%ige 5-Jahres-Überlebensrate mit einer Rezidivrate < 15% erreicht werden (30).

Kriterien für die Listung von PatientInnen mit neuroendokrinen Tumor:

Bei manchen PatientInnen mit isolierten Lebermetastasen von einem neuroendokrinen Tumor kann die LTX angeboten werden (31). Extrahepatische Metastasen sind eine absolute Kontraindikation. Die Überlebensraten sind bei dieser Indikation ähnlich wie beim hepatozellulären Karzinom.

Indikationsstellung zur Lebertransplantation

Als Unterstützung zur Indikationsstellung zur LTX stehen 2 Scores zu Verfügung:

- Child Pugh Score (32)
- MELD Score (33)

Mit Hilfe der Scores kann die Leberzirrhose in Stadien eingeteilt werden und eine Einschätzung der Prognose gemacht werden.

Tabelle 1: Child Pughs Score

Kriterium	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte	Einheit
Serum-Bilirubin (gesamt)	< 2,0 < 34,208	2,0–3,0 34,208– 51,312	> 3,0 > 51,312	mg/dl (x 17,104 = µmol/l) µmol/l
Serum-Albumin	> 3,5	2,8–3,5	< 2,8	g/dl
INR	< 1,7	1,7–2,2	> 2,2	–
Aszites im Ultraschall	keiner	leicht	mittelgradig	–
hepatische Enzephalopathie	keine	Stadium I–II	Stadium III–IV	–

Tabelle 2: MELD-Score

Punkte	Stadium	1-Jahres-Überlebensraten	5-Jahres-Überlebensraten	10-Jahres-Überlebensraten	perioperative Mortalität
5–6	A	84 %	44 %	27 %	10 %
7–9	B	62 %	20 %	10 %	30 %
10–15	C	42 %	21 %	0 %	82 %

Kontraindikationen

Nicht immer, wenn eine LTX indiziert ist, ist es auch möglich diese durchzuführen. Es gibt absolute und relative Kontraindikationen (34):

- Unkontrollierte systemische Infektionen
- Malignomkrankung, die nicht mindestens 5 Jahre zurückliegt
- Fortgesetzter Alkohol- oder Drogenabusus
- Schwere psychiatrische oder neurologische Erkrankung
- Extrahepatische Manifestation eines HCCs
- Cholangiozelluläres Karzinom
- Ausgeprägte Hypoxie oder schwere pulmonale Hypertonie
- Inadäquate kardiale Funktion
- Non-Compliance, Non-Adhärenz

Operation

Die Lebertransplantation wird orthotop durchgeführt, das heißt, das zirrhotische Organ wird vollständig entfernt und an dessen Stelle kommt das Spenderorgan (35). Die Operation dauert zwischen ca. 4 und 8 Stunden. Im Transplantationszentrum Graz wird die Piggy-Back-LTX mit retrograder Reperfusionstechnik bevorzugt. Diese Methode hat den Vorteil, dass durch Vermeidung eines Bypasses und Aufrechterhaltung des venösen Abflusses aus der unteren

Körperhalte, eine Stauung von Niere und Darm vermieden werden kann. Somit kann, bei Funktionserhalt der Nieren und Reduktion eines möglichen postoperativen Ileus, die sofortige parenterale Ernährung erfolgen-fast tracking.

Die Reperfusionstechnik ist charakterisiert durch das sofortige öffnen der Gefaklemme nach erfolgter Anastomisierung. Eine vorerst retrograde Reperfusion durch die Lebervenen gefolgt von einer antegraden Reperfusion durch die Pfortader zeichnen diese Methode aus. Im Transplantationszentrum Graz konnte man gute Erfahrungen hinsichtlich geringen Risikos für Reperfusionsschaden und Postreperfusionssyndrom machen.

Nach der Operation werden die PatientInnen einige Tage auf der Intensivstation betreut, anschließend auf der Normalstation.

Abbildung 8: Situs nach Entfernen der zirrhotischen Leber

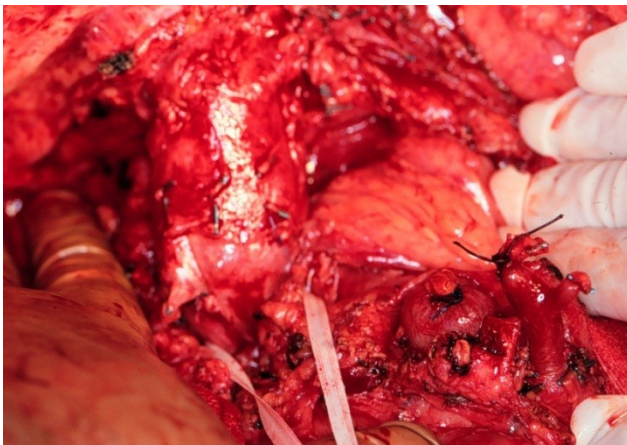
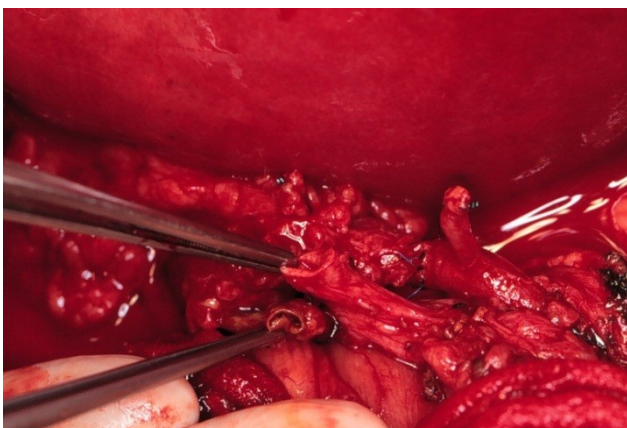


Abbildung 9: Implantierte Leber (im Vordergrund der Gallengang und dahinter die A. hepatica)



Komplikationen

Der **Reperfusionsschaden** und die Folgen kalter und warmer Ischämie können allen PatientInnen nach LTX auftreten (36). Sofort nach der Transplantation fällt ein Leberfermentanstieg auf, der sich in den ersten Tagen nach der Transplantation reduziert. Sollte dies nicht der Fall sein, handelt es sich um ein primäres Graftversagen.

Gallengangskomplikation: Gallengangskomplikationen können nach Lebertransplantation in 7 bis 38 % auftreten. Die endoskopische, retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) ist gut geeignet für Diagnose und Therapie (Dilatation, Stent). Wenn die ERCP nicht erfolgreich ist, wird eine Relaparotomie mit neuer Gallengangsanastomose durchgeführt oder eine biliodigestive Anastomose angelegt (37).

Abbildung 10: ERCP bei Gallengangsstenose nach LTX



Blutung: Blutungen sind Komplikationen, die vor allem kurz nach der Transplantation auftreten können (38). Jede Blutung mit nachweisbaren Hämatomen, einem signifikanten Blutbildabfall oder hämodynamischer Wirksamkeit wird reoperiert.

Arteria hepatica Thrombose: Kommt in ca. 0,5 bis 2 % vor (39). Bei früher Diagnosestellung kann eine Thrombektomie mit neuerlicher arterieller Anastomose erfolgreich sein. Bei schweren oder späten Fällen sollte eine Retransplantation durchgeführt werden.

Abstoßung: Kann zu jedem Zeitpunkt nach der Transplantation auftreten. Sie kommt bei 20-40% vor. Bei Nachweis einer Abstoßung erfolgt eine Erhöhung oder Umstellung der Basisimmunsuppression oder in schwereren Fällen ein Steroidbolus (40).

Infektion: Infektionen bilden eine der häufigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität nach Transplantation und können zu jedem Zeitpunkt auftreten (41). Die häufigsten Infektionen sind Pneumonien, Cholangitiden und Harnwegsinfekte. Bei Verdacht auf eine Infektion wird eine rasche Diagnostik mit möglichst gezielter Therapie durchgeführt.

Rezidiv der Grunderkrankung: Das Wiederauftreten der Grunderkrankung ist zu jedem Zeitpunkt möglich und hängt von der Art der Erkrankung ab. Ca. 90-95 % der PatientInnen mit LTX aufgrund einer Hepatitis C (HCV) induzierten Leberzirrhose bekommen einen Reinfekt. PatientInnen mit Hepatitis B bekommen zu ca. 50% ein Rezidiv (42).

Postoperatives Management

Ziel der Nachsorge ist die Überwachung von Leberfunktion, der Ausschluss von Rezidiven der Grunderkrankung sowie ein Screening von möglichen Tumoren und Komplikationen durch die Langzeitimmunsuppression. Einige der oben genannten Komplikationen können nicht nur kurz nach der Operation auftreten, sondern zu jedem Zeitpunkt nach der Transplantation. Vor allem Infekte oder Abstoßungen des transplantierten Organs können für die betroffenen PatientInnen jederzeit lebensbedrohlich werden. Das Wiederauftreten der Grundkrankheit (z.B. virale Hepatitis, primär biliäre Zirrhose, Autoimmunhepatitis) ist meistens keine akute Gefährdung, beeinträchtigt aber das Langzeitüberleben beträchtlich.

Da operative und frühpostoperative Komplikationen in den meisten Fällen gut zu beherrschen sind, richten sich die weiteren Bestrebungen die Ergebnisse nach Lebertransplantation zu verbessern, mehr in den Bereich der Langzeitergebnisse. In den letzten Jahrzehnten konnten aufgrund von Verbesserungen bei der immunsuppressiven Therapie die Langzeitergebnisse bei transplantierten PatientInnen signifikant verbessert werden (43).

Neue Ansätze zur weiteren Verbesserung der Ergebnisse liegen unter anderem auch im Bereich der molekularen Ebene. Die Bestimmung von Gen-Polymorphismen soll helfen, PatientInnen mit höherem Risiko für eine bestimmte Erkrankung herauszufiltern oder das Risiko der Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs zu eruieren.

6.4. Forschungsfragen

Der Einfluss des PNPLA3 Genpolymorphismus auf den Verlauf einer Lebererkrankung konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden. Ganz klar sind jedoch die Zusammenhänge zwischen den einzelnen Grunderkrankungen und dem Genpolymorphismus noch nicht und auch mögliche Konsequenzen, vor allem in Hinblick auf eine bevorstehende Transplantation sind weitgehend unklar.

Der erste Schritt unserer Studie ist die Bestimmung der PNPLA3-Genotypen in unserer Empfängerpopulation, sowie vergleichend in der dazugehörigen Spenderpopulation. Es stellt sich die Frage, ob PatientInnen, die eine LTX benötigen, eher den ungünstigen Genotyp haben, als die Vergleichsgruppe der lebergesunden Spender.

Da PNPLA3 vor allem in der Leber exprimiert wird, stellt sich die Frage, ob nach einer Lebertransplantation in erster Linie der Spender-Genotyp entscheidend für die Prognose des Organs ist. Derzeit gibt es dazu nur wenige wissenschaftlichen Daten.

Da es möglich ist, den PNPLA3 Genotyp des Spenders und des Empfängers zu bestimmen und so das Match bestimmt werden kann, kommt die Frage auf, welches Match das schlechteste ist und ob bzw. welche Konsequenzen es für den weiteren Verlauf nach LTX hat.

Ist es auch möglich, aufgrund des neu erworbenen, transplantierten Genotyps, wenn dieser kein günstiger hinsichtlich Steatose und Fibrose ist, eine schlechtere Prognose zu haben?

Das Ziel dieser retrospektiven, explorativen Studie ist die Evaluierung des PNPLA3-Genotyps von PatientInnen welche in unserem Zentrum lebertransplantiert wurden. Ebenso werden von den Spendern unserer PatientInnen, soweit es möglich ist, die PNPLA3-Genotypbestimmungen durchgeführt. Diese werden dann mit denen der Empfänger

gemacht. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wird die Genotypisierung von Spendern und Empfängern durchgeführt. Weitere Teile der Studie (Langzeitverlauf, Einfluss auf Langzeitergebnisse...) werden im Anschluss durchgeführt und würden den Rahmen dieser Arbeit sprengen.

7. Material und Methoden:

7.1. PatientInnen

Nach Erhalt des Ethikvotums der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz wurde die Rekrutierung der PatientInnen begonnen.

Inkludiert wurden PatientInnen, welche zwischen 1998 und 2015 an unserer Abteilung lebertransplantiert wurden und nach gründlicher Aufklärung in die Studie eingewilligt hatten. Im Rahmen der regelmäßig durchgeführten Routine-Nachsorgekontrollen wurden die PatientInnen in die Studie eingeschlossen. Ein zusätzlicher Termin in unserer Ambulanz war für die Studie nicht nötig. Die für die Genotypisierung benötigte Blutabnahme wurde mit der Routineblutabnahme mitgemacht.

7.2. Immunsuppression

Die Immunsuppression soll eine Rejektion, welche lebenslang auftreten kann, verhindern. Ziel ist es diese Abstoßungsreaktion zu minimieren und die weitgehende Erhaltung einer immunologischen Reaktivität des Empfängerorganismus. Die immunsuppressive Therapie hat eine große Auswirkung auf die Langzeitergebnisse nach LTX und spielt auch eine wesentliche Rolle für die Entstehung eines möglichen Rezidivs bzw. den Verlauf einer Steatose oder Fibrose nach LTX. Für die Induktionstherapie nach einer Lebertransplantation wird zurzeit und je nach Transplantationszentrum eine Immunsuppression mit Interleukin-2-Rezeptorantagonisten oder Antithymozyten-/Antilymphozytenglobulin (ATG/ALG) in Kombination mit einem Kortisontaper verwendet. Als Erhaltungsimmunsuppression stehen einige Immunsuppressiva zur Verfügung, welche patientenindividuell angewendet werden. Dabei richtet man sich

vorwiegend nach dem Alter, Komorbiditäten, der Grundkrankheit des/r Patienten/in und nach möglichen Nebenwirkungen des Präparates. Ein Kortison wird bis zum Ende des dritten postoperativen Monats ausgeschlichen und nur im Rahmen einer Abstoßungstherapie erneut verabreicht.

Die immunsuppressiven Therapien lassen sich in eine

- Initiale Induktionstherapie
- Basisimmunsuppressionstherapie(Erhaltungstherapie)
- Abstoßungstherapie

einteilen, wobei sich die Therapie nach jeweilig transplantiertem Organ richtet. Grundsätzlich wird nach erfolgter Transplantation mit einer hochdosierten Induktionstherapie begonnen, die als Erhaltungstherapie fortgeführt wird.

Abhängig von Grunderkrankung, Alter und Klinik wird zur Induktion bei LTX in Graz folgende Induktionstherapie verabreicht:

1. Thymoglobulin: 0,5 – 1,0 mg/kg G über 3-4d,alternativ Basiliximab (Simulect®), bei stark geschwächten u/o alten Patienten. Dosierung lt. Kodex: 2h vor TX 20mg iv + 4.d post TX 20mg!
2. Kortisontaper: 4x 70 mg Methylprednisolon iv/d, welches täglich um 10 mg reduziert wird.

Für die Erhaltungstherapie stehen folgende Substanzen zur Verfügung:

1. Prograf (Calcineurininhibitor) iv. oder p.o., wenn der/die Patient/in bereits extubiert ist. Am nächsten Tag bereits Spiegelkontrolle und weitere Dosierung nach Spiegel.
2. Sandimmun (Calcineurininhibitor): Cyclosporin
3. Cellcept (Mycophenolat Mofetil)
4. mTOR-Inhibitoren (Certican, Rapamune)

Die Erhaltungstherapie wird individuell auf die PatientInnen (Alter, transplantiertes Organ, Nebenwirkungsprofil) abgestimmt.

7.3. Abstoßung

Ursache einer Transplantatabstoßung ist die Antwort des Immunsystems des Empfängers gegen das Spendergewebe. Diese Immunantwort wird vor allem T-Zell vermittelt. (44)

Je nach klinischem Verlauf und Morphologie kann man die Abstoßung in 3 Typen unterteilen. (45,46)

Hyperakute Abstoßung

Dabei wird, durch schon vorhandene alloreaktive Antikörper gegen Gruppenantigene (ABO) oder Histokompatibilitätsantigene, eine hyperakute Abstoßung ausgelöst. Die Reaktion kann innerhalb von Minuten, Stunden oder Tagen entstehen und ist mit einem Verlust des Transplantates vergesellschaftet.

Das Organ schwillt an, es kommt zu einer dunkelblau-roten Verfärbung und hämorrhagischen Nekrosen. Diese entwickeln sich durch Fibrinthromben in kleineren Gefäßen, die dieselben verschließen. Diese Form der Abstoßung zeigt einen Rückgang, da es eine Weiterentwicklung der Immunsuppression gab. (45)

Akute Abstoßung

Die akute Abstoßungsreaktion entsteht meist in den ersten Wochen nach der Transplantation. Sie ist die häufigste Form der Abstoßungsreaktion und damit der Hauptgrund von Organdysfunktionen und Organversagen.

Die wesentliche Ursache für die akute Abstoßung ist die T-Zell-Antwort des Empfängers. Die T-Helferzellen erkennen die MHC Klasse II Antigene des Spenders und beginnen Zytokine und Interleukine zu bilden. Infiltration des Organs durch zytotoxische T-Lymphozyten.

In der Bestimmung des HLA Typen 21 wird ebenfalls ein wichtiger Faktor für die Prognose der Abstoßungsreaktion gesehen, da die MHC-Antigene eine große Rolle in der Reaktion spielen. Zwischen HLA-identen Geschwistern ist eine Abstoßung ebenfalls möglich. Die Antigene, die dies bewirken, werden Minor-Histokompatibilitätsantigene oder Minor-H-Antigene genannt. Deren Verhalten ist jedoch noch nicht komplett entschlüsselt. (45,46)

Chronische Abstoßung

Diese Reaktion tritt in der Regel erst nach Monaten oder sogar nach Jahren nach einer Transplantation auf, oft aber auch bei Patienten, die zuvor Schübe einer akuten Abstoßung zeigten. Eines der Hauptmerkmale ist die obliterierte Schaumzellarteriopathie und eine Beteiligung von alloreaktiven B- und T-Zellen. Die Folge ist eine Minderdurchblutung, die sogenannte Transplantatvaskulopathie, die zu einem Parenchymverlust und Fibrose führt. Es kommt durch verschiedene Einflüsse zu einer Anregung des Epithels und Endothels, wie zum Beispiel durch Zytokine, viral, physikalisch und immunologisch. Einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren der dabei beteiligt ist, ist TGF- β , das vom Endothel produziert wird. Die folgende chronische Entzündung der Gefäßwände führt allmählich durch Fibrosierung und Vernarbung zu dieser gefährlichen Verengung. Es handelt sich dabei um ein pro-fibrinogenes Zytokin. (45,46)

Banff Schema für das Grading der Lebertransplantatabstoßung: Globale Einschätzung des Schweregrades der Abstoßungsreaktion

Tabelle 3:

Globale Abschätzung	Kriterien
unbestimmt	Entzündliche Infiltrate im Portalfeld, die die Kriterien für eine akute Abstoßung nicht erfüllen
mild	Ein für eine Abstoßung typisches aber gering ausgeprägtes und auf die Portalfelder beschränktes Infiltrat in wenigen Portalfeldern
mäßig	Die meisten oder alle Portalfelder sind durch die abstoßungsbedingten Infiltrate verbreitert
schwer	Wie oben für die mäßige Abstoßung beschrieben und zusätzlich mit „spill over“ in das periportale Leberparenchym und mäßiggradiger bis schwerer perivenulärer

	Entzündung, die sich in das Leberparenchym erstreckt und mit perivenulären Leberzellnekrosen assoziiert ist
--	---

Die globale Abschätzung des Schweregrades erfolgt im Allgemeinen erst nach der Diagnose: Abstoßung. Die verbale Beschreibung einer milden, mäßigen oder schweren akuten Abstoßung kann auch in Grad I, II, oder III angegeben werden. Der Abstoßungsaktivitätsindex wird durch das Banff Schema für das Grading der Lebertransplantatabstoßung beschrieben und gibt als Gesamtscore die Summe der einzelnen Komponenten an.

Tabelle 4:

Kategorie	Kriterien	Score
Portale Entzündung	Hauptsächlich lymphozytäre Infiltrate, die einige wenige portale Triaden betrifft und diese verbreitert	1
	Expansion der meisten oder aller Triaden durch ein gemischtes Infiltrat das aus Lymphozyten, einigen blastären Zellen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten besteht	2
	Deutliche Expansion der meisten oder aller Triaden durch ein gemischtes Infiltrat mit zahlreichen blastären Zellen und eosinophilen Granulozyten und „spill over“ in das Leberparenchym	3

Gallengangs- entzündung / schaden	Einige wenige interlobuläre Gallengänge sind von Entzündungs- zellen umgeben und infiltriert. Die Epithelzellen zeigen nur geringe reaktive Veränderungen wie erhöhte Kern:Plasma- Relation	1
	Die meisten interlobulären Gallengänge sind von Entzündungs- zellen infiltriert. Einige Gänge zeigen degenerative Veränderungen wie nukleären Pleomorphismus, gestörte Polarität und zytoplasmatische Vakuolisierung des Epithels	2
	Wie für 2 beschrieben, und mit degenerativen Veränderungen der meisten oder aller Gänge oder mit fokaler Unterbrechung des Lumens	3
Venöse endotheliale Entzündung	Subendotheliale lymphozytäre Infiltration betrifft einige, aber nicht die Mehrzahl der portalen oder hepatischen Venolen	1
	Subendotheliale Infiltration betrifft die meisten oder alle portale oder hepatische Venolen	2
	Wie für 2 beschrieben und mit moderater oder schwerer perienulärer Entzündung, die sich in das perivenuläre Parenchym erstreckt und mit perivenulären Leberzellnekrosen assoziiert ist	3

7.4. Nachsorge

Der Großteil der PatientInnen, die an unserem Zentrum lebertransplantiert wurden, wird auch in unserer Ambulanz nachversorgt. Folgende Aufgaben gibt es im Rahmen der Nachsorgeuntersuchungen:

- Überwachung der Leberfunktion
- Ausschluss von Abstoßung oder Infektion
- Prävention von Komplikationen durch Langzeit-Immunsuppression
- Optimierung der Langzeittherapie
- Rechtzeitiges Erkennen und Therapieren von Rezidiven der Grundkrankheit

Im Rahmen der Routinekontrollen werden regelmäßig Blutabnahmen durchgeführt und Medikamentenspiegel bestimmt.

7.5. Methoden zur Genotypbestimmung

Anforderung an die Methode

Von der eingesetzten Methode wird erfordert, dass sie präzise und richtige Daten liefert. Die grundsätzliche Methode (5'-Exonuclease-Methode, "TaqMan") wird seit mehreren Jahren erfolgreich für die Bestimmung verschiedener Genpolymorphismen (z.B. Faktor V Leiden, HFE H63D, HFE C282Y, MTHFR 677C>T, Prothrombin Mutation) eingesetzt. Die Methode hat sich als robust, sicher und bedienungsfreundlich erwiesen und zeichnet sich durch eine äußerst geringe Fehleranfälligkeit aus.

Im Zuge der Evaluierung der PNPLA3 TaqMan-Methode wurde Angaben zu folgenden Punkten erhoben:

- Richtigkeit der Ergebnisse (Messung von Referenzproben)
- Präzision (Vergleich von Mehrfachmessungen der selben Proben, in der Serie, von Tag zu Tag)
- Durchführbarkeit (Probendurchsatz, Zeitaufwand, Bedienungsfreundlichkeit, Fehleranfälligkeit)

Beschreibung der Methode

Die Genotypisierungen erfolgen mittels der oben erwähnten 5'-Exonuclease Methoden("TaqMan"). Eine detaillierte Beschreibung der Methode vom Hersteller wird mit den Reagenzien mitgeliefert [Applied Biosystems, Detailed Assay Information]. Die Amplifikation und Messung der Reaktion erfolgt in einem geschlossenen Gefäß, so dass eine Kontamination des Arbeitsplatzes durch PCR-Produkte praktisch ausgeschlossen ist.

Bei der 5'-Exonuclease Methode entsteht ein PCR-Produkt unter gleichzeitigem Abbau von allel-spezifischen fluoreszenzmarkierten Gensonden verfolgt. Durch den Abbau der Gensonden werden Reporterfarbstoff (FAM oder VIC) und ein Quencherfarbstoff räumlich getrennt, was zu einem allelspezifischen Anstieg der Fluoreszenz führt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt nach der PCR in einem Platten-Fluorometer. Die Zuordnung von Genotypen erfolgt mit Hilfe einer Excel-Vorlage.

Verbrauchsmaterial und Geräte

➤ Assay Mix, Applera Kat. Nr. 4331349

Der Assay-Mix enthält die notwendigen Primer und fluoreszenzmarkierten Sonden. Design und Herstellung von Primern und Sonden erfolgte als 'Assay-by-Design' Service durch die Firma Applera. Der Assay Mix wird als 40x-Konzentrat geliefert. Von diesem Konzentrat werden 10x-Arbeitslösungen hergestellt (50 µl 40x-Assay-Mix + 150 µl H₂O).

```
GGGCTCCACC ATGGGACAGA CCCTGAGGTG CCNGACACCA GTGCCNTGCA
GGCAGGAGAT
GTGTGAGCAC ACTTCAGAGG CCCCAGGAC TCAGCGCTAG CAGAGAAAGC
CGACTTACCA
CGCCTCTGAA GGAAGGAGGG ATAAGGCCAC TGTAGAANGG [G/C]
ATGAAGCAGGAA CATAACCA GGCCTGTGAA AGCAAAGGAG AGAGAAGTTA
NAGGCGAGAG
CACCTTTTA ATTTTCCTGA TCCTTCATAA GCTTTCTCCA AGTGAGCAGG
GCAACAAACT
TGAAAATGCC CTTTGCACAG AGTAGGTAA TCCATGGGTC AAAAGAACNG
GGAACTAACA
```

PNPLA3_F GGAGGGATAAGGCCACTGTAGAA
PNPLA3_R GCTTTCACAGGCCTTGGTATG
PNPLA3_V VIC-TTCCTGCTTCATCCC-NFQ
PNPLA3_M FAM-TTCCTGCTTCATGCC-NFQ

- **Perfecta qPCR -Mix:** VWR, Kat. Nr. 733-1184

Fertiges 2x-Konzentrat. Enthält Polymerase, Reaktionspuffer und dNTPs.

- **Mineralöl:** Mineral Oil for Molecular Biology, Sigma, Kat. Nr. M5904
- **Thermocycler:** Eppendorf Mastercycler
- **Plattenfluorometer:** Wallac VIKTOR

Durchführung

Mastermix für die PCR: 2x Universal-Master-Mix: 10 µl

10x Assay-Mix: 2 µl

H₂O: 6 µl

Von dem Mastermix wurden in 96er-PCR-Plattten jeweils 18 µl vorgelegt und je 2 µl DNA(oder H₂O) zugegeben. Das Gemisch wurde mit je 15 µl Mineralölmineral überschichtet, zugedeckelt und im Thermocycler amplifiziert.

PCR-Programm: 1 min 94°

40 Zyklen (10 sec 94°, 30 sec 60°)

Hold 8°

Die Messung der Fluoreszenz erfolgte im Plattenfluorometer mit Excitation/Emissions Filtern von 485 nm/520 nm (FAM) und 544 nm/590 nm (VIC). Die Auswertung der Rohdaten erfolgte als Streudiagramm mit Hilfe einer Excel-Vorlage. Je nach Genotyp stellen sich die Proben als Gruppe ("cluster") im Diagramm dar.

Evaluierungsplan

- Durchführbarkeit, Eindeutigkeit der Ergebnisse: Bestimmung von zufällig ausgewählten anonymisierten Proben, teilweise in Doppelbestimmung.
- Überprüfung von Referenzproben mittels Sequenzierung. Von jeder Referenzprobe

wurde eine ausreichende Menge an EDTA-Blut eingefroren, so dass die Verfügbarkeit der Referenzproben für mehrere Jahre gesichert ist.

PNPLA3 II WR

PNPLA3 IM 110754

PNPLA3 MM 110761

- Wiederholbarkeit/Präzision, Intra-Assay-Variation: 4-fach Bestimmung von je 3 Proben.
- Wiederholbarkeit/Präzision, Inter-Assay-Variation: Wiederholung des Versuches des vorigen Punktes an einem Tag
- "In-silico" Überprüfung der Bindestellen von Primern und Sonden (Vergleich mit Sequenzen in Datenbanken)

Ergebnisse der Evaluierung

➤ Durchführbarkeit, Eindeutigkeit der Ergebnisse:

Jede Probe konnte einem eindeutigen Cluster zugewiesen werden. Bei den Doppelbestimmungen gab es keine Abweichungen.

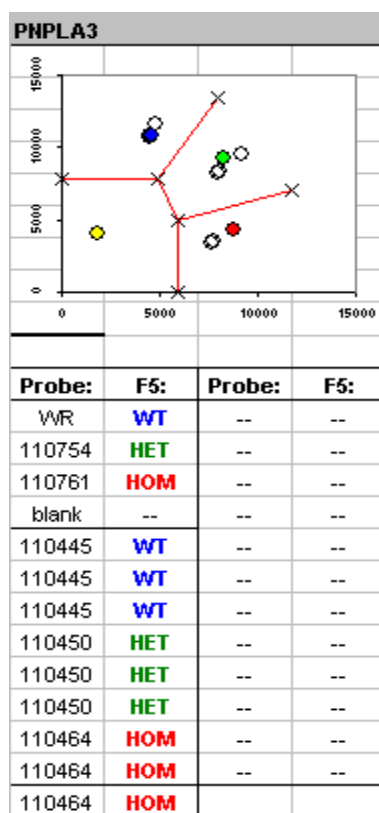
➤ Verifizierung von Referenzproben

Für alle Referenzproben konnte der Genotyp mittels Sequenzierung eindeutig bestimmt werden. In keiner der Referenzproben gab es neben dem I148M Polymorphismus andere Sequenzvariationen.

Ergebnis Wiederholbarkeit/Präzision, Intra-Assay

Keine Intra-Assay Variationen.

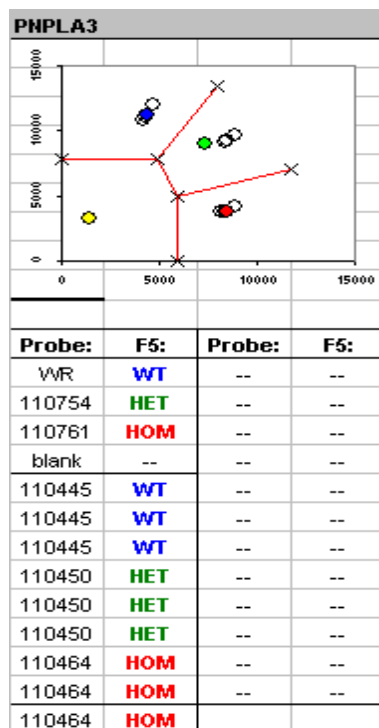
Abbildung 11:



Ergebnis Wiederholbarkeit/Präzision II, Inter-Assay

Keine Intra-Assay oder Inter-Assay Variationen

Abbildung 12:



"In-silico" Überprüfung der Bindestellen von Primern und Sonden (Vergleich mit Sequenzen in Datenbanken)

Für die "In-silico" Überprüfungen wurden die NCBI SNP-Datenbank und die NCBI NucleotideDatenbank herangezogen. Sequenzvergleiche wurden mittels BLAST durchgeführt. Im Bereich der Primer und Sonden gibt es zwei Polymorphismen (mit N gekennzeichnet). Diese wurden beim Assaydesign berücksichtigt und betreffen keine Primer- oder Sondenbindestellen:

CGCCTCTGAA GGAAGGAGGG ATAAGGCCAC TGTAGAANGG [G/C]

ATGAAGCAGGAA CATAACCA GGCCTGTGAA AGCAAAGGAG AGAGAAGTTA
NAGGCGAGAG

Homologe Sequenzen oder Pseudogene, die die Reaktion stören könnten, wurden nicht gefunden.

Zusammenfassung und Risikobewertung

Im Rahmen der Evaluierungsstudie wurden alle Proben eindeutig und korrekt bestimmt. Es gab keine Ausfälle oder unklare Cluster-Positionen, was für die Stabilität der Methode spricht. Bei den Serienbestimmungen gab es keine Abweichungen der Genotypen. Bei Einhaltung der entsprechenden Arbeitsvorschrift ist die Methode zur Bestimmung von TPNPLA3 Genotypen geeignet.

Risiken für den Anwender:

Die TaqMan-Methode wird seit etwa 7 Jahren erfolgreich eingesetzt, in diesem Zeitraum wurden damit mehr als 5.000 Routine-Bestimmungen und mehr als 500.000 Forschungs-Bestimmungen durchgeführt. Bisher gab es keinen einzigen Schadensfall für Anwender, ein Anwender-Risiko kann daher als unwahrscheinlich eingestuft werden.

PatientInnen-Risiken:

Im langjährigen Einsatz der TaqMan-Methode hat sich gezeigt, dass bei richtiger Durchführung falsche Ergebnisse äußerst unwahrscheinlich sind. Die permanente Kontrolle durch Mitführung von Referenzproben mit bekanntem Genotyp sowie einer negativen Kontrollprobe erlaubt eine sofortige Erkennung von allfälligen Störungen durch defekte Geräte oder Reagenzien.

In einzelnen Fällen besteht die Möglichkeit, dass kein Ergebnis möglich ist oder ein Ergebnis erst verspätet bekannt gegeben werden kann. Mögliche Ursachen dafür wären Geräte-Ausfälle oder falsches Probenmaterial. Da das PNPLA3 Ergebnis eine Bedeutung vor allem für eine langfristige Risiko-Abschätzung hat, ist das zu erwartende PatientInnen-Risiko durch verspätete Befunde als gering einzustufen.

Umweltrisiken:

Für die Methode werden keine giftigen oder umweltschädlichen Stoffe eingesetzt, die Umweltrisiken sind daher als gering einzustufen.

7.6. Statistik

Der Chi-Quadrat- Test wird verwendet, um zu bestimmen, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen den erwarteten Frequenzen und der zu beobachteten Frequenzen in einer oder mehreren Kategorien gibt. Die Chi Quadrat Tests beinhalten eine Gruppe von Hypothesentests mit χ^2 -verteilter Testprüfgröße. Er ist immer noch der meist angewandte Test in der mathematischen Statistik. Dieser von Karl Pearson (47) beschriebene Test umfasst vor allem

- Verteilungstest
- Unabhängigkeitstest
- Homogenitätstest
- Vierfeldertest

Um zu bestimmen, ob es signifikante Unterschiede in den PNPLA3 Genotypfrequenzen zwischen Spenderleber und Empfängerleber gibt, wurde der Chi Quadrat Test angewendet.

8. Ergebnisse

Im Rahmen unserer Studie wurde bei 147 LeberempfängerInnen und bei 56 dazugehörigen SpenderInnen der PNPLA3 Genotyp bestimmt.

EmpfängerInnen:

Das Alter der EmpfängerInnen war 54 +/- 9 Jahre (Bereich 22 - 71 Jahre). Es wurden 108 (73,5%) Männer und 39 (26,5%) Frauen inkludiert. Die Indikationen zur Lebertransplantation waren in diesem Patientenkollektiv wie folgt:

- Hepatitis B/C 20,7%
- Alkoholische Zirrhose 38,5%
- Hepatozelluläres Karzinom 25,1%
- Primär biliäre Zirrhose 3,7%
- Alpha-1-Antitrypsinmangel 4,4%
- Zystenleber 2,9%
- Morbus Wilson 1,4%
- Andere 2,9%

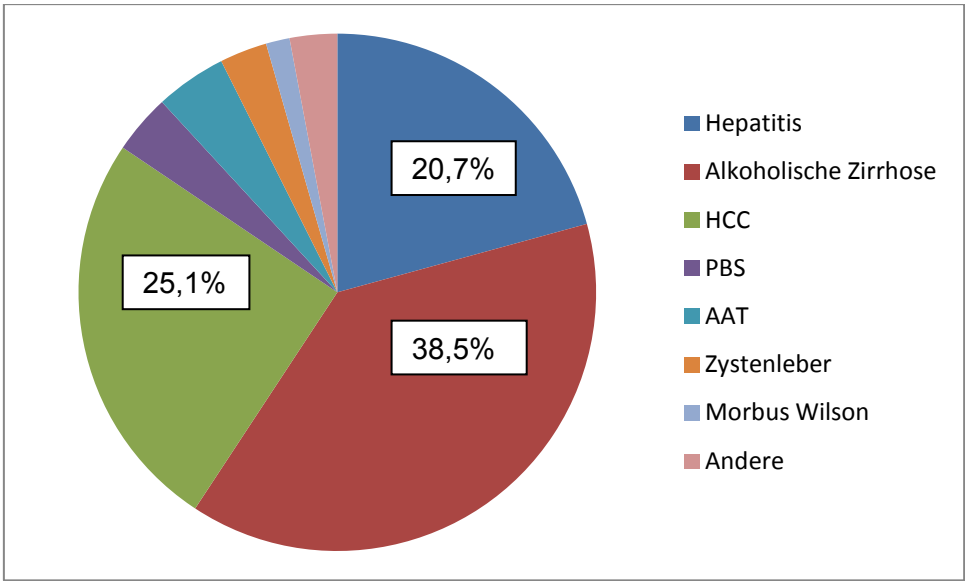
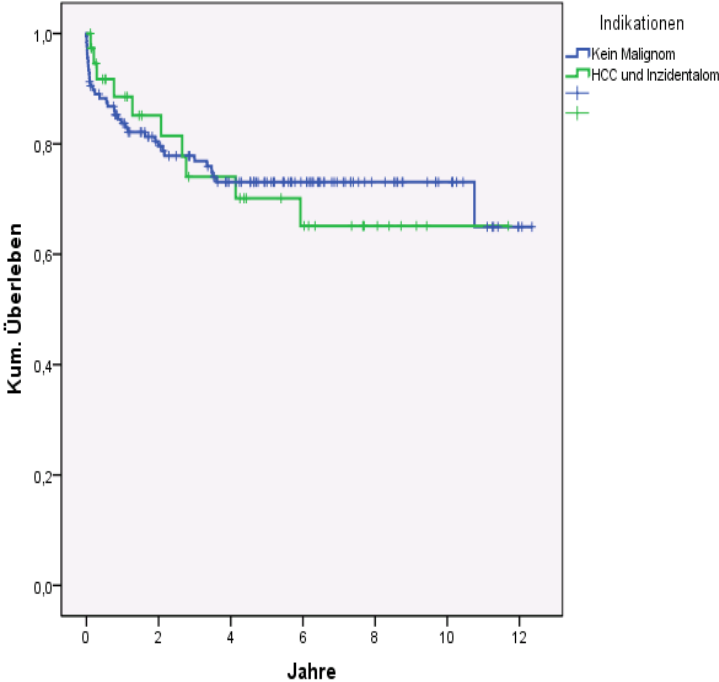


Abbildung 13: Darstellung der Verteilung der Indikationen zur Lebertransplantation.

Überleben nach Lebertransplantation:

Die Ergebnisse der Lebertransplantation unseres Zentrums sind in der folgenden Abbildung dargestellt:



Ergebnisse unserer Studie:

Verteilung der PNPLA3 Genotypen der EmpfängerInnen:

II: 51 (36,7%)

IM: 60 (43,2%)

MM: 28 (20,1%)

SpenderInnen:

Alter und Geschlecht der SpenderInnen waren nicht verfügbar, da diese anonymisiert sind.

Verteilung der PNPLA3 Genotypen:

II: 36 (64,3%)

IM: 14 (25,0%)

MM: 6 (10,7%)

Unterschied der PNPLA3-Genotypen zwischen EmpfängerInnen und SpenderInnen:

Der Unterschied des Genotyps zwischen EmpfängerInnen und SpenderInnen war signifikant mit einem p-Wert von 0,002.

Das heißt, dass in der Empfängerpopulation der Genotyp, der die Entwicklung einer Steatose bzw. Fibrose begünstigt, wesentlich höher war, als in der lebergesunden Spenderpopulation.

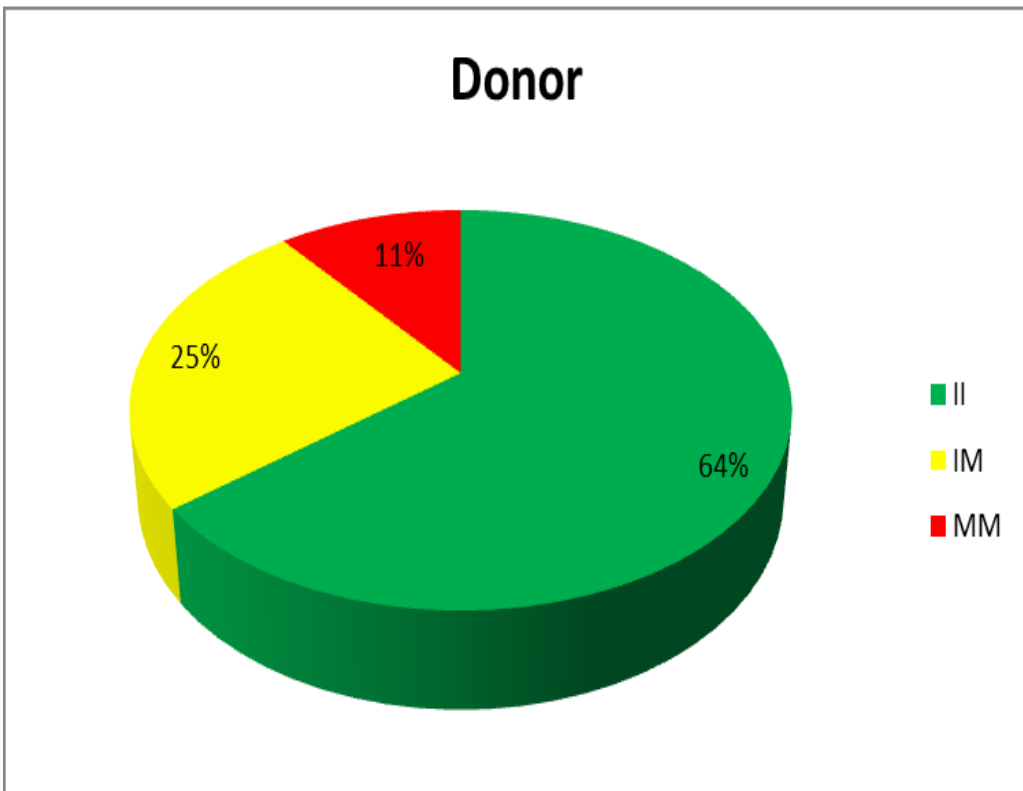
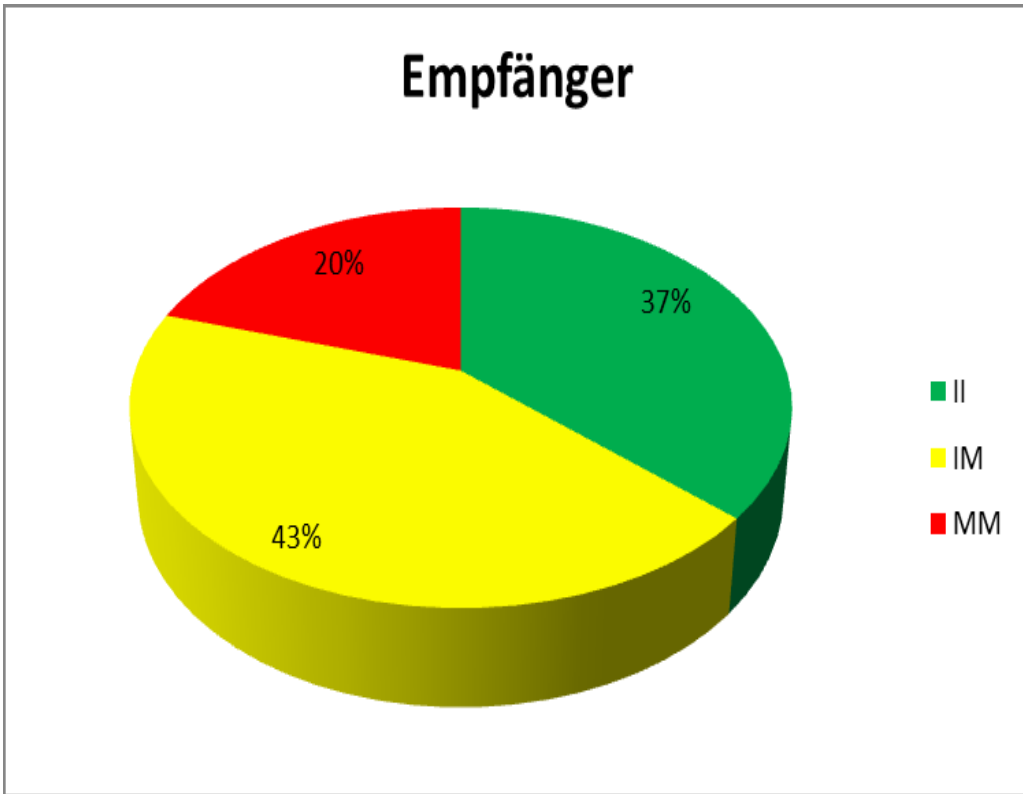


Abbildung 14 und 15: Graphische Darstellung der Genotypverteilung bei SpenderInnen und EmpfängerInnen

9. Diskussion

Die Ergebnisse unserer Studie zeigten, dass bei PatientInnen, die eine LTX benötigten, der ungünstige PNPLA3 Genotyp deutlich häufiger vorkam, als in der Vergleichsgruppe der SpenderInnen, welche eine gesunde Leber hatten. Dies bestätigt die Annahme, dass der PNPLA3 Genotyp eine wichtige Rolle für den Verlauf einer Lebererkrankung spielt, wie dies bisher auch schon mehrmals aufgezeigt werden konnte.

Bisher gibt es noch wenige Daten über den Einfluss des PNPLA3 Genotyps im Rahmen einer Lebertransplantation und die bisherigen Studienergebnisse sind teilweise kontrovers. Da PNPLA3 vorwiegend in der Leber exprimiert wird, stellt sich die Frage, welchen Einfluss der Genotyp des Spenders auf den weiteren Verlauf nach LTX hat. Vereinzelte Studien, die sich mit dieser Fragestellung auseinandergesetzt haben, konnten noch keine ausreichend klaren Ergebnisse erlangen. Dunn et al (22) konnte einen Zusammenhang zwischen dem Spendergenotyp und den Verlauf nach LTX bei PatientInnen mit HCV-Infektion nachweisen. Bei PatientInnen, die nicht aufgrund einer Hepatitis C transplantiert wurden, konnte dies aber nicht gezeigt werden. Eine Studie (48), welche im April 2016 publiziert wurde, konnte jedoch keinen Zusammenhang zwischen dem Spender PNPLA3-Genotyp und einem schlechteren Outcome nach LTX nachweisen. In einer anderen Studie (49) konnte gezeigt werden, dass der PNPLA3 Genotyp bei nutritiv toxischer Leberzirrhose einen Einfluss auf die Entwicklung eines HCC sowie des Verlaufs hatte. Finkenstedt et al (50) beschrieb, dass Leberempfänger, die das rs738409-G des PNPLA3 Genotyps trugen, nach Lebertransplantation ein erhöhtes Risiko für eine hepatische Triglyzerid Akkumulation hatten, völlig unabhängig vom Spender-PNPLA3 Genotyp.

Die Bestimmung des PNPLA3 Genotyps des Spenders könnte eine Rolle für die Entstehung eines NAFLD nach Lebertransplantation spielen. Es konnte gezeigt werden, dass der PNPLA3 Genotyp einen Einfluss auf die Entstehung bei PatientInnen ohne LTX hat, aber dass ein Einfluss des Spendergenotyps auf den Verlauf nach LTX auch besteht. Bei erhöhtem Risiko und ungünstigem Genotyp für die Entwicklung eines NAFLDs stellt sich die Frage, ob eine frühzeitige Kontrolle von Körpergewicht und Ernährung einen positiven Einfluss auf den Verlauf haben könnte (51). Auch die Verwendung der

Immunsuppressiva könnte danach adaptiert werden. Eine Reduktion von Medikamenten, welche einen negativen Effekt auf den Metabolismus haben, könnten bei diesen PatientInnen bewusst vermieden werden. Mit einem multimodalen Konzept könnte der Langzeitverlauf dieser PatientInnen nach LTX eventuell verbessert werden (52).

Da aufgrund des Spender- und Organmangels vermehrt auch Organe mit Steatose akzeptiert werden, könnte die Bestimmung des PNPLA3 Genotyps eine zusätzliche, wichtige Information liefern, inwieweit ein Spenderorgan möglicherweise transplantabel ist oder nicht (53).

Weiterführende Studien:

Nach der Genotypisierung von SpenderInnen und EmpfängerInnen, welche im Rahmen dieser Diplomarbeit durchgeführt und beschrieben wurde, ist als nächster Schritt unserer Studie, der im Anschluss durchgeführt wird, die Zuordnung von Spender – und Empfänger-PNPLA3-Genotyp geplant. Die gematchten Paare werden dann mit klinischen Daten (Verlauf nach LTX hinsichtlich Steatose, Fibrose, Überlebensrate, Komplikationen, Rezidiv der Grunderkrankung) verglichen. Sollte sich hier ein Einfluss des Spendergenotyps auf den Verlauf nach LTX zeigen, stellt sich die Frage, ob eine Genotypisierung von Empfänger und Spender vor der LTX möglich und sinnvoll ist und ob es Konsequenzen für therapeutische Interventionen geben könnte.

10. Literaturverzeichnis

1. Wilson PA, Gardner SD, Lambie NM et al. Characterization of the human patatin-like phospholipase family. *J Lipid Res* 47 (9):1940-9
2. Kienesberger PC, Oberer M, Lass A et al. Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. *J Lipid Res* 50 Suppl: 63-8
3. Rydel TJ, Williams JM, Krieger E et al. The crystal structure, mutagenesis and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a Ser-Asp catalytic dyad. *Biochemistry* 2003 Jun 10;42(22):6696-708
4. Dunham I, Shimizu N, Roe BA et al. The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature* 1999;402 (6761):489-95
5. Liu YM, Modes M, Bastard JP et al. Adiponutrin: A new gene regulated by energy balance in human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89(6):2684-9
6. Berger C, Luda C, Berg T et al. PNPLA3 (rs738409) 148M/M Homozygotität: ein genetischer Risikofaktor für hepatozelluläre Karzinome bei äthyltoxischer, jedoch nicht bei HCV-assoziiierter Leberzirrhose. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 2016, Abstract
7. Dongiovanni P, Donati B, Fares R et al. PNPLA3 I148M polymorphism and progressive liver disease. *World J Gastroenterol* Nov 7, 2013; 19(41):6969-6978
8. Huang Y, Cohen JC, Hobbs HH et al. Expression and characterization of a PNPLA3 protein isoform (I148M) associated with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of biological chemistry* Oct 28, 2011 ;286(43):37085-93.
9. Salameh H, Raff E, Erwin A et al. PNPLA3 gene polymorphism is associated with predisposition to and severity of alcoholic liver disease. *Am J Gastroenterol* 2015 Jun;110(6):846-56.
10. Ali M, Yopp A, Gopal P et al. A Variant in PNPLA3 Associated with Fibrosis Progression but not Hepatocellular Carcinoma in Patients with Hep.C Virus Infection. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015 Aug 21; pii: S1542-3565(15)01123-4.
11. Speliotes EK, Yerges-Armstrong LM, Wu J, et al. Genom-wide association analysis identifies variants associated with non-alcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits. *PLoS Genet.* 2011 Mar; 7(3): e1001324

12. School of Medicine, University of Dundee, Medical Research Institute et al. Systematic review of genetic association studies involving histologically confirmed non-alcoholic fatty liver disease. *BMJ Open Gastroenterol.* 2015 Feb 17, 2(1)
13. Dongiovanni P, Romeo S, Valenti L. Genetic Factors in the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver and Steatohepatitis. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 460190.
14. Ali M, Yopp A, Gopal P et al. A Variant in PNPLA3 Associated with Fibrosis Progression but not Hepatocellular Carcinoma in Patients with Hep.C Virus Infection. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015 Aug 21; pii: S1542-3565(15)01123-4.
15. Yasui K, Kawaguchi T, Shima T et al. Effect of PNPLA3 rs 738409 variant (I148M) on hepatic steatosis, necroinflammation, and fibrosis in Japanese patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol.* 2015 Aug; 50(8): 887-93.
16. De Nicola S, Dongiovanni P, Aghemo A et al. Interaction between PNPLA3I148M variant and age at infection in determining fibrosis progression in chronic Hep.C. *PLoS One*, 2014 Aug 29; 9(8): e 106022.
17. Pan Q, Zhang RN, Wang YQ et al. Linked PNPLA3 polymorphisms confer susceptibility to non-alcoholic steatohepatitis and decreased viral load in chronic Hep.B. *World J Gastroenterol.* 2015 Jul 28 ; 21(28): 8605-14.
18. Zampino R, Coppola N, Cirillo G et al. Patatin like Phospholipase Domain-Containing 3 I148 M Variant is Associated with Liver Steatosis and Fat Distribution in Chronic Hep.B. *Dig Dis Sci.* 2015 Oct; 60(10): 3005-10.
19. Mangge H, Baumgartner BG, Zelzer S et al. Patatin-like phospholipase 3 (rs738409) gene polymorphism is associated with increased liver enzymes in obese adolescents and metabolic syndrome in all ages. *Aliment pharmacol Ther*, 2015 Jul; 42(1): 99-105.
20. Valenti L, Dongiovanni P, Ginanni Corradini S et al. PNPLA3 I148M variant and hepatocellular carcinoma: a common genetic variant for a rare disease. *Dig Liver Dis*, 2013 Aug; 45(8): 619-24.
21. Valenti L, Motta BM, Soardo G et al. PNPLA3 I148M polymorphism, clinical presentation, and survival in patients with hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 2013 Oct 14; 8(10): e 75982.
22. Dunn W, O'Neil M, Zhao J et al. Donor PNPLA3 rs 738409 genotype affects fibrosis progression in liver transplantation for Hep.C. *Hepatology*, 2014 Feb; 59(2): 453-60.

23. Karlas T, Kollmeier J, Böhm S et al. Noninvasive characterization of graft steatosis after liver transplantation. *Scand J Gastroenterol.* 2015 Feb; 50(2): 224-32.
24. Friedrich K, Rupp C, Hov JR et al. A frequent PNPLA3 variant is a sex specific disease modifier in PSC patients with bile duct stenosis. *PLoS One*, 2013; 8(3): e 58734.
25. Starzl TE, Marchioro TL, von Kaulla KN, Hermann G, Brittain RS, Waddell WR. Homotransplantation of the liver in humans. *Surg Gynecol Obstet*;1963, 117:559-576
26. Consensus Conference on indications of liver transplantation. *Hepatology*; 1994;20:63-68
27. Carithers RL Jr. Liver transplantation. *Liver transplantation* 2000;6:122-135
28. Bismuth H, Samuel D, Gugenheim J, Castaing D, Bernuau J, Rueff B, Benhamou JP. Emergency liver transplantation for fulminant hepatitis. *Ann Intern Med*; 1987;107:337-341
29. Bernal W, Donaldson N, Wyncoll D, Wendon J. Blood lactate as an early predictor of outcome in paracetamol-induced acute liver failure: a cohort study. *Lancet*;2002;359:558-563
30. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreole S, Pulvirenti A, Bozzetti F, Montalto F. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med*; 1996;334:693-699
31. Chung H, Chapman WC. Liver transplantation for metastatic neuroendocrine tumors. *Adv Surg*;2014;48:235-52
32. Child CG, Turcotte JG. Surgery and portal hypertension. In: C. G. Child (Hrsg.): *The liver and portal hypertension*. Saunders, Philadelphia 1964, S. 50–64.
33. Wiesner R, Edwards E, Freeman R et al. and the United Network for Organ Sharing Liver Disease Severity Score Committee: The model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology* 2003; 124: 91–96.
34. Murray KF, Carithers RL jr. AASLD Practice Guidelines: Evaluation of the patient for liver transplantation. *Hepatology*;2005;41(6):1407-1432
35. Kremer B. Standard techniques in orthotopic liver transplantation. In: *Atlas of liver, pancreas and kidney transplantation*, Kremer B, Broelsch, Henne-Bruns D, Thieme Verlag, Stuttgart, New York: 36-53

36. Casillas-Ramírez A, Mosbah IB, Ramalho F, Roselló-Catafau J, Peralta C. Past and future approaches to ischemia-reperfusion lesion associated with liver transplantation. *Life Sci.* 2006 Oct 12;79(20):1881-94
37. Neuhaus P, Blumhardt G, Bechstein WO, Steffen R, Platz KP, Keck H. Technique and results of biliary reconstruction using side-to-side choledochocholedochostomy in 300 orthotopic liver transplants. *Ann Surg*;1994;219:426-434
38. Bechstein WO, Neuhaus P. Bleeding problems in liver surgery and liver transplantation. *Chirurg* 2000;71(4):363-368
39. Sanchez-Bueno F, Robles R, Ramirez P, Acosta F, Rodriguez JM, Lujan J, Pons JA, aguilar J, Parrilla P. Hepatic artery complications after liver transplantation. *Clin Transplant* 1994;8:399-404
40. Platz KP, Mueller AR, Rossaint R, Steinmüller T, Lemmens HP, Lobeck H, Neuhaus P. Cytokine pattern during rejection and infection after liver transplantation: improvements in postoperative monitoring? *Transplantation* 1996;62:1441-1450
41. Losada I, Cuervas-Mons V, Millan I, Damaso D. Early infection in liver transplant recipients: incidence, severity, risk factors and antibiotic sensitivity of bacterial isolates. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002;20(9):422-430
42. Seehofer D, Rayes N, Steinmuller T, Muller AR, Settmacher U, Neuhaus R, Radke C, Berg T, Hopf U, Neuhaus P. Occurrence and clinical outcome of lamivudine-resistant hepatitis B infection after liver transplantation. *Liver Transpl* 2001;7(11):976-982
43. Munoz SJ, Rothstein KD, Reich D, Manzarbeitia C. Long-term care of the liver transplant recipient. *Clin Liver Dis* 2000;4(3):691-710
44. Bonk M, Sendtko A, Genaust H et al. *Lexikon der Biologie.* 1999 Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
45. Böcker W, Denk H, Heitz P. *Pathologie.* 3.Aufl. München: Elsevier; 2004.S.1180-81.
46. M. Burdleski, P. Neuhaus(Hrsg.). *Tacrolimus – Eine neue Standardtherapie in der Lebertransplantation.* Lengerich; Berlin; Düsseldorf; Leipzig; Ria; Skottsedale (USA); Wien; Zagreb: Pabst; 1998.S.76-90.
47. Karl Pearson: On the criterion that a given system of derivations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. In: *The London, Edinburgh, and*

- Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science. 50, Nr. 5, 1900, S. 157–175.
48. Mueller JL, King LY, Johnson KB et al. Impact of EGF, IL28B, and PNPLA3 polymorphisms on the outcome of allograft hepatitis C: a multicenter study. *Clin Transplant* 2016 Apr;30(4):452-60
 49. Friedrich K, Wannhoff A, Kattner S et al. PNPLA3 in end-stage liver disease: alcohol consumption, hepatocellular carcinoma development, and transplantation-free survival. *J Gastroenterol Hepatol* 2014;29(7):1477-84
 50. Finkenstedt A, Auer C, Glodny B et al. Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 rs738409-G in recipients of liver transplants is a risk factor for graft steatosis. *Clin Gastroenterol Hep* 2013, 12:1667-1672
 51. Liu ZT¹, Chen TC¹, Lu XX¹ et al. PNPLA3 I148M variant affects non-alcoholic fatty liver disease in liver transplant recipients. *World J Gastroenterol*. 2015 Sep 14;21(34):10054-6.
 52. Watt KD¹, Dierkhising R, Fan C et al. Investigation of PNPLA3 and IL28B genotypes on diabetes and obesity after liver transplantation: insight into mechanisms of disease. *Am J Transplant*. 2013 Sep;13(9):2450-7.
 53. Geng N, Xin YN, Xia HH et al. Association of PNPLA3 I148M Variant With Chronic Viral Hepatitis, Autoimmune Liver Diseases and Outcomes of Liver Transplantation. *Hepat Mon*. 2015 Apr 25;15(4):e26459.

11. Anhang

11.1. Projektplan

Projektplan					
Diplomandin Vanni Martini Claudia					Meilensteine
Betreuerin PD Kniepeiß Daniela					
Projektstart 18.06.2015					
Heute 28..04.2016					
Aufgabe			Start	Ende	
P	Projektablaufplanung Gesamtprojekt		18.06.2015	28..04.2016	
P 1	Einreichen des Konzeptformulars		18.06.2015		
P 2	Einreichen des Ethikvotums		18.06.2015	09.07.2015	Meilenstein
P 3	Literaturrecherche		18.06.2015	14.12.2015	
P4	Rekrutierung der PatientenInnen		18.06.2015	31.12.2015	
P5	Genotypisierung		09.07.2015	01.04.2016	Meilenstein
P6	Auswertung		01.01.2016	29.02.2016	Meilenstein