

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Abteilung für Nephrologie
Direktor: Prof. Dr. med. L. C. Rump

**Untersuchung von Interleukin-10, Tumornekrosefaktor- α
und Interleukin-6 Genpolymorphismen und deren
Auswirkungen auf den Langzeitverlauf von
Nierentransplantaten**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Bärbel Kohlhase
2009

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referentin: Ivens

Korreferent: Rump

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung S. 1-4

- 1.1 Die Rolle von Zytokinen und ihrer Genpolymorphismen bei der Nierentransplantation
 - 1.1.1 Interleukin-10
 - 1.1.2 Tumornekrosefaktor- α
 - 1.1.3 Interleukin-6
- 1.2 Fragestellung und Zielsetzung

2 Patienten und Methoden S. 5-16

- 2.1 Studiendesign
- 2.2 Patienten
- 2.3 Kontrollgruppe
- 2.4 Laborbestimmungen
 - 2.4.1 Laborbestimmungen allgemein
 - 2.4.2 Materialgewinnung
 - 2.4.3 DNA-Präparation
 - 2.4.4 Genpolymorphismen
 - 2.4.5 Qualitätssicherung
- 2.5 Immunsuppressive Therapie nach Nierentransplantation
- 2.6 Eurotransplant-Senior-Programm
- 2.7 Kalt- und Warmischämiezeit
- 2.8 Statistik
- 2.9 Ethische Aspekte und Datenschutz

3 Ergebnisse S. 17-42

- 3.1 Allgemeine Patientendaten
 - 3.1.1 Nierengrunderkrankung und Dialysepflichtigkeit
 - 3.1.2 Transplantationsdaten
- 3.2 Patienten-Verlaufsdaten
 - 3.2.1 Transplantatfunktion im Verlauf
 - 3.2.2 Rejektionen
 - 3.2.3 Patientenüberleben

- 3.3 Allgemeine Spenderdaten
 - 3.3.1 Leichennierenspende
 - 3.3.2 Lebendnierenspende

- 3.4 Immunsuppressive Therapie
 - 3.4.1 Verteilung der Immunsuppressiven Medikation auf das Patientengut
 - 3.4.2 Einfluss der Immunsuppression auf den Langzeitverlauf nach Nierentransplantation am Beispiel der Serumkreatininspiegel

- 3.5 Einfluss der Genpolymorphismen nach Nierentransplantation
 - 3.5.1 Interleukin-10 –1082G/A Genpolymorphismus
 - 3.5.2 Tumornekrosefaktor- α –308G/A Genpolymorphismus
 - 3.5.3 Interleukin-6 –174G/C Genpolymorphismus
 - 3.5.4 Vergleich der Genotypen unter Zusatzbedingungen

4 Diskussion S. 43-51

- 4.1 Funktion der untersuchten Zytokine in der Transplantationsmedizin
 - 4.1.1 Interleukin-10
 - 4.1.2 Tumornekrosefaktor- α
 - 4.1.3 Interleukin-6

- 4.2 Zytokin-Genpolymorphismen und ihr Einfluss auf den Verlauf nach Nierentransplantation
 - 4.2.1 Akute Abstoßungsreaktionen
 - 4.2.2 Einfluss auf das Langzeitüberleben
 - 4.2.3 HLA-DR mismatch

- 4.3 Interpretation der Ergebnisse

- 4.4 Schlussfolgerung

5 Zusammenfassung S. 52-53

6 Literatur S. 54-59

7 Anhang S. 60-61

- 7.1 Danksagung
- 7.2 Lebenslauf

Abkürzungen

ATG	=	Antithymocytenglobulin
CD	=	cluster of differentiation, Erkennungsmolekül an der Oberfläche von T- Lymphozyten
CD4+/CD8+	=	Zytotoxische T-Zellen mit einem CD4 bzw. CD8 Oberflächenprotein
CRP	=	C-reaktives Protein
CsA	=	Cyclosporin A
CSIF	=	Cytokine synthesis inhibition factor = Interleukin 10
dATP	=	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	=	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	=	Desoxyguanintriphosphat
DNA	=	Deoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
dNTP	=	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	=	Desoxythymintriphosphat
ECC	=	endogene Kreatinin-Clearance
ESP	=	Eurotransplant-Seniorprogramm
H ₂ O DEPC	=	mit Diethylprocarbonat behandeltes H ₂ O
HLA	=	human leucocyte antigen
g	=	Erdbeschleunigung = 9,81 m/s ²
ICAM1	=	interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
IDDM	=	insulin dependent diabetes mellitus insulinabhängiger Diabetes mellitus
IHWG	=	International histocompatibility working group
IL	=	Interleukin
IL-1ra	=	Interleukin-1 Rezeptorantagonistenprotein
ICAM	=	Interzelluläre Adhäsionsmoleküle
kB	=	Kilobasen
kDa	=	Kilodalton
KHK	=	Koronare Herzkrankheit
MHC	=	major histocompatibility complex
MMF	=	Mycophenolatmofetil
NK-Zellen	=	natural killer cells
NIDDM	=	non insulin dependent diabetes mellitus nicht insulinabhängiger Diabetes mellitus
PAVK	=	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBMC	=	peripheral blood mononuclear cells
PCR	=	Polymerasekettenreaktion
PTCA	=	Perkutane Transluminale Coronar Angioplastie
rpm	=	revolutions per minute = Umdrehungen pro Minute
T-Zellen	=	T-Lymphozyten, <u>T</u> hymus-abhängig
Th-Zellen	=	T-Helferzellen
TIA	=	Transitorische Ischämische Attacke
TNF	=	Tumornekrosefaktor
UNOS	=	United Network for Organ Sharing

1 Einleitung

Die Transplantation von Nierenspenden ist eine etablierte Methode zur Behandlung von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz. Im Jahre 2006 wurden in Deutschland bei 8473 Patienten, die auf ein neues Organ warteten, 2254 Leichennierentransplantationen und 522 Lebendnierentransplantationen durchgeführt.¹²⁵ Auf dem Gebiet der Nierentransplantation konnten in den letzten Jahren immer bessere Ergebnisse in Bezug auf die Anzahl der Rejektionen und das Ein-Jahres-Transplantatüberleben erzielt werden. Dies hängt unter anderem mit der verbesserten immunsuppressiven medikamentösen Therapie und der besseren Überwachung des Nierentransplantatempfängers zusammen.^{35, 97} Ähnliche Erfolge konnten aber noch nicht in Bezug auf den Langzeiterhalt der Nierentransplantate erzielt werden.^{37, 78, 123} Die Fünfjahresüberlebensrate bei Leichennierenspenden liegt bei 71%¹²⁵, eine andere Studie spricht von 88% bei Leichen- und Lebendnierenspenden⁶¹. Es bleibt unklar, warum Patienten mit der gleichen HLA-Kompatibilität (HLA = human leuocyte antigen) und der gleichen immunsuppressiven Therapie eine unterschiedliche Anzahl von Rejektionen und zeitlich unterschiedliche Transplantatverluste erleben.^{89, 98} Wie wichtig die Vermeidung von Rejektionen ist, zeigt eine Studie von Hariharan et al, die signifikante Unterschiede in Bezug auf die erwartete Überlebenswahrscheinlichkeit eines Leichennierentransplantates ohne Abstoßungsreaktion von 17,9 Jahren und mit Abstoßungsreaktion von 8,8 Jahren ermittelte.³⁷

Die Rolle der immunregulatorischen Moleküle bei der Transplantation wurde schon weit erforscht. Beispiele sind die Untersuchung des Einflusses von Zytokinen und anderen Faktoren im Transplantationsgeschehen^{56, 77, 91, 94, 105} oder die Erforschung der Genexpression in Abstoßungstransplantaten gegenüber der in nicht abgestoßenen Transplantaten⁴. Dagegen sind die Einflüsse der Polymorphismen der zytokinassoziierten Gene und die damit verbundene unterschiedliche Expression der Zytokine in Bezug auf den Langzeitverlauf nach Nierentransplantation noch weitgehend unklar. Es gibt wenige Studien zu dieser Fragestellung.^{34, 63, 101} Die meisten Autoren haben sich allein auf die akute Abstoßungsrate und nicht auf das Langzeitüberleben der Nierentransplantate konzentriert und zeigen teilweise widersprüchliche Resultate. So konnten in einigen Studien Wechselwirkungen aufgezeigt werden^{7, 76, 83, 88}, andere Untersuchungen haben keinen Zusammenhang feststellen können^{7, 34, 58, 65, 90, 95, 121}. Die Studien basierten meistens auf kleinen Patientengruppen.

1.1 Die Rolle von Zytokinen und ihrer Genpolymorphismen bei der Nierentransplantation

Das Immunsystem wird durch eine Reihe von Zytokinen reguliert, die die Zellaktivierung, –differenzierung und –funktion beeinflussen. Zytokine werden durch eine Vielzahl von Zellen, darunter Lymphozyten, antigenpräsentierende Zellen, Parenchymzellen und verschiedene Zellarten der Niere gebildet. Der genaue Mechanismus, der die Zytokinexpression reguliert, ist noch in Erforschung. Es scheint, dass verschiedene Zellen auf gleiche Stimulierung unterschiedlich reagieren und dass ihre Antwort abhängig vom Zelltyp und der unmittelbaren Umgebung ist.¹³ Mehrere Studien haben nachweisen können, dass die Anzahl der Zytokine, die auf einen definierten Reiz hin gebildet werden, durch Genregulierung bestimmt wird.^{27, 32, 54, 98, 112} In den letzten Jahren haben Genstudien Polymorphismen in Promoterregionen von Genen des Menschen aufgedeckt, die Schlüsselzytokine mit Einfluss auf die Zytokinproduktion kodieren.^{17, 27, 51} Drei dieser Genpolymorphismen wurden in der vorliegenden Studie untersucht.

1.1.1 Interleukin-10

Interleukin-10 (IL-10) gilt als pleiotropes Zytokin, das weitreichende immunmodulatorische Eigenschaften aufweist. IL-10 bremst im gesunden Körper Abwehrreaktionen. Produziert wird es von T_H2-Helferzellen, aktivierten Monozyten und Mastzellen. Anfangs als „cytokinsynthese-inhibition-factor“ (CSIF) bezeichnet, wurde IL-10 später als Produkt von Th2-Zellen charakterisiert, das die Bildung von Interferon- γ , IL-2, IL-3 und TNF- β durch Th1-Zellen einschränkt.^{26, 48} Ferner hemmt es die pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-8.^{20, 24} IL-10 vermindert die Oberflächen-Expression von MHC Klasse II Molekülen auf einer Vielzahl von antigenpräsentierenden Zellen.^{17, 20} All dies führt zu einer verminderten Antigen-induzierten T-Zellproliferation der CD4+ T-Zellen. IL-10 ist ein Protein von 160 Aminosäuren Länge. Die Menge an IL-10, die auf einen bestimmten Reiz hin freigesetzt wird, ist genetisch festgelegt.

Das IL-10-Gen liegt auf dem Chromosom 1. Es wurden bisher drei Punktmutationen des IL-10-Gens erforscht. Sie liegen auf den Positionen –1082G/A, –819C/T und –592C/A.¹⁰⁸ Die Punktmutation auf Position –1082 des IL-10 Gens beinhaltet eine Substitution von Guanin durch Adenosin. Sie konnte in Zusammenhang mit einer niedrigeren IL-10 Produktion in vitro¹⁰⁸ und in vivo^{60, 102} gebracht werden. Der IL-10 –1082 Genpolymorphismus besteht aus drei Genotypen mit dazugehörigen Phänotypen: GG (high producer), GA (middle/low producer), AA (low producer).

Bei der Herz- und der Lebertransplantation konnte dem IL-10 –1082 A Polymorphismus, dem so genannten „low producer“ Typ, eine geringere Transplantatüberlebenszeit als dem „high producer“ IL-10 –1082 G zugeschrieben werden.^{86, 108, 113}

1.1.2 Tumornekrosefaktor- α

Der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) wurde erstmals im Zusammenhang mit seiner Fähigkeit der Zytotoxizität und Zytolyse von Tumorzellen entdeckt. TNF- α , auch Cachektin oder cytotoxic factor (CF) genannt, ist ein nicht glykosyliertes Protein mit einer Länge von 17 kDa und 157 Aminosäuren. TNF- α wird unter anderem von aktivierten Makrophagen, Monozyten, T-Zellen und Natural-Killer-Zellen nach Stimulation durch Lipopolysaccharide produziert. CD4+ T-Zellen produzieren TNF- α , CD8+ T-Zellen nicht oder kaum. Die TNF- α Produktion hilft bei der Eindämmung von lokalen Infektionen, da sie bei einer Entzündungsreaktion früh aktiviert wird. TNF- α bringt dabei eine Kaskade von weiteren Mediatoren wie Interferon- γ , IL-6 und IL-10 hervor.⁴⁹ TNF- α hat Einfluss auf die Regulation und Proliferation von T- und B-Zellen. Er aktiviert Granulozyten und Makrophagen, hat koagulatorische Wirkung auf Endothelzellen und beeinflusst den Angiogenesefaktor. Weiterhin spielt der Faktor eine Rolle bei der Hemmung des Fett-, Knorpel- und Leberstoffwechsels. TNF- α hat die Fähigkeit zu Zytotoxizität und Zytolyse zahlreicher Tumorzellen und verursacht Fieber.

Das TNF- α Gen hat eine Länge von 3,6 kb. Es liegt in der Klasse III Region des MHC (major histocompatibility complex) auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 von 6p23 bis 6q12. Die biologische Aktivität von TNF- α und seine Genlokation im MHC machen ihn interessant bezüglich Erkrankungen und Prozesse, die in Zusammenhang mit dem MHC und inflammatorischen Vorgängen stehen.⁸⁷

Eine Punktmutation in der Promoterregion des TNF- α auf Position –308 (Austausch von Guanin durch Adenosin, –308G/A-Polymorphismus) wurde erstmals von Duff et al. entdeckt.¹¹⁷ Das A-Allel konnte dabei in Zusammenhang mit einer sechs- bis siebenfach erhöhten Transkriptionsleistung^{57, 116, 118, 119} und einer erhöhten in vitro Ausschüttung von TNF- α ¹⁰ gebracht werden. Im TNF- α –308G/A-Genpolymorphismus gibt es folgende Geno- und Phänotypen: AA (high producer), GA (high producer) und GG (low producer). Der TNF- α –308G/A-Polymorphismus ist die am häufigsten und am weitesten erforschte Genvariation. Der high producer Typ (GA und AA) konnte mit akuten Abstoßungsreaktionen bei Herz-^{1, 108} und Lebertransplantationen⁹² in Zusammenhang gebracht werden.

1.1.3 Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) wird unter anderem von stimulierten Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Lymphozyten und Mastzellen produziert. Es fördert das Wachstum von Plasmazellen und hat sowohl pro-inflammatorische als auch anti-inflammatorische und immunsuppressive Eigenschaften. IL-6 beeinflusst inflammatorische Prozesse durch Eingreifen in die Synthese und Bioaktivität der pro-inflammatorischen Zytokine. Es hat sich gezeigt, dass IL-6 die TNF- α -Synthese unterdrücken kann¹²² und die Freisetzung von IL-1 und TNF-Antagonisten wie IL-1 ra hervorrufen kann.¹⁰⁷ Es ist ein aus 184 Aminosäuren bestehendes Protein.

Das IL-6-Gen liegt auf dem Gen 7 p21-p14. Der Polymorphismus in der Promoterregion des IL-6-Gens, der eine Substitution von Cytosin durch Guanin auf Position 5'/-174 (-174G/C-Polymorphismus) beinhaltet, konnte in Zusammenhang mit einer modifizierten in vitro und in vivo Produktion von IL-6 gebracht werden.^{27, 124} Das C-Allel steht in Zusammenhang mit einer niedrigeren in vitro und in vivo Produktion von IL-6. Die Ermittlung der mittleren Produktionsrate ermöglichte eine Einteilung in eine high producer Gruppe mit dem Genotyp GG, eine intermediäre Gruppe GC und einen low producer Typ mit dem Genotyp CC.²⁷ In einer Studie zum IL-6 -174G/C-Genpolymorphismus konnte bei dem low-producer CC und GC ein protektiver Einfluss auf das Langzeitüberleben von Nierentransplantaten festgestellt werden.⁷⁶ Andere Studien konnten diesen Einfluss nicht bestätigen^{15, 36, 45, 65, 88}, bzw. kamen zu einem gegenteiligen Ergebnis⁸².

1.2 Fragestellung und Zielsetzung

Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit dem Einfluss der IL-10 -1082G/A-, TNF- α -308G/A- und IL-6 -174G/C-Genpolymorphismen auf den Langzeitverlauf von Nierentransplantaten. Dazu untersuchten wir eine Patientengruppe von 224 Patienten, die im Zeitraum von 1998 bis 2001 in der Heinrich-Heine-Universitätsklinik Düsseldorf ein Nierentransplantat erhielten. Es wurde versucht einen möglichen Zusammenhang zwischen den Genpolymorphismen und der Häufigkeit von akuten Rejektionen und chronischen Abstoßungsreaktionen aufzudecken. Durch das Feststellen genetischer Risikofaktoren könnte in Zukunft ein individuelles Risikoprofil der Patienten erstellt und mit einer abgestimmten immunsuppressiven Therapie darauf reagiert werden.

2 Patienten und Methoden

2.1. Studiendesign

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von Nierentransplantatempfängern auf Genpolymorphismen des IL-10-, TNF- α - und IL-6-Gens. Für jeden Patienten wurden Stamm- und Verlaufsdaten aus Patientenakten und Arztbriefen erhoben.

Als Stammdaten:

- Alter (zum Zeitpunkt der Transplantation)
- Geschlecht
- Grunderkrankungen vor/nach der Transplantation
- Diabetes mellitus (IDDM/NIDDM)
- Manifeste kardiovaskuläre Erkrankungen
- Zugrundeliegende Nierenerkrankung
- Zeitraum der Dialysetherapie bis zur Transplantation
- Art der Dialyse (Hämodialyse, Peritonealdialyse)
- HLA-Muster von Empfänger und Spender und Anzahl der HLA-mismatches
- Kalt- und Warmischämiezeit des Transplantats
- Anzahl der Transplantationen

Als Verlaufsdaten im Zeitraum von 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66 Monaten:

- Serumkreatininspiegel, Harnstoff, CRP, Fibrinogen, Gesamteiweiß, Albumin
- Endogene Kreatininclearance (ECC), Proteinurie (Einfachmessung und im 24h-Urin)
- Anzahl und Schweregrad von Abstoßungsreaktionen, steroid-resistent oder steroid-sensibel
- histologische Untersuchung der Abstoßungsreaktion: reversibel oder irreversibel
- Art der Immunsuppression: Cyclosporin A (CsA), Tacrolimus, Mycophenolatmofetil (MMF), Steroide, Antithymozytenglobulin (ATG)
- Zytomegalievirusinfektion, Immunisierungsstatus bei Transplantation
- Überlebensdauer des Transplantats, d. h. Dauer bis zur erneuten Dialysepflicht
- Ursache im Falle eines Transplantatverlustes
- Patient verstorben, Ursache

Zum Endpunkt der Datenerfassung wurden eine erneute Dialysepflichtigkeit, der Tod oder das Ende des Beobachtungszeitraumes (31.12.2003) bestimmt.

Einschlusskriterien der Studie waren eine Funktionsaufnahme der Transplantatnieren innerhalb von drei Monaten nach Transplantation ohne Dialysepflichtigkeit und eine Datenerfassung über einen Zeitraum von mindestens sechs Monaten.

2.2 Patienten

Im Zeitraum vom 01.01.1998 bis 31.12.2001 wurden in der Universitätsklinik Düsseldorf 298 Nierentransplantationen durchgeführt. Von den 235 Leichennieren- und 63 Lebendspendetransplantierten wurden n=224 Patienten in die Studie aufgenommen (175 Leichennieren- und 49 Lebendnierentransplantierte). Von den nicht in die Studie aufgenommenen Patienten hatten 13 Patienten innerhalb von drei Monaten nach Transplantation keine Funktionsaufnahme, 15 Patienten waren zum Zeitpunkt der Genotypisierung verstorben, so dass keine Blutprobe entnommen werden konnte und 46 Patienten waren nicht erfassbar, da sie nicht mehr in der Nephrologischen Ambulanz der Universitätsklinik Düsseldorf betreut wurden.

2.3 Kontrollgruppe

Um Hinweise auf den möglichen Einfluss bestimmter Genpolymorphismen und damit veränderter Zytokinexpression schon bei Nierengrunderkrankungen zu erkennen, bedurfte es einer Kontrollgruppe. Diese Kontrollgruppe setzte sich aus 100 nierengesunden Freiwilligen, hauptsächlich Mitarbeitern der Universitätsklinik Düsseldorf zusammen. Die Genotypisierung wurde bei 55 Frauen und 45 Männern durchgeführt bei denen anamnestisch und klinisch eine Nierenerkrankung ausgeschlossen werden konnte.

2.4 Laborbestimmungen

2.4.1 Laborbestimmungen allgemein

Im Nephrologischen Labor wurde mit labortechnischen Standardmethoden das Kreatinin im Serum und Urin und die Endogene Kreatinin-clearance (ECC) bestimmt. Die Kreatininbestimmung erfolgte über die Jaffé-Reaktion ohne Enteiweißung. Die ECC wurde daraus auf die Körperoberfläche der Patienten bezogen berechnet und in ml/min pro 1,73 m² angegeben. Da nicht bei allen Patienten die vom Labor berechnete ECC aus 24h-Urin vorlag, wurde sie zusätzlich durch die Formel nach Cockcroft und Gault berechnet:

$$\text{Endogene Kreatinin-clearance (ml/min) für Männer} = \frac{(140 - \text{Alter}) \times \text{Körpergewicht (kg)}}{72 \times \text{Kreatinin im Serum (mg/dl)}}$$

$$\text{Endogene Kreatinin-clearance (ml/min) für Frauen} = 0,85 \times \frac{(140 - \text{Alter}) \times \text{Körpergewicht (kg)}}{72 \times \text{Kreatinin im Serum (mg/dl)}}$$

2.4.2 Materialgewinnung

Den teilnehmenden Patienten der Studie wurde venöses Blut abgenommen und mit ACD (Acid Citrat Dextrose; Acidum citricum purum 2,5%, Dextrose 2,5%, Natrium citricum 2,16%, BD Vacutainer Systems, UK) versetzt. Die so behandelten Proben wurden steril bei -20°C tiefgefroren.

2.4.3 DNA-Präparation

Mit Hilfe des QUIamp DNA-Blood Mini-Kit 09/2001 (QUIAGEN, Hilden) konnte die DNA aus dem ACD-Vollblut extrahiert werden. Die Präparation setzte sich aus mehreren Schritten zusammen.

1. Im ersten Schritt, der Lyse, wurde in 1,5 ml Eppendorf Pipetten 200µl aufgetautes ACD-Vollblut mit 20µl aufgelöster Protease und 200µl Puffer AL versetzt. Diese Mischung wurde sofort für 15 Sekunden auf dem Vortexer vermischt und anschließend bei 56°C im Wasserbad inkubiert. Nach kurzem Anzentrifugieren wurden 200µl Ethanol zugegeben und abermals mit Hilfe des Vortexer bearbeitet.
2. In einem zweiten Schritt erfolgte eine Reinigung der DNA. Hierzu wurde das Gemisch vorsichtig auf Säulen pipettiert und eine Minute bei 8000rpm (6000 x g) Raumtemperatur zentrifugiert (Eppendorf 5417 R, Hamburg). Durch die vorbereitende Pufferung im Lyseschritt konnte die DNA an der QUIamp-Silicagel Membran in den Säulen binden. Proteine und andere Störfaktoren durchliefen die Membran und wurden mit dem Filtrat verworfen.
3. In zwei weiteren Reinigungsschritten wurde die an der QUIamp Membran gebundene DNA mit zwei verschiedenen Puffern (AW 1 und AW 2) gewaschen, um noch vorhandene Kontaminationen zu beseitigen. Dazu wurde jeweils 500µl Puffer auf die Säulen gegeben und anschließend bei 8000rpm (6000 x g) Raumtemperatur zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Eine weitere Zentrifugation der Säulen bei 14000 rpm (20000 x g) Raumtemperatur für zwei Minuten vermied die Bildung von Flüssigkeitsresten.
4. Es folgte eine Inkubationszeit von fünf Minuten. Dazu wurden die Säulen in eine 1,5 ml Eppendorf Pipette gesetzt und mit 50µl Puffer AE zur Elution der DNA versetzt.
5. Die folgende Zentrifugation von 8000 rpm (6000 x g) Raumtemperatur ermöglichte den Übertritt der gelösten DNA in das Eluat. Die Säulen wurden anschließend entsorgt.

6. Zur Kontrolle der DNA-Konzentration und der DNA-Reinheit wurden die Proben im Spektrophotometer (Gene Quant, Pharmacia Biotech, Cambridge, England) gemessen. Für die Messung musste die DNA mit Aqua dest. verdünnt und gegen einen Leerwert bei 260 und 280 nm Wellenlänge gemessen werden. Die DNA-Konzentration konnte aus der Absorption bei 260 nm berechnet werden. Durchschnittlich 8µg DNA (3-24µg) konnten aus 200µl Vollblut gewonnen werden. Die DNA-Reinheit wurde durch die Relation A_{260} zu A_{280} nachgewiesen.
7. Die Lagerung der DNA erfolgte kurzfristig bei +4°C und langfristig bei -20°C.

2.4.4 Genpolymorphismen

2.4.4.1 Interleukin-10 –1082G/A-Genpolymorphismus

Laborbestimmung

Für die Bestimmung des IL-10 –1082-Genpolymorphismus wurden zwei Fragmente aus 258 Basenpaaren mittels PCR vervielfältigt.⁸⁵ Dazu wurden die beiden Allele durch jeweils eigene PCR Amplifikationen einzeln bestimmt.

Als Primer wurden benötigt: antisense: 5' CAGTGCCAACTGAGAATTTGG 3' und sense primer: G-Allel spezifische PCR: 5' C TACTAA GGCTTCTTGGGAG 3', A-Allel spezifische PCR: 5' ACTACTAAGGCTTCTTGGGAA 3' (MWG Biotech AG, Ebersberg).

PCR-Protokoll

Das Reaktionsgemisch bestand aus:

DNA:	2µl Extraktionsprodukt (durchschnittlich 0,02 µg DNA)
10fach PCR-Puffer:	5 µl
MgCl ₂ :	2,2 mmol
dNTP:	0,2 mmol
sense-Primer β-Aktin:	1,5pmol
antisense-Primer β-Aktin:	1,5 pmol
sense-Primer 1082 G :	20pmol
antisense-Primer 1082:	20pmol

Platinum Taq Polymerase 1082 (invitrogen, USA): 1,2 Units

H₂O-DEPC

Die anschließende Bearbeitung im Thermocycler beinhaltet:

Vordenaturierung:	5 min bei 94°C
Und anschließend 30 Zyklen von:	
1. Schritt: Denaturierung:	30 sec bei 95°C
2. Schritt: Hybridisierung (Primeranlagerung):	40 sec bei 65°C
3. Schritt: Amplifikation (Polymerisierung):	1 min 10 sec bei 72°C
Endamplifikation:	7 min bei 72°C

Zur internen Kontrolle wurde gleichzeitig in jeder Probe eine 661 bp lange Sequenz von β -Aktin polymerisiert.

Gelelektrophorese

Die kombinierte Agarose Gelelektrophorese beider PCR Produkte ermöglichte die Bestimmung der -1082G/A Genotypen. Dazu wurden 15 μ l des PCR-Produkts mit 3 μ l Orange G zum Anfärben vermischt und in ein 1,5% Agarose-Gel (versetzt mit Ethidiumbromid) gegeben. Die Elektrophorese erfolgte in 50fach verdünntem TAE-Puffer (0,04M Tris (FW 121,1) + 0,02M Essigsäure 100% + 0,5M EDTA pH 8,0 ad 1000ml Aqua dest.).

Mit UV-Licht wurden die Banden sichtbar gemacht und fotografisch festgehalten. Die Länge der Fragmente konnte im Vergleich mit einem Längenstandard Marker VIII (19-1114bp, Roche Diagnostics, Mannheim) festgelegt werden. G- und A-Allel hatten je eine Bande bei 258 Basenpaaren (Abb. 1).

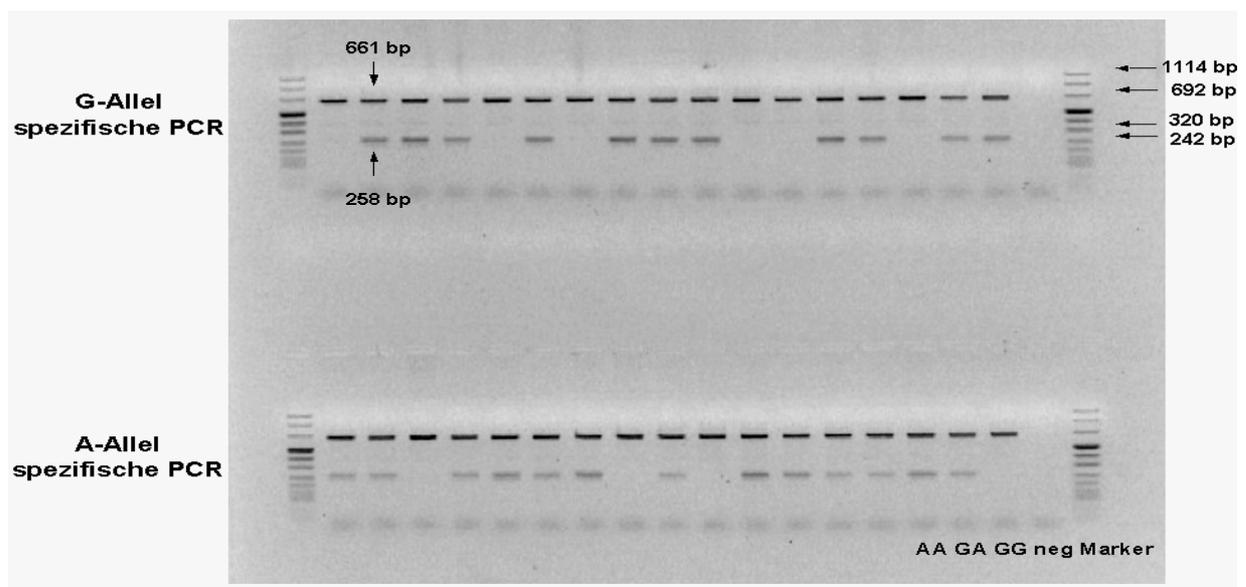


Abb. 1: IL-10 -1082G/A-Polymorphismus: PCR-Produkte in der Elektrophorese, G-Allel bei 258bp oben, A-Allel bei 258bp unten; interne Kontrolle mit β -Aktin 661 bp.

2.4.4.2 Tumornekrosefaktor- α –308G/A-Genpolymorphismus

Laborbestimmung

Der Genpolymorphismus wurde durch Amplifikation eines 107 Basenpaare langen Fragments des TNF α -Gens mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) bestimmt.⁸⁵

Als primer dienten 30 pmol sense-primer 5'AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT3' und antisense-primer 5'TCCTCCCTGCTCCGATTCCG3' (MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland).

PCR-Protokoll

Das Reaktionsgemisch bestand aus:

DNA: 1 μ l Extraktionsprodukt (durchschnittlich 8 μ g DNA)

10fach PCR-Puffer: 5 ml

MgCl₂: 1,5 mmol

dNTP: 0,2 mmol

(Mischung aus den Desoxynukleotidtriphosphaten dTTP, dCTP, dGTP, dATP, Roche Diagnostics, Mannheim)

sense-Primer: 30 pmol

antisense-Primer: 30 pmol

Hot Star Taq Quiagen 1,2 Units

(thermostabile DNA-Polymerase gewonnen aus dem *Thermus aquaticus*, Quiagen, Hilden)

H₂O-DEPC

Die anschließende Bearbeitung im Thermocycler beinhaltet:

Vordenaturierung 15 min bei 95°C

Und anschließend 30 Zyklen von:

1. Schritt: Denaturierung: 40 sec bei 95°C

2. Schritt: Hybridisierung (Primeranlagerung): 40 sec bei 65°C

3. Schritt: Amplifikation (Polymerisierung): 40 sec bei 72°C

Endamplifikation: 5 min bei 72°C

Durch eine anschließende Restriktion mit Endonuklease NCO I wurde das 107 bp lange PCR-Produkt bei Anwesenheit des TNF 2-Allels in zwei Fragmente von 87bp und 20 bp geschnitten.

PCR-Produkt: 25 μ l

NE-Puffer 4: 0,5 μ l NCO I

H₂O

Restriktion: 3h bei 37°C im Hybridofen bzw. Thermocycler

Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Amplifikate wurden 15 µl des Restriktions-Produktes mit 3 µl Orange G zum Anfärben versetzt. Danach wurden sie in ein 2% Metaphor-Gel gegeben, das mit Ethidiumbromid (Roche Diagnostics, Mannheim, 0.05 µg/ml pro Gel) versetzt war. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der unter UV-Anregung sichtbar gemacht wird. Die Elektrophorese erfolgte in TBE-Puffer 10fach verdünnt [(89mM Tris-vorate pH 8,3, 108g TRISMA Base FW 121,1) + 2mM Na₂EDTA (7,4g EDTA-dissodium FW 372,3 ad 1000ml Aqua dest.)]. Nach Abschluss der Auftrennung wurden die Banden mittels UV-Licht (312 nm, Herolab, Wiesloch) sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert. Die Länge der produzierten Fragmente (G-Allel: 20 bp + 87 bp, A-Allel: 107 bp) ließen sich durch Vergleich mit einem ebenfalls aufgetragenen Längenstandard (25 bp DNA-Leiter, invitrogen Cat. 10597-011) bestimmen (Abb. 2).

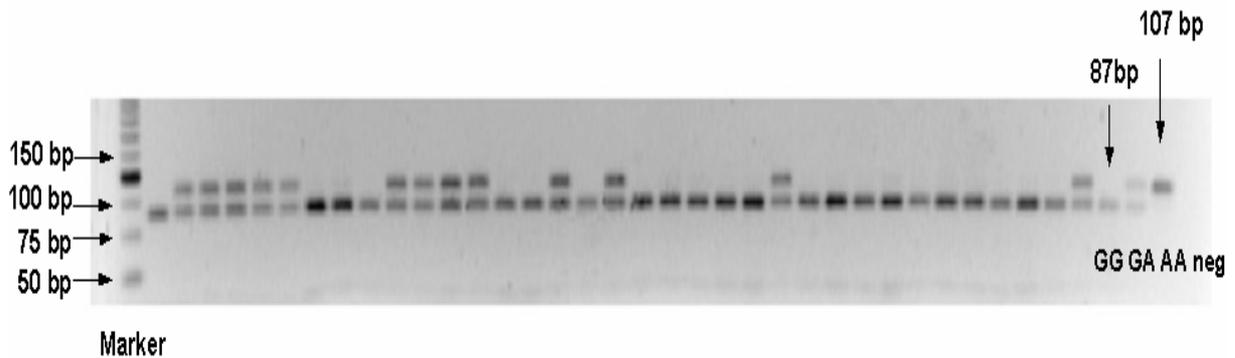


Abb. 2: TNF- α -308G/A-Genpolymorphismus: PCR-Produkte in der Elektrophorese, G-Allel bei 20+87bp, A-Allel bei 107 Basenpaaren.

2.4.4.3 Interleukin 6 –174G/C-Genpolymorphismus

Laborbestimmung

Der IL-6 –174-Genpolymorphismus wurde bestimmt mittels PCR zur Amplifikation und anschließender Restriktion mit der Endonuklease Lwe I.⁸⁵ An Primern wurden dazu benötigt: sense-primer 5'-CAGAAGAACTCAGATGACTGG-3' und 5'-GCTGGGCTCCTGGAGGGG-3' antisense-primer (MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland).

PCR-Protokoll

Das Reaktionsgemisch bestand aus:

DNA: 2µl Extraktionsprodukt (durchschnittlich 0,02 µg DNA)

10fach PCR-Puffer incl. MgCl₂ 1,5mmol: 5 µl

MgCl₂: 2,2 mmol

dNTP: 0,2 mmol

3' Primer: 20pmol

5' Primer: 20pmol

Quiagen Hot Star Polymerase: 0,2 µl

H₂O-DEPC

Die abschließende Bearbeitung im Thermocycler beinhaltete:

Vordenaturierung 15 min bei 95°C

Anschließend 37 Zyklen mit:

1. Schritt: Denaturierung: 45 sec bei 94°C

2. Schritt: Hybridisierung (Primeranlagerung): 45 sec bei 60°C

3. Schritt: Amplifikation (Polymerisierung): 1 min 30 sec bei 72°C

Endamplifikation: 10 min bei 72°C

Anschließend wurden je 25 µl des PCR-Produkts mit 4 µl Puffer Y'Tango (33mM Tris-acetat, 10 mM Magnesiumacetat, 66 mM Potassiumacetat, 0,1 mg/ml BSA (pH 7,9 at 37°C), Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland), H₂O und 2 Units Endonuklease Lwe I (Fermentas GmbH) versetzt und 3 h bei 37°C in den Hybridofen gestellt. Nach 1,5 h bei 37°C kamen abermals 1 Unit Lwe I pro Probe hinzu. Durch die Endonuklease wurde in den Fällen, in denen das G-Allel vorlag, der 651 bp lange amplifizierte Genabschnitt in zwei Abschnitte von 367 und 243 bp Länge geschnitten.

Gelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese erfolgte die Bestimmung der IL-6–174G/C-Polymorphismen. Dazu wurden 20 µl des Restriktionsprodukts mit 4 µl Orange G zum Anfärben vermischt und in ein 2% Agarose-Gel (versetzt mit Ethidiumbromid) gegeben. Die Elektrophorese wurde mit 50fach verdünntem TAE-Puffer (0,04M Tris (FW 121,1) + 0,02M Essigsäure 100% + 0,5M EDTA pH 8,0 ad 1000ml Aqua dest.) durchgeführt. Mit UV-Licht wurden die Banden sichtbar gemacht und fotografisch festgehalten. Die Länge der Fragmente konnte im Vergleich mit einer 100bp DNA-Leiter (peqlab) bestimmt werden: G-Allel 367bp + 243bp, C-Allel 610 bp (Abb. 3).

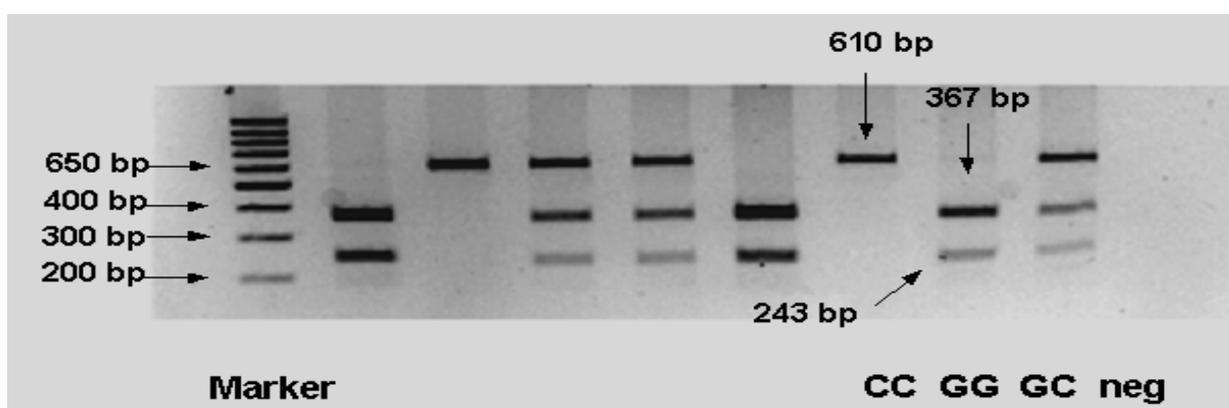


Abb. 3: IL-6–174G/C-Polymorphismus: PCR-Produkte in der Elektrophorese, C-Allel bei 610 bp, G-Allel bei 367bp und 243bp.

2.4.5 Qualitätssicherung

Um bei den verschiedenen Bearbeitungsschritten eine Kontamination mit Fremd-DNA zu verhindern, kamen mehrere Maßnahmen zum Tragen. Nach gründlicher Hautdesinfektion erfolgte das Asservieren über das Vacutainer System. Es herrschte während der Blutentnahme und aller weiterer Bearbeitungsschritte Handschuhpflicht. Zur weiteren Prophylaxe trugen unterschiedliche Arbeitsplätze für die DNA-Extraktion, die DNA-Messung und die Verdünnung, für die PCR und für die Elektrophorese bei. Die Pipettenspitzen waren steril und gefiltert (Biozym, Oldendorf), außer beim letzten Schritt der Elektrophorese. Um eine Kontamination zu erkennen, gab es bei jeder PCR Negativ-Kontrollen. Zusätzlich erfolgten parallel bei jeder Untersuchungsreihe interne Kontrollen mit allen Allelkombinationen. Die Elektrophoresebilder wurden von zwei Untersuchern bewertet und im Zweifelsfall wurde die Probe erneut bestimmt.

2.5 Immunsuppressive Therapie nach Nierentransplantation

Die für die Transplantation erforderliche Immunsuppression wurde in Protokollen festgelegt. Die Protokolle sahen eine Basisimmunsuppression bei Leichennierentransplantation (Nicht-Risikoempfänger und Hoch-Risikoempfänger), Lebendnierentransplantation (Nicht-Risikoempfänger/Verwandtentransplantation, Nicht-Verwandtentransplantation, HLA-Übereinstimmung <50% bzw. Hochrisiko-Lebendempfänger) und bei Transplantationen im Rahmen des Eurotransplant-Senior-Programms vor. Hoch-Risikoempfänger wurden definiert als Patienten mit Zweit- oder Mehrfachtransplantation und gesichertem vorangegangenen immunologischen Transplantatverlust innerhalb der ersten sechs Monate nach Transplantation und/oder Patienten mit präformierten zytotoxischen Antikörpern. Unabhängig von der Basisimmunsuppression gab es ein Protokoll für die Rejektionstherapie.

1. Leichennierentransplantation:

Die Therapie für Nicht-Risikoempfänger setzte sich aus Steroiden, Cyclosporin A und Mycophenolatmofetil zusammen.

Für Hoch-Risikoempfänger wurde Antithymocytoglobulin zu einer Quadrupel-Therapie ergänzt.

2. Lebendnierentransplantation:

Die Therapie war identisch mit der Therapie bei Leichennierentransplantation, begann jedoch bereits vor der Transplantation.

Zur Vierfachtherapie bei Risikokonstellation wurden IL-2-Rezeptor-Antikörper gegeben.

3. Eurotransplant-Senior-Programm

Vierfachtherapie mit Steroiden, Cyclosporin A, Mycophenolatmofetil und IL-2-Rezeptor-Antikörper.

4. Rejektionstherapie

Die erste Rejektion wurde unabhängig von der Basisimmunsuppression mit einer Steroidstoßtherapie behandelt, eine wiederholte Rejektion entweder mit Steroiden oder in Einzelfällen bei Hinweisen auf eine vaskuläre Rejektion mit monoklonalen Antikörpern OKT3 oder mit einer Umstellungstherapie auf Tacrolimus.

2.6 Eurotransplant-Senior-Programm

Vor dem Hintergrund der zunehmenden Anzahl älterer Spender und Empfänger startete Eurotransplant in Leiden 1999 das Eurotransplant-Senior-Programm (ESP). Das sogenannte „Old for Old“-Programm ist ein Transplantationsprogramm speziell für ältere Menschen. Es werden Organe von über 65-jährigen Spendern bevorzugt an über 65-jährige Empfänger aus derselben Region vermittelt. Diese regionale Organverteilung ermöglicht, dass der Nachteil des älteren Organs durch die kurze Ischämiezeit, also die Zeit zwischen Organentnahme und Transplantation, ausgeglichen wird. Ziele des ESP sind sowohl die Wartezeit für die älteren Menschen zu verringern, als auch eine effiziente Verwendung von älteren Spenderorganen zu gewährleisten.¹¹⁰

2.7 Kalt- und Warmischämiezeit

Die Nierenspenden sind nach der Explantation unter anderem durch Ödembildung, intrazelluläre Azidose und O₂-Radikale gefährdet. Dies versucht man zu verhindern, indem man die Organspenden in speziellen Konservierungslösungen bei 4°C lagert. Diese Zeit wird als Kaltischämiezeit bezeichnet. Die Ischämietoleranz reicht bei Nieren bis zu 36 Stunden. Die Zeitspanne zwischen der Abtrennung der Niere von der Durchblutung bis zum Durchspülen mit der Konservierungslösung plus die Operationszeit bis zur Anlage der Anastomose im Empfänger wird als Warmischämiezeit bezeichnet.

2.8 Statistik

Alle Daten wurden in Prozentsätzen oder Mittelwerten ± Standardabweichung angegeben. Daten der Gruppen wurden durch den Chi-Quadrat Test nach Pearson oder wo es angezeigt war durch den exakten Test nach Fisher verglichen. Unterschiede in normalverteilten Variablen wurden durch den Students T-Test oder den nichtparametrischen U-Test nach Mann-Whitney berechnet. Die Variablen wurden in jeder Gruppe mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test für eine Stichprobe auf Normalverteilung getestet. Die beobachteten Genotypverteilungen in der Patienten- und Kontrollgruppe wurden zum Ausschluss einer Selektion mit den anhand des Hardy-Weinberg-Gesetzes¹ erwarteten Frequenzen verglichen. Das Organüberleben der Nierentransplantate wurde nach Kaplan-Meier analysiert. Die statistischen Analysen wurden mittels SPSS 11.0 (Statistical Package for Social Sciences, SSPS GmbH, München) durchgeführt. Alle Tests waren doppelseitig und Wahrscheinlichkeitswerte $p < 0.05$ wurden als signifikant erachtet.

¹Hardy GH. Mendelian proportions in a mixed population. Science 1908; 28:49-50

2.9 Ethische Aspekte und Datenschutz

Die Patienten wurden vor Aufnahme in die Studie genau über das Studiendesign aufgeklärt und eine Blutentnahme erfolgte nach mündlicher Einverständniserklärung des Patienten. Die Patienten konnten auf Wunsch jederzeit aus der Studie austreten. Die erhobenen Daten und Befunde wurden in anonymisierter Form elektronisch gespeichert und ausgewertet. Die Bestimmungen des Datenschutzgesetzes wurden dabei eingehalten. Nach Abschluss der Studie wurden die patientenbezogenen Daten gelöscht.

Die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt (Nr. 2609/2005).

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeine Patientendaten

Die Studie umfasste 224 Patienten (91 Frauen und 133 Männer), die von 1998 bis 2001 in der Heinrich-Heine-Universitätsklinik Düsseldorf nierentransplantiert wurden. Bei den Studienteilnehmern lag innerhalb von drei Monaten nach Transplantation eine Funktionsaufnahme der Transplantatniere vor und die Daten konnten über mindestens sechs Monate nachvollzogen werden.

3.1.1 Nierengrunderkrankung und Dialysepflichtigkeit

Zu den häufigsten Ursachen der Niereninsuffizienz zählten die Glomerulonephritis, die IgA-Nephropathie und die polyzystische Nierendegeneration (Tabelle 1).

Tabelle 1: Nierengrunderkrankung und Ursache der terminalen Niereninsuffizienz, n=224.

Nierengrunderkrankung	Häufigkeit	%
Glomerulonephritis	47	21
IgA-Nephropathie	28	12,5
Polyzystische Nierendegeneration	27	12,1
Diabetische Nephropathie	12	5,4
Benigne Nephrosklerose	10	4,5
Nephritis	9	4
Andere (u.a. Alport Syndrom, Maligne Nephrosklerose)	41	18,3
Unbekannt	50	22,3

Vor der Nierentransplantation führten 191 Patienten (85%) ein Hämodialyseverfahren durch, 28 Patienten (13%) eine Peritonealdialyse und vier Patienten (2%) wurden vor Einleitung der Dialyse präemptiv transplantiert. Die durchschnittliche Dialysepflichtigkeit bis zur Nierentransplantation betrug $5,0 \pm 3,8$ Jahre mit einer Spanne von unter einem Jahr bis zu 17 Jahren.

Um einen möglichen Einfluss von Begleiterkrankungen wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus oder Koronare Herzkrankheit, die bereits vor der Nierentransplantation bestanden, auf Transplantatverlust oder Morbidität und Mortalität nach der Transplantation zu erkennen, wurden diese bei der Datenaufnahme erfasst (Tabelle 2).

Tabelle 2: Begleiterkrankungen (bereits vor Transplantation bestehend), n=224.

Begleiterkrankungen vor Transplantation	Häufigkeit	%
Diabetes mellitus		
Typ 1	6	2,7
Typ 2	11	4,9
Myokardinfarkt	7	3,1
PTCA / Bypass-Operation	18	8
pAVK Stadium III oder IV	9	4
Apoplex, TIA	2	0,9
Tachyarrhythmia absoluta	10	4,5
Arterielle Hypertonie	186	83
Herzvitium	14	6,3
KHK	33	14,7

3.1.2 Transplantationsdaten

Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Transplantation lag bei 48 ± 13 Jahren (Spanne: 15–70 Jahre). Von den 224 untersuchten Patienten erhielten 192 Patienten (86%) zum ersten Mal eine Spenderniere. Leichennierentransplantate wurden bei 175 Patienten verwendet und 49 Patienten erhielten eine Lebendnierenspende durch einen Verwandten oder den Ehepartner (Tabelle 3). Von den Leichennierenspenden erhielten 20 Patienten (9%) eine Spenderniere im Rahmen des Eurotransplant-Senior-Programms.

Tabelle 3: Geschlechtsspezifische Angaben zur Anzahl der Leichen- und Lebendnierentransplantationen.

Patienten	Frauen n=91	Männer n=133	Gesamt n=224
Leichennierentransplantation	74 (33 %)	101 (45,1%)	175 (78,1%)
Lebendnierentransplantation	17 (7,6%)	32 (14,3%)	49 (21,9%)

Bei jeder Transplantation wird durch HLA-Muster-Bestimmung des Transplantierten und seines Spenders die bestmögliche Übereinstimmung angestrebt. Dieses komplexe vererbte System von Gewebsantigenen, das auf den Zellen fast aller Gewebe mit quantitativen Unterschieden vorkommt, lässt sich besonders gut auf Leukozyten nachweisen. In 36 Fällen (16,1%) wurde die bestmögliche Übereinstimmung des HLA-Musters mit keinem mismatch erreicht. Bei 23 Patienten (10,3%) lag in einem Punkt ein Abweichen des HLA-Musters, d.h. ein mismatch vor, bei 41 (18,3%) bzw. 59 (26,3%) Patienten lagen zwei oder drei mis-

matches vor. Die maximale Anzahl von sechs HLA-mismatches gab es in zehn Fällen (4,5%). Diese Fälle waren überwiegend Lebendspenden, insbesondere von Ehepartnern (Abb. 4).

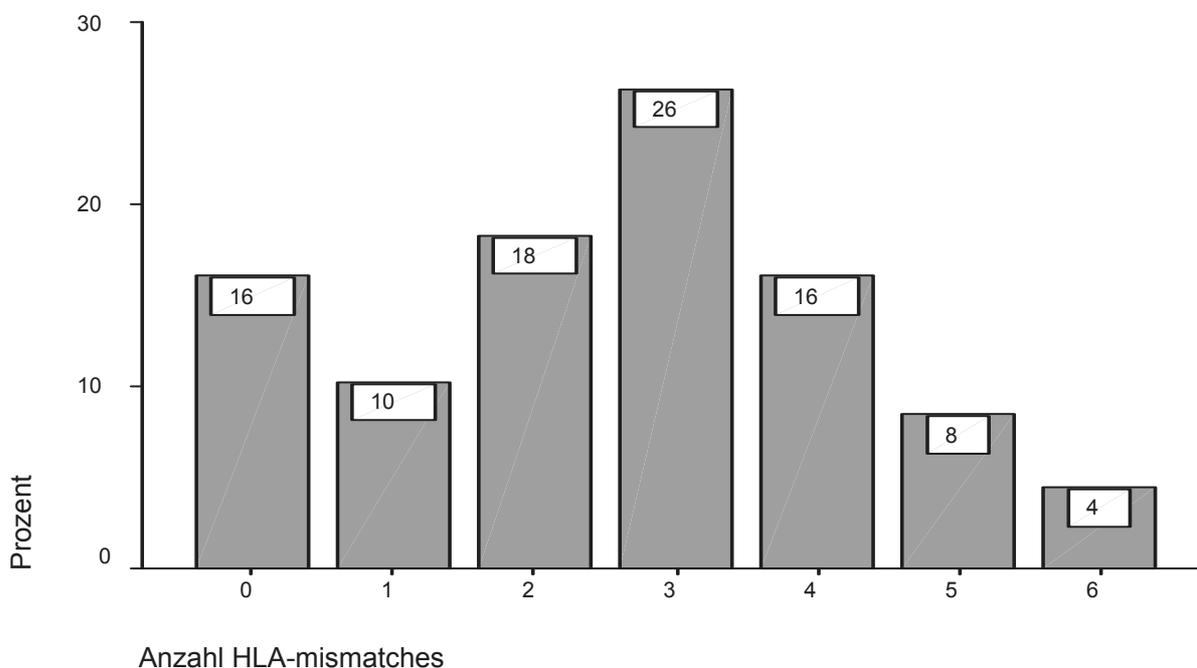


Abb. 4: Anzahl der HLA-mismatches des gesamten Patientengutes (%), n=224.

Im Vergleich von Leichen- und Lebendnierenspende ergaben sich bei den Leichennierenspenden bei 32 Spender/Empfänger-Konstellationen (18,3%) kein HLA-mismatch und ein HLA-mismatch bei 17 Patienten (9,7%). Am häufigsten lag eine Konstellation von drei mismatches bei insgesamt 46 Patienten (26,3%) vor. Die Kombination von sechs HLA-mismatches gab es bei sechs Patienten (3,4%). Von den 20 Transplantationen im Rahmen des Eurotransplantant-Senior-Programmes hatten 40% der Patienten fünf oder sechs HLA-mismatches. Die Anzahl von vier HLA-mismatches hatten 30% und zwei oder drei mismatches hatten insgesamt 30% der old-for-old Empfänger.

Die Lebendnierenspender hatten in vier Fällen (8,2%) mit keinem HLA-mismatch eine optimale Übereinstimmung mit dem Empfänger. Ein HLA-mismatch gab es bei sechs Patienten (12,2 %). Die meisten Spender/Empfänger-Konstellationen, nämlich 13 Patienten (26,5%) hatten drei HLA-mismatches. Sechs HLA-mismatches lagen in vier Fällen (8,2%) vor. Ein Vergleich der HLA-Muster-Verteilung der Leichennieren- und Lebendnierenspender ergab einen nahezu signifikanten Unterschied ($p=0.052$).

3.2 Patienten-Verlaufsdaten

Die Patienten nach Nierentransplantation hatten eine mittlere Beobachtungszeit von $34,3 \pm 16,1$ Monaten (Spanne: 6-66 Monate). Eine Beobachtungszeit von einem Jahr lag bei 207 Patienten vor, zwei Jahre bei 165 Patienten und drei und vier Jahre bei 115 und 56 Transplantierten. 23 Patienten konnten fünf Jahre beobachtet werden und 12 Patienten über 66 Monate.

3.2.1 Transplantatfunktion im Verlauf

Bei 151 Patienten (67%) nahm die Spenderniere sofort ihre Funktion auf. Mindestens eine biopsiegesicherte Abstoßungsreaktion wurde bei 115 Transplantatempfängern (51%) nachgewiesen. Während der Beobachtungsphase verloren $n=27$ Patienten (12,1%) ihr Transplantat, vier Patienten davon nach Lebendnierenspende. Der Transplantatverlust war in neun Fällen (4%) immunologisch bedingt, bei vier Patienten (1,8%) war eine Infektion der Grund und vier Patienten (1,8%) hatten ein Rezidiv der vorbestehenden Erkrankung.

Anhand der Transplantatverluste ließ sich durch die Kaplan-Meier Analyse eine Transplantatüberlebensquote von 84% 36 Monate nach Transplantation ermitteln (Abb. 5).

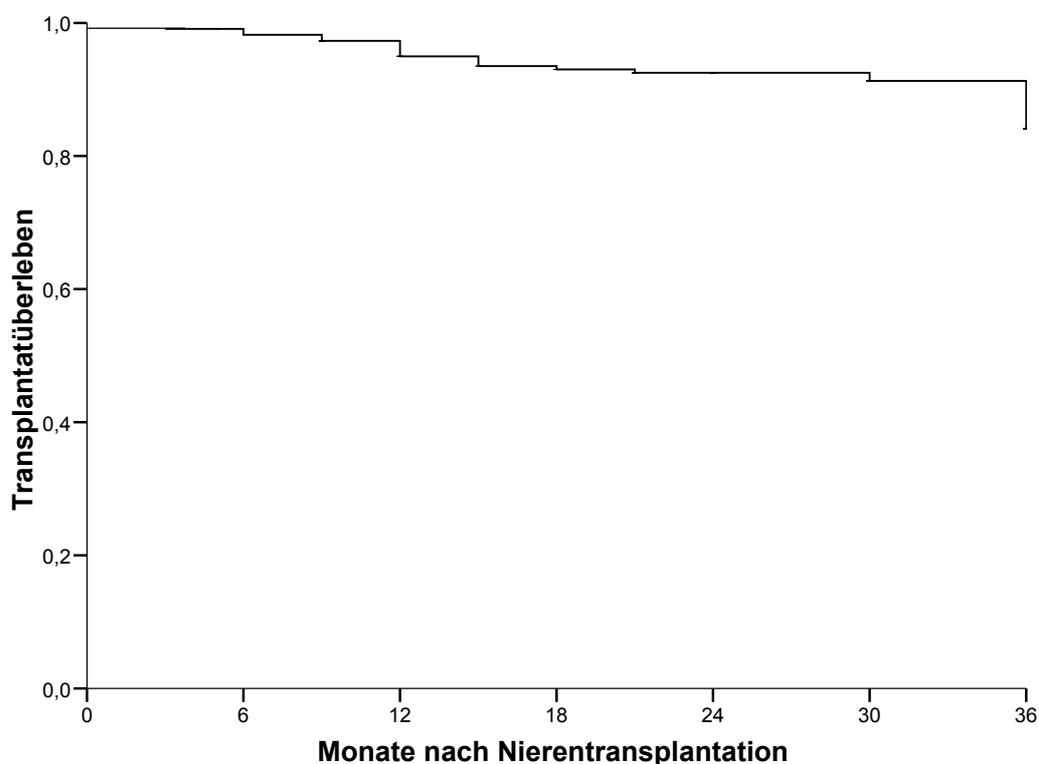


Abb. 5: Kumulative Transplantatüberlebensquote nach Kaplan-Meier, gesamtes Kollektiv $n=224$.

Beim Vergleich zwischen Lebend- und Leichennierentransplantation zeigte sich ein tendenzieller, aber kein signifikanter Unterschied der kumulativen Transplantatüberlebenszeit nach Kaplan-Meier (Abb. 6).

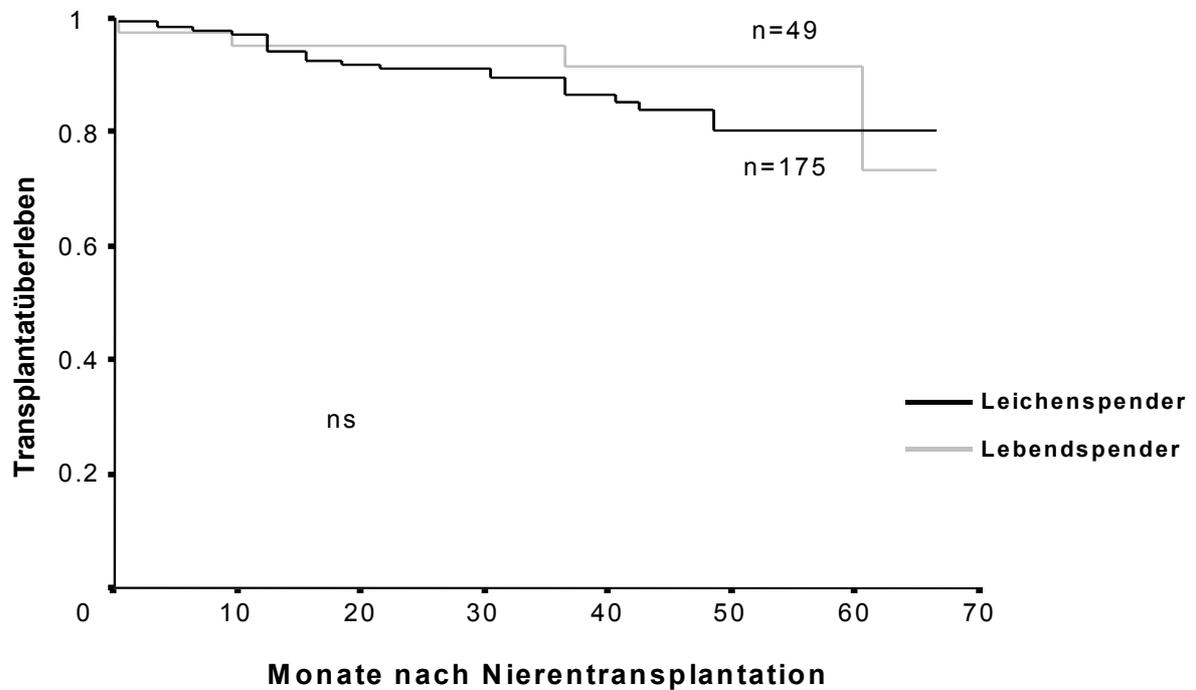


Abb. 6: Transplantatüberleben nach Kaplan-Meier: Lebend- (n=49) gegenüber Leichennierenspende (n=175).

3.2.2 Rejektionen

Im Verlauf konnten bei 115 Patienten akute Abstoßungsreaktionen durch Stanzbiopsie nachgewiesen werden. Bei 70 Patienten trat eine akute Abstoßungsreaktion des Transplantates auf, bei 32 Patienten konnte die akute Abstoßung zweimal nachgewiesen werden. Drei und mehr akute Rejektionen hatten 13 Patienten (Abb. 7).

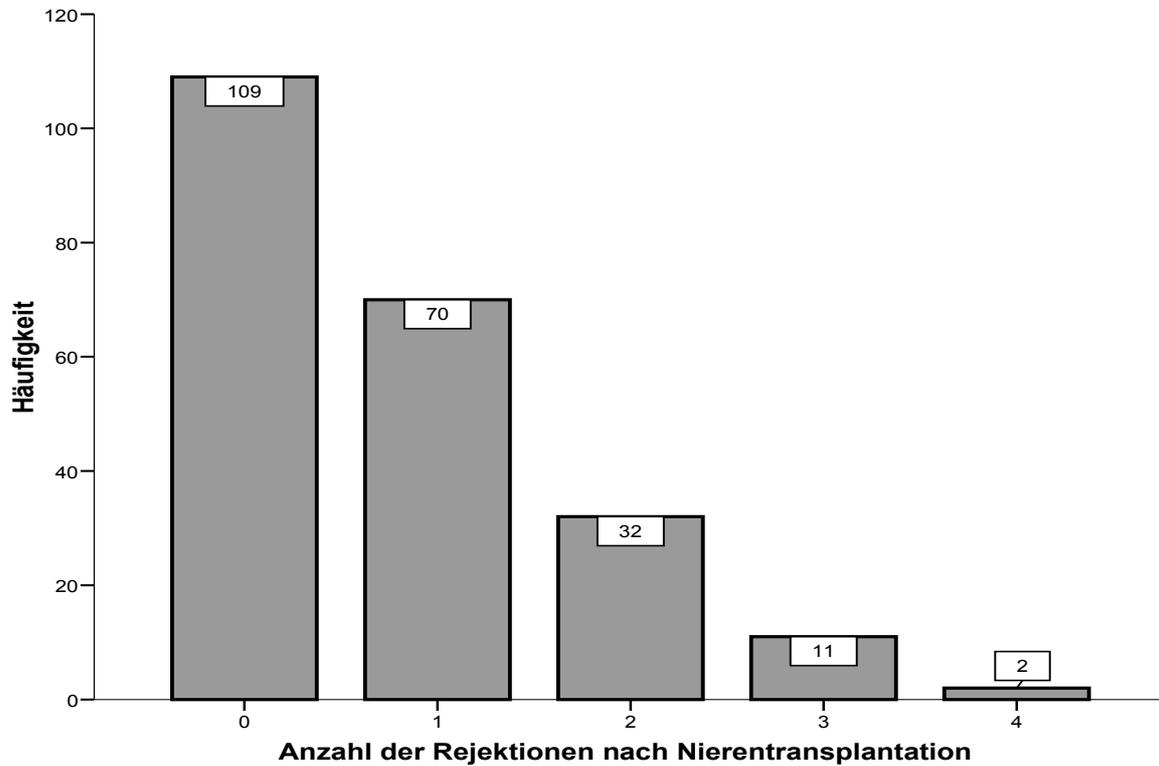


Abb. 7: Anzahl der Rejektionen pro Transplantat nach Nierentransplantation, n=224.

In über 85% der Fälle traten diese akuten Rejektionen im Zeitraum von sechs Monaten nach der Nierentransplantation auf, 71% bereits in den ersten drei Monaten.

3.2.3 Patientenüberleben

In der Beobachtungszeit verstarben fünf Patienten (2,2%) mit intaktem Transplantat aufgrund eines kardiovaskulären Ereignisses. Nach Kaplan-Meier beträgt das kumulative Überleben der Patienten nach 36 Monaten 97% (Abb. 8).

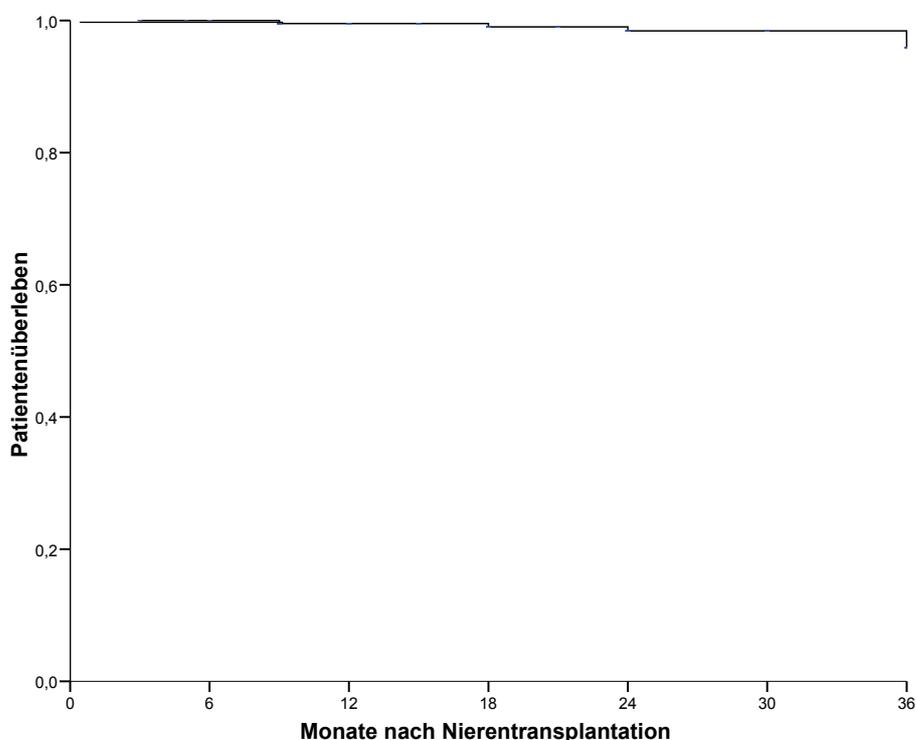


Abb. 8: Kumulative Patientenüberlebenszeit des Kollektivs nach Kaplan-Meier, n=224.

3.3 Allgemeine Spenderdaten

Insgesamt waren 113 Spender männlichen und 109 weiblichen Geschlechts. Bei zwei Spendern fehlten die Angaben zum Geschlecht. Der Hauptteil der Spender lag in der Altersgruppe von 40 bis zu 59 Jahren und in der Altersgruppe von 65 bis 69 Jahren.

3.3.1 Leichennierenspende

Von den untersuchten 224 Nierentransplantatempfängern erhielten 175 ihr Transplantat über eine Leichennierenspende. Der größte Anteil der Spender gehörte der Altersgruppe von 40 bis 59 Jahren (82 Spender) und der Altersgruppe von 65 bis 69 Jahren (22 Patienten) an.

3.3.2 Lebendnierenspende

Die 49 Lebendnierenspenden setzten sich zusammen aus Verwandtennierenspenden und Spenden durch den Ehepartner. Die Geschlechtsverteilung der Spender lag bei 17 Frauen (34,7%) und 32 Männern (65,3%). Der Altersschwerpunkt bewegte sich im Bereich von 50 bis 59 Jahren (20 Patienten = 40,8 %).

3.4 Immunsuppressive Therapie

3.4.1 Verteilung der Immunsuppressiven Medikation auf das Patientengut

Die immunsuppressive Therapie bei Nierentransplantation war in Protokollen festgelegt (vgl. Kapitel 2.5). Als Schwerpunkt wurde in dieser Arbeit die Immunsuppressive Therapie mit Cyclosporin A (CsA) mit der Gabe von Tacrolimus verglichen (Abb. 9). Der Hauptteil der Patienten wurde mit CsA behandelt. Aufgrund von Abstoßungsreaktionen erfolgte im ersten Jahr nach der Transplantation in 62 Fällen eine Umstellung der Immunsuppression von CsA auf Tacrolimus, im zweiten Jahr in 16 Fällen und im dritten Jahr noch in fünf Fällen. Insgesamt waren es 88 Fälle während des Beobachtungszeitraumes. Eine Umstellung aufgrund von Unverträglichkeit eines oder mehrerer Medikamente war im ersten Jahr in 15 Fällen, im zweiten Jahr in vier und im dritten Jahr in zwei Fällen erforderlich. Bei 23 Patienten erfolgte insgesamt die Umstellung bei Unverträglichkeit und bei sieben Patienten war der Grund nicht bekannt.

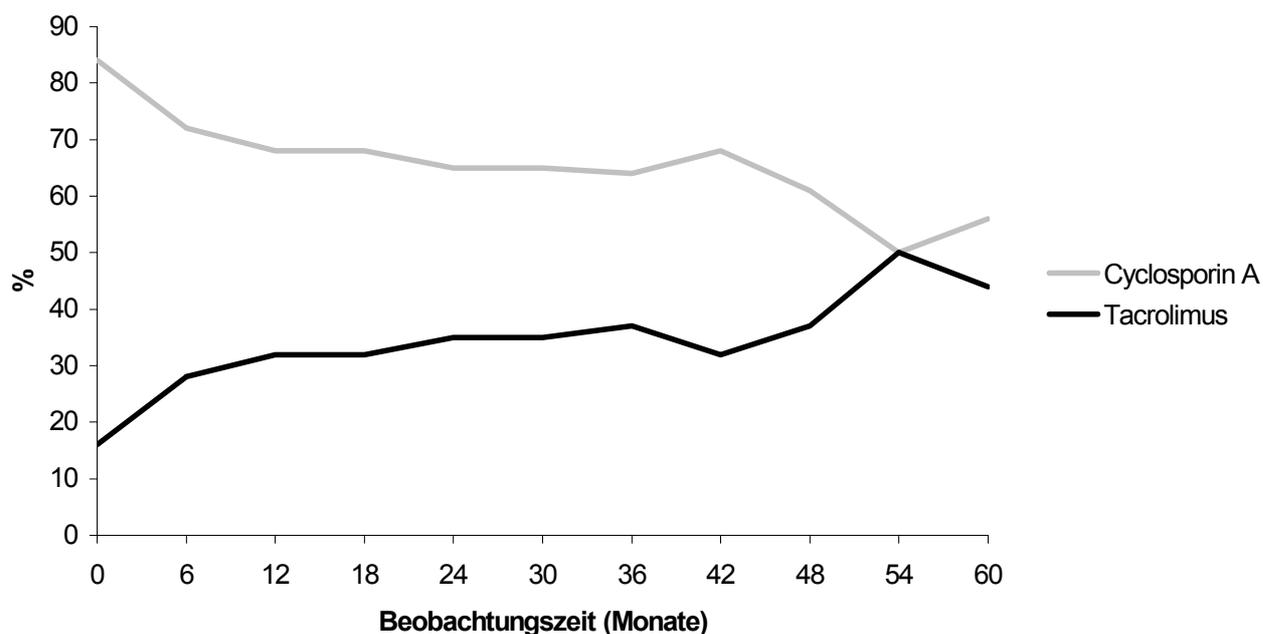
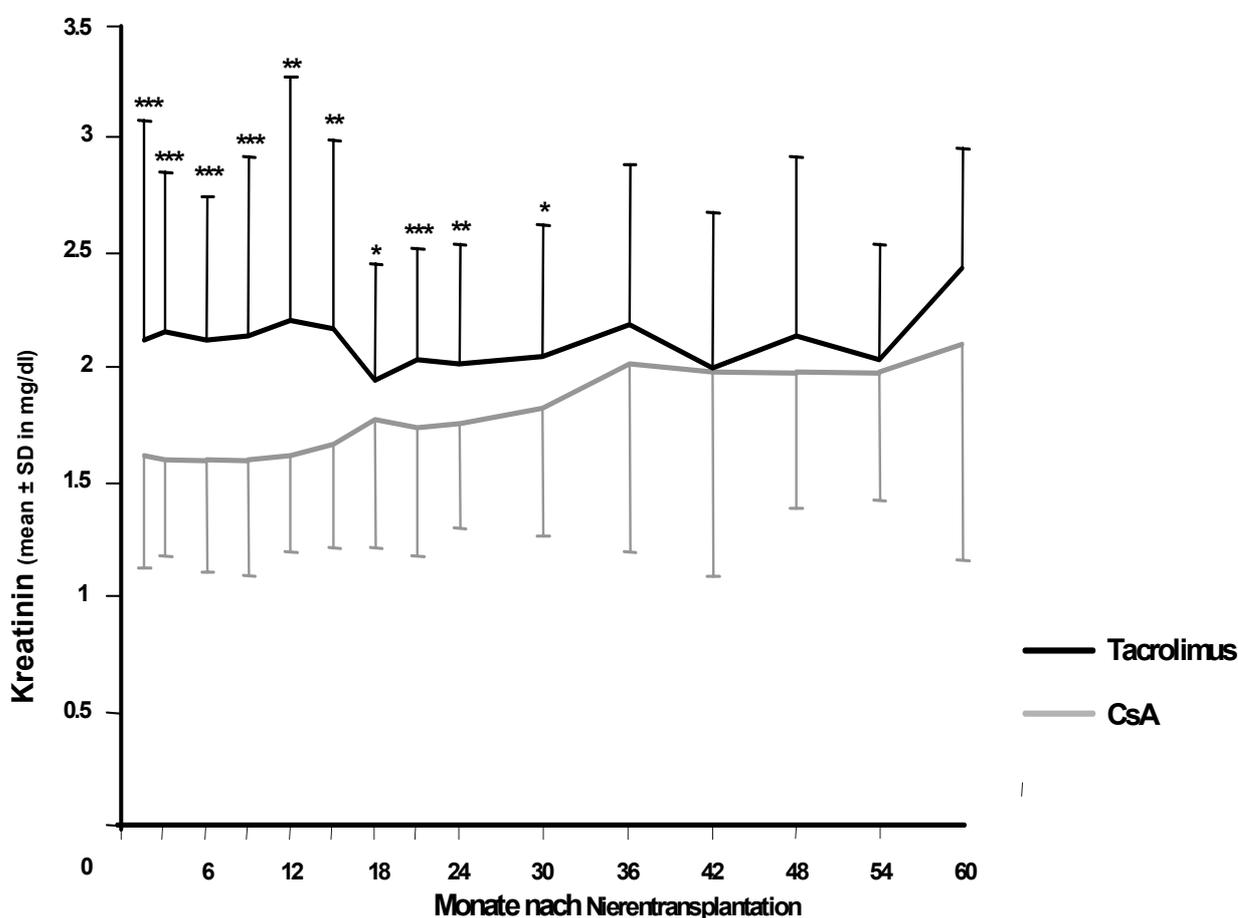


Abb. 9: Gegenüberstellung des Anteils der Immunsuppressiven Therapie in Kombination mit Cyclosporin A (CsA) und der in Kombination mit Tacrolimus an der Anzahl der Patienten, n=224 zum Zeitpunkt 0 der Entlassung.

3.4.2 Einfluss der Immunsuppression auf den Langzeitverlauf nach Nierentransplantation am Beispiel der Serumkreatininspiegel

Der Serumkreatininspiegel wurde herangezogen, um eine Aussage über den Einfluss der Immunsuppression auf den Langzeitverlauf von Nierentransplantaten zu verfolgen. Der Vergleich einer Therapie in Kombination mit Cyclosporin A gegenüber einer mit Tacrolimus zeigte in den ersten 30 Monaten nach Transplantation signifikante Unterschiede (Abb. 10). Der Serumkreatininspiegel lag bei den mit Tacrolimus therapierten Patienten durchschnittlich höher als in der mit CsA therapierten Gruppe. Die Umstellung der Immunsuppression von CsA auf Tacrolimus erfolgte erst bei wiederholten Abstoßungsreaktionen oder bei Unverträglichkeit von CsA.



Legende: *= p<0.05, **= p<0.01, ***= p<0.001

Abb. 10: Mittlere Kreatininwerte der Patienten mit CsA-immunsuppressiver Therapie im Vergleich zu den mit Tacrolimus therapierten Patienten (zum Zeitpunkt 0: n = 224).

3.5 Einfluss der Genpolymorphismen nach Nierentransplantation

3.5.1 Interleukin-10 –1082G/A-Genpolymorphismus

3.5.1.1 Genotypfrequenzen

Es wurden n=224 Patienten auf den Genpolymorphismus IL-10 –1082G/A untersucht. Die Genotypverteilung von high producer (Genotyp GG) und low producer (Genotyp GA und AA) war vergleichbar mit der Kontrollgruppe und entsprach der durch das Hardy-Weinberg-Gesetz berechneten erwarteten Häufigkeit (Abb. 11).

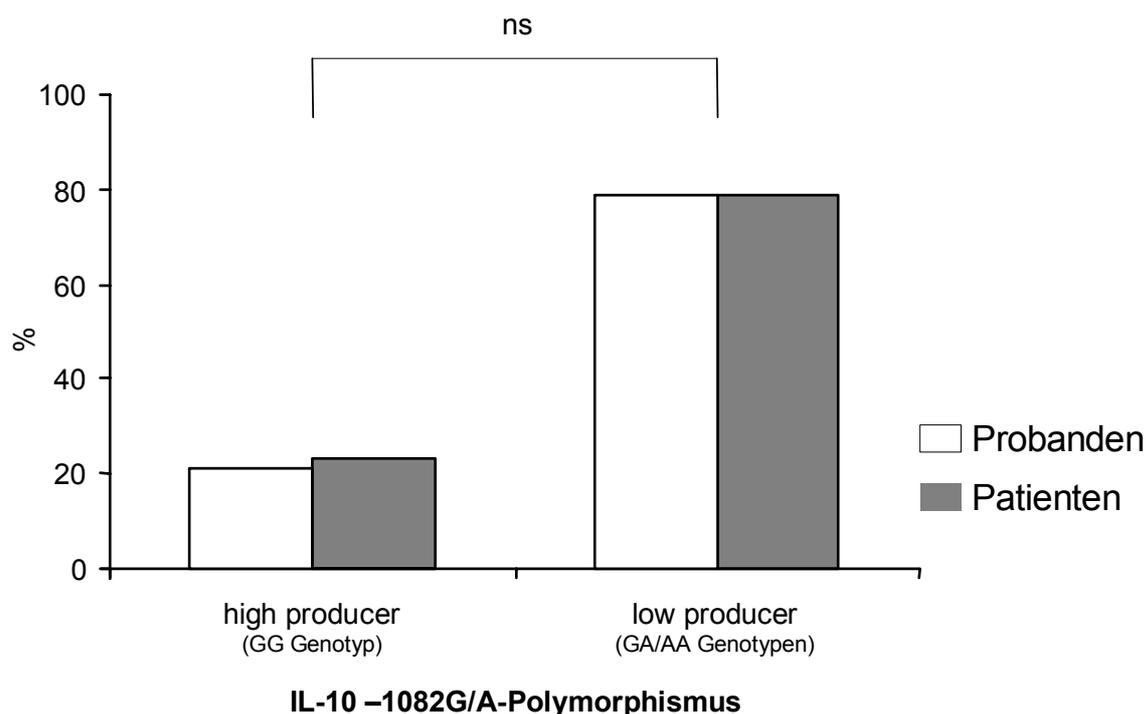


Abb. 11: Genotypverteilung (%) von Patientenkollektiv (n=224) und Kontrollgruppe (n=100) des IL-10 –1082G/A-Polymorphismus: high producer (Genotyp GG) 21% / 22,8%, low producer (Genotyp GA und AA) 79% / 77,2%.

Der Vergleich der Genpolymorphismen des Patientengutes mit denen der nierengesunden Kontrollgruppe zeigte, dass kein Unterschied und damit kein Zusammenhang zwischen der die Niereninsuffizienz verursachenden Grunderkrankung und den Genpolymorphismen bestanden.

Das durchschnittliche Empfängeralter in den Genotypgruppen GG und GA/AA unterschied sich nicht. Es lag bei 48 ± 13 Jahren (ns). Das Spenderalter lag bei GG bei 46 ± 16 Jahren und in der Gruppe GA und AA insgesamt bei 49 ± 15 Jahren (ns). Weiter unterschied sich die Anzahl der HLA-mismatches in beiden Gruppen mit durchschnittlich $2,5 \pm 1,5$ (GG) und $2,6 \pm 1,7$ (GA und AA) nicht signifikant. Die kalte Ischämiezeit betrug sowohl in der high producer Gruppe GG als auch in der low producer Gruppe GA und AA 15 ± 10 Stunden (ns). Die Warmischämiezeit lag bei 27 ± 10 Minuten und 25 ± 11 Minuten (Tabelle 7, S. 42, ns).

3.5.1.2 Einfluss des Interleukin-10 –1082G/A-Genpolymorphismus auf den Verlauf nach Nierentransplantation

Rejektionen

Die beiden Gruppen der high und low producer wurden in Bezug auf das Auftreten von Abstoßungsreaktionen miteinander verglichen. Es konnten dabei keine signifikanten Unterschiede der beiden Genotypen festgestellt werden (Abb. 12).

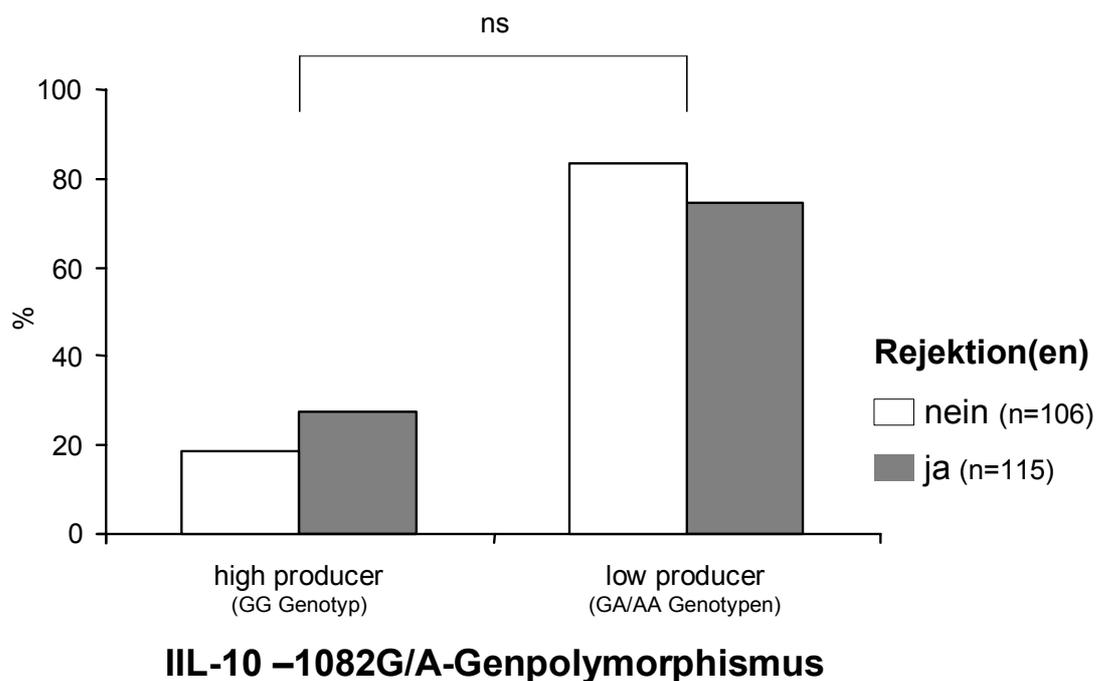


Abb. 12: Rejektion(en): IL-10 –1082G/A Genotypen, high und low producer im Vergleich. Prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der Rejektionen, n=121, drei Angaben fehlend.

Nierenfunktion im Verlauf

Eine weitere Vergleichsmöglichkeit der high producer (GG) und low producer (GA/AA) Genotypen stellte der Verlauf der gemittelten Kreatininwerte über die Beobachtungszeit dar. Dieser Vergleich zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied (Abb. 13).

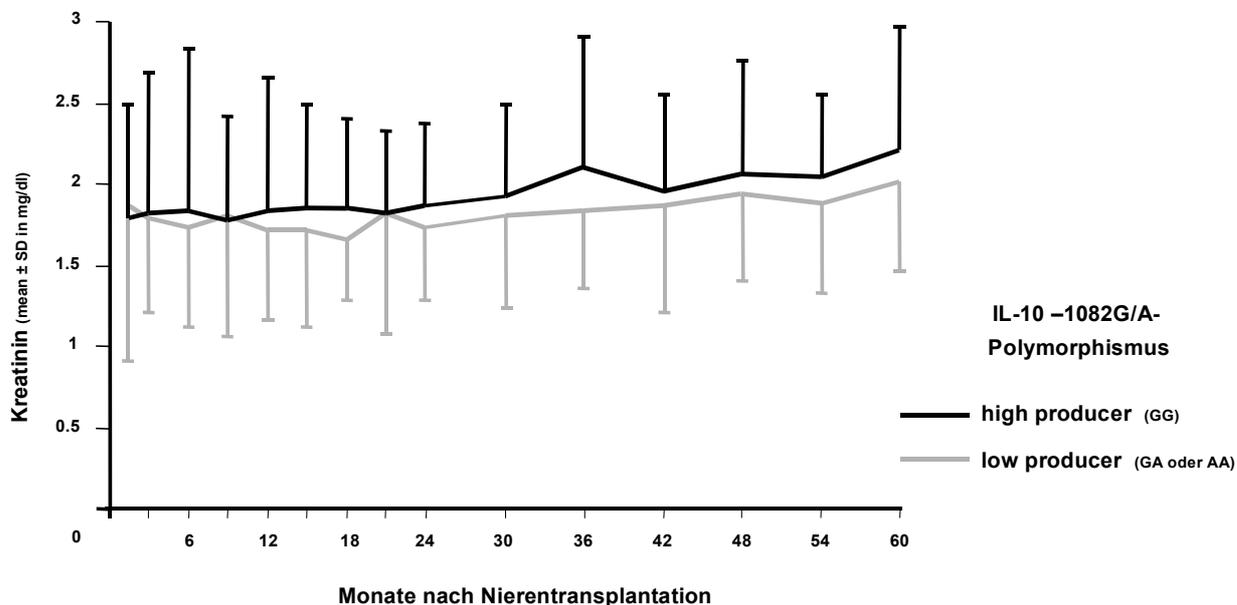


Abb. 13: Kreatininwert \pm Standardabweichung im Verlauf des Beobachtungszeitraumes von 60 Monaten: IL-10 –1082G/A high und low producer Genotypen im Vergleich,

Transplantatüberleben

Bei der Gegenüberstellung der high (GG) und low producer (GA und AA) Genotypen stellten sich bezogen auf den Transplantatverlust und das kumulative Transplantatüberleben keine Unterschiede beim Genpolymorphismus IL-10 –1082G/A heraus (Abb. 14 und 15, ns).

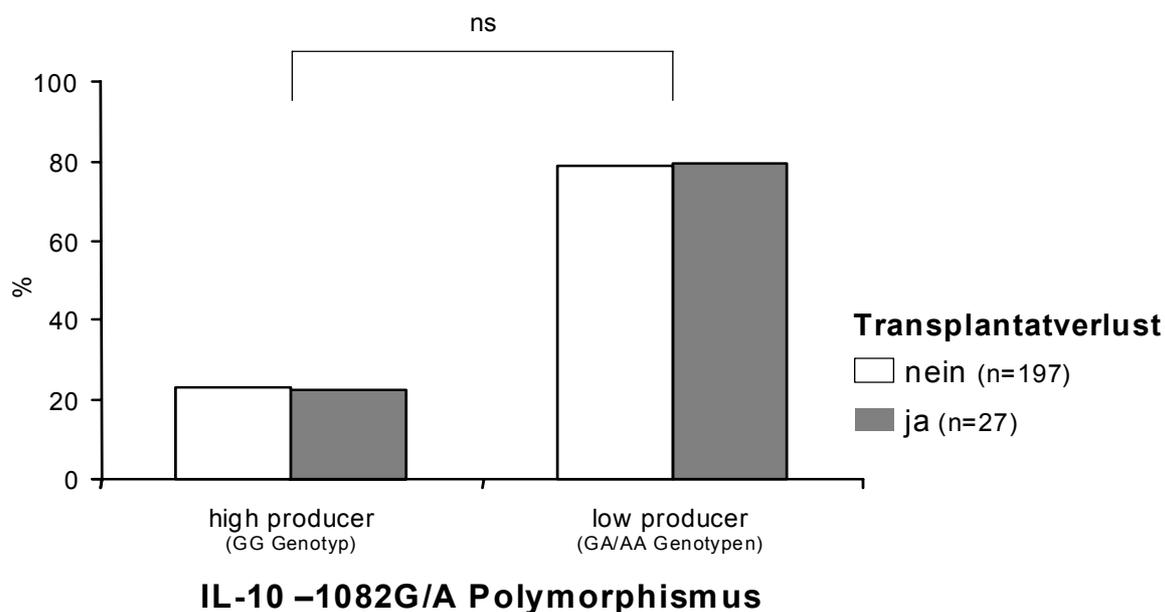


Abb. 14: Transplantatverlust: IL-10 –1082G/A Genotypen, high und low producer im Vergleich, ns.

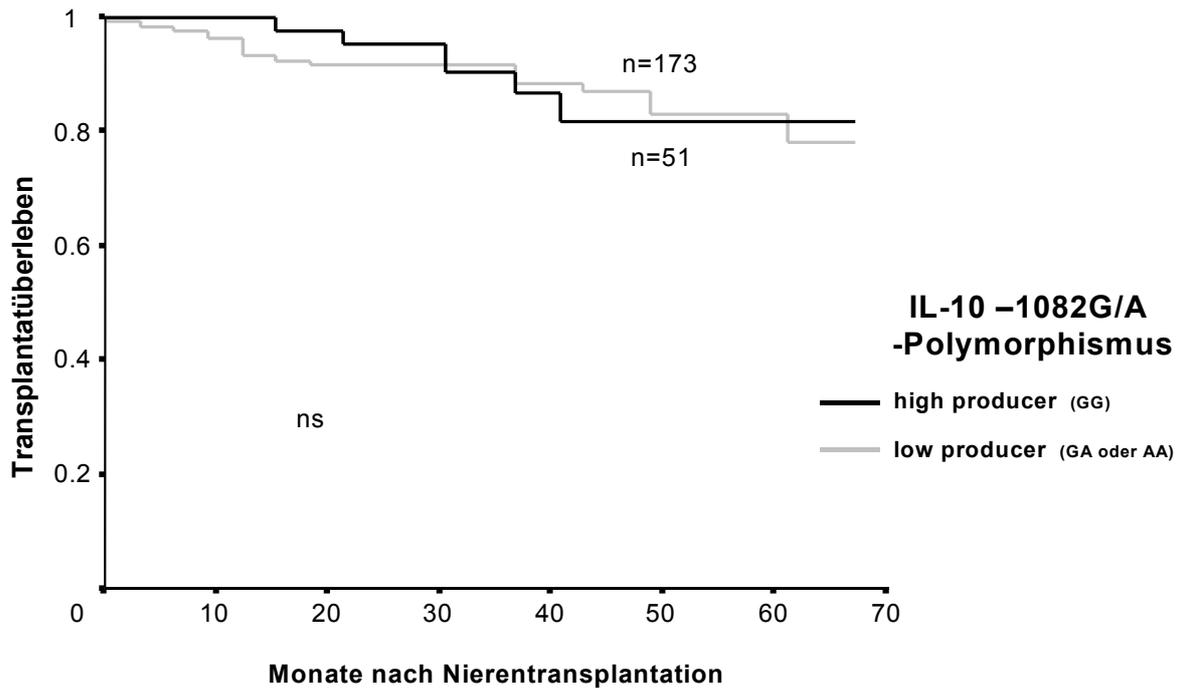
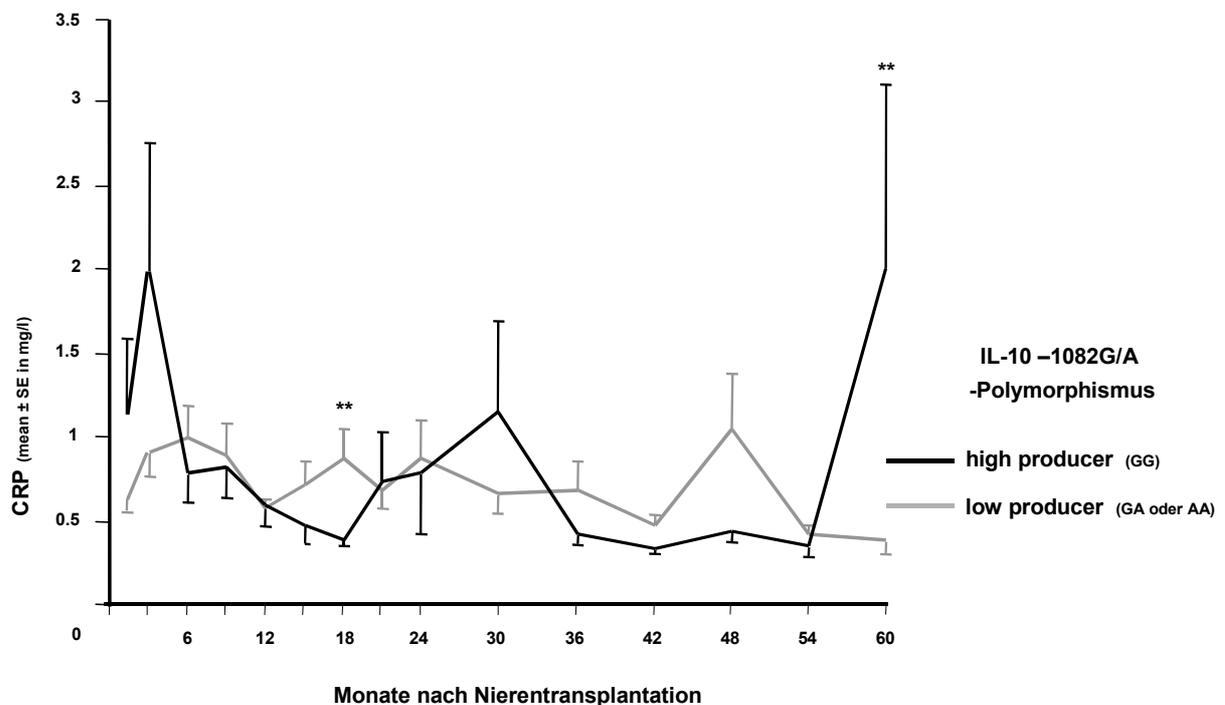


Abb. 15: Kumulatives Transplantatüberleben nach Kaplan-Meier: IL-10 -1082G/A high und low producer Genotypen im Vergleich, ns.

CRP-Verlauf

Beim Vergleich der CRP-Werte im Serum zeigte sich über den Verlauf von 60 Monaten einmalig zum Zeitpunkt von 18 Monaten ein signifikanter Unterschied zwischen dem high producer (GG) und den low producer Typen (GA und AA), $p < 0,01$, (Abb. 16).



Legende: ** = $p < 0.01$

Abb. 16: CRP-Verlauf nach Transplantation bezogen auf den IL-10 -1082G/A-Genpolymorphismus: high producer (GG) und low producer (GA und AA).

3.5.2 Tumornekrosefaktor- α –308G/A-Polymorphismus

3.5.2.1 Genotypfrequenzen

Es wurden n=224 Patienten auf den Genpolymorphismus TNF- α –308G/A-Polymorphismus untersucht. Die Genotypverteilung der Typen high producer (Genotyp GA/AA) und low producer (Genotyp GG) war vergleichbar mit der Kontrollgruppe und entsprach der durch das Hardy-Weinberg-Gesetz berechneten erwarteten Häufigkeit (Abb. 17, ns).

Damit konnte ein Einfluss des Polymorphismus auf die Nierengrunderkrankungen und somit auf die Zusammenstellung des Patientenkollektivs ausgeschlossen werden.

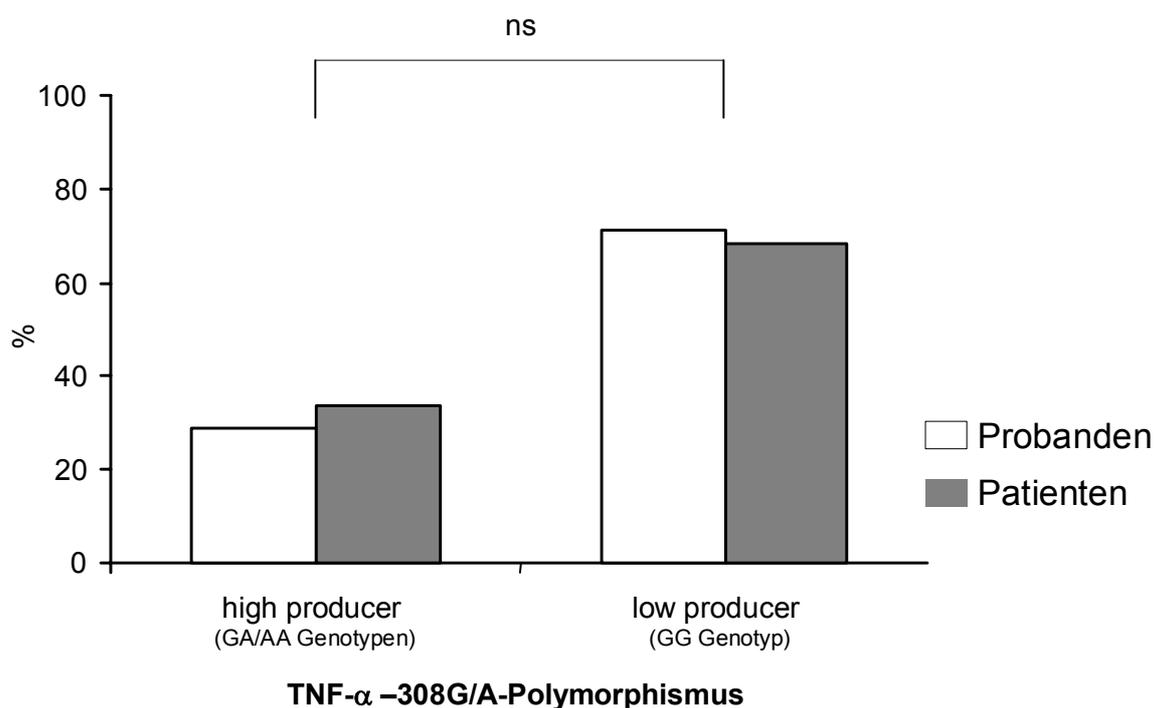


Abb.17: Genotypverteilung (%) von Patientenkollektiv (n=224) und Kontrollgruppe (n=100) des TNF- α –308G/A-Polymorphismus: high producer (Genotyp GA und AA) 29% / 33%, low producer (Genotyp GG) 71% / 67 %.

Das durchschnittliche Empfängeralter lag beim low producer Typ GG bei 47 ± 13 Jahren und in der high producer Gruppe GA/AA bei 50 ± 13 Jahren. Das Spenderalter lag bei GG bei 49 ± 14 Jahren und bei GA/AA bei 49 ± 16 Jahren, ns. Weiter unterschieden sich die Anzahl der HLA-mismatches in beiden Gruppen mit $2,7\pm 1,7$ (GG) und $2,3\pm 1,6$ (GA/AA) nicht signifikant. Die Kaltischämiezeit betrug in der low producer Gruppe 14 ± 10 Stunden und in der high producer Gruppe 16 ± 10 Stunden. Die Warmischämiezeit lag bei 25 ± 12 und bei 25 ± 10 Minuten (Tabelle 7, S. 42).

3.5.2.2 Einfluss des TNF- α -308G/A-Polymorphismus auf den Verlauf nach Nierentransplantation

Rejektionen

Das Auftreten von mindestens einer biopsiebelegten Rejektion nach Nierentransplantation wurde in den Gruppen der high (GA/AA) und low producer (GG) miteinander verglichen. Es konnten dabei keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 18).

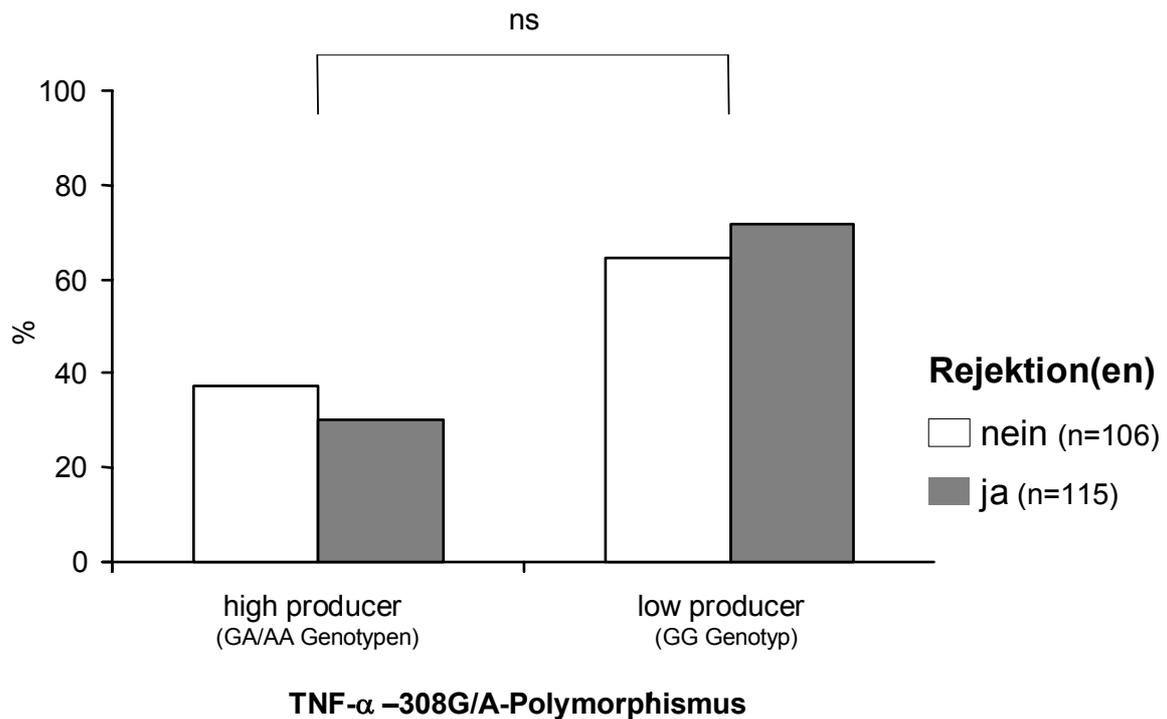


Abb. 18: Rejektion(en): TNF- α -308G/A-Polymorphismus Genotypen, high und low producer im Vergleich. Prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der Rejektionen, n=221.

Nierenfunktion im Verlauf

Die Darstellung der gemittelten Kreatininwerte über den Beobachtungszeitraum von 60 Monaten lässt ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der beiden untersuchten Genotypen des TNF- α erkennen (Abb. 19).

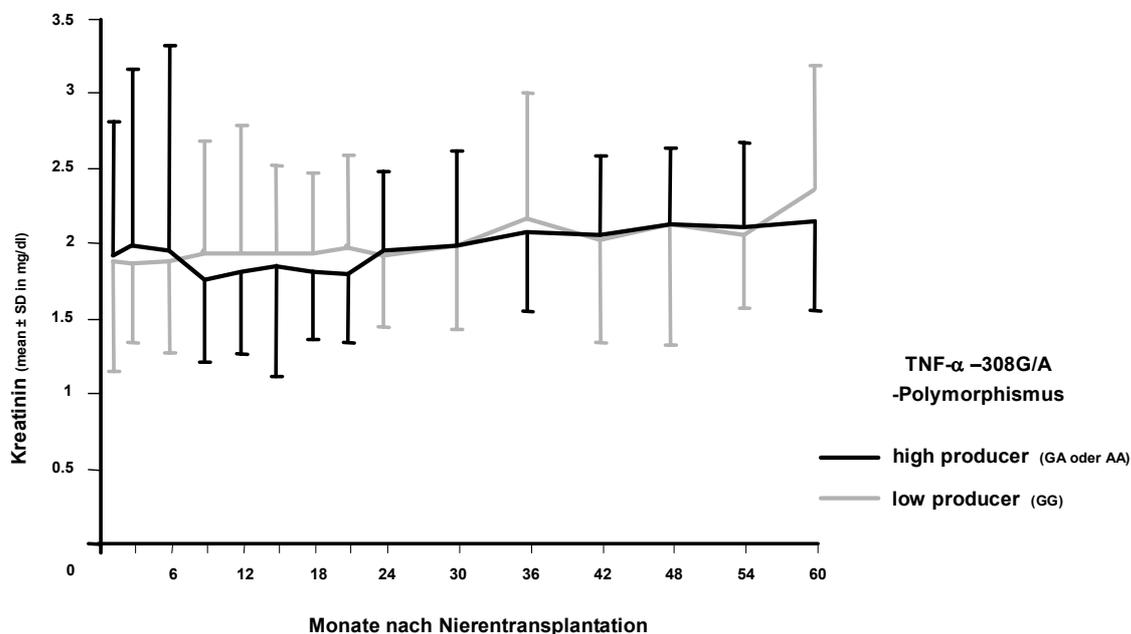


Abb. 19: Kreatininwert \pm Standardabweichung im Verlauf des Beobachtungszeitraumes von 60 Monaten: TNF- α -308G/A-Polymorphismus high und low producer Genotypen im Vergleich

Transplantatüberleben

Eine abschließende Untersuchung bezogen auf die Anzahl der Transplantatverluste und das kumulative Transplantatüberleben nach Kaplan-Meier konnte keine Unterschiede der high und low producer Genotypen des TNF- α Gens -308G/A feststellen (Abb. 20 und 21).

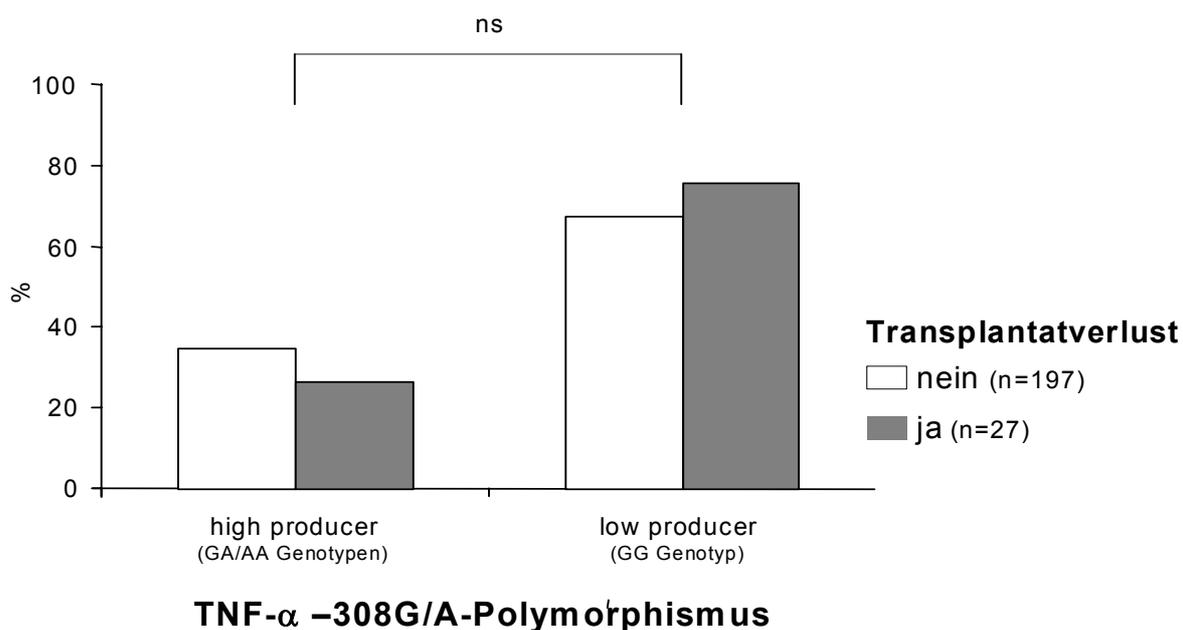


Abb. 20: Transplantatverlust: TNF- α -308G/A Genotypen, high und low producer im Vergleich, ns.

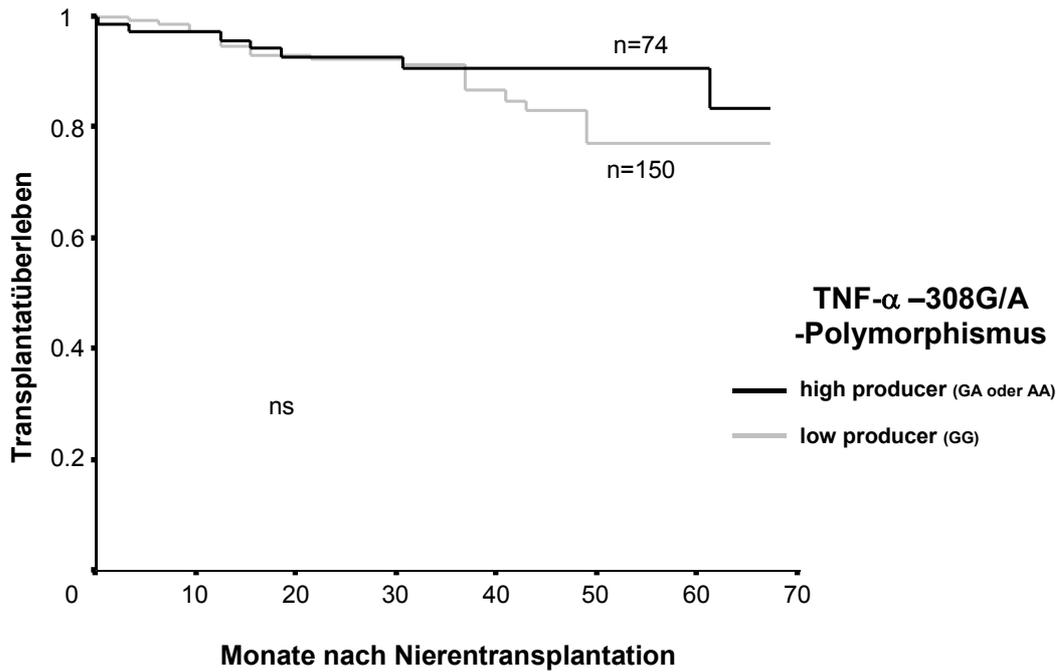


Abb. 21: Kumulatives Transplantatüberleben nach Kaplan-Meier: TNF- α -308G/A high und low producer Genotypen im Vergleich, ns.

CRP-Verlauf

Beim Vergleich der CRP-Werte im Serum zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Typen high producer (GA/AA) und low producer (GG) (Abb. 22).

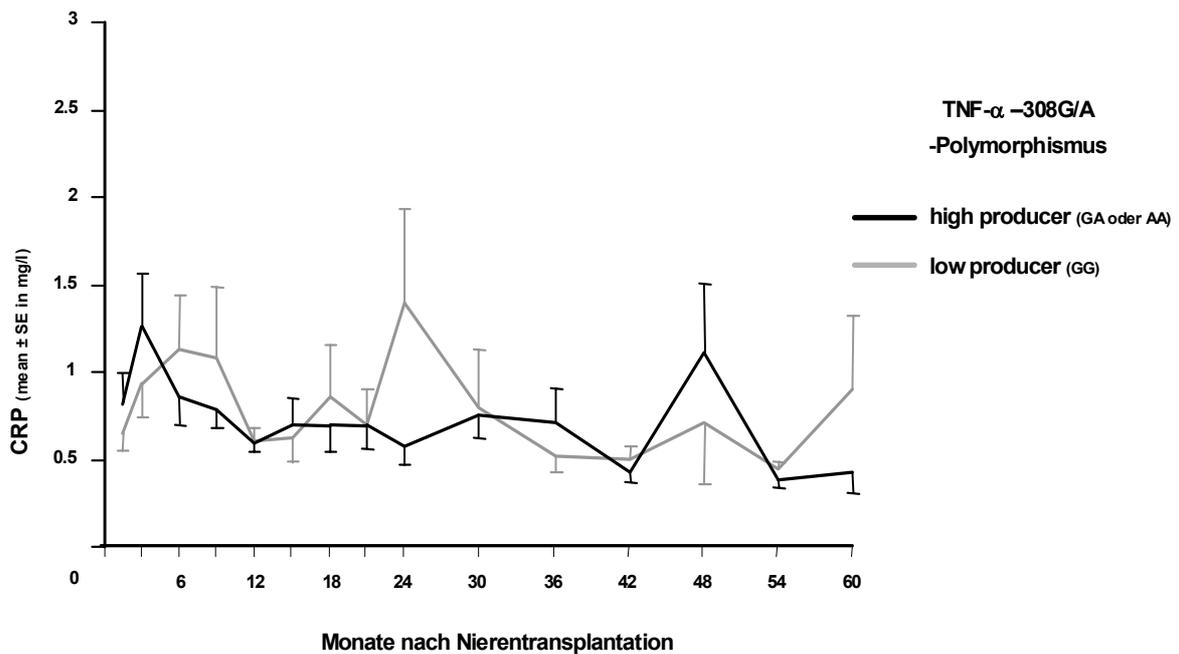
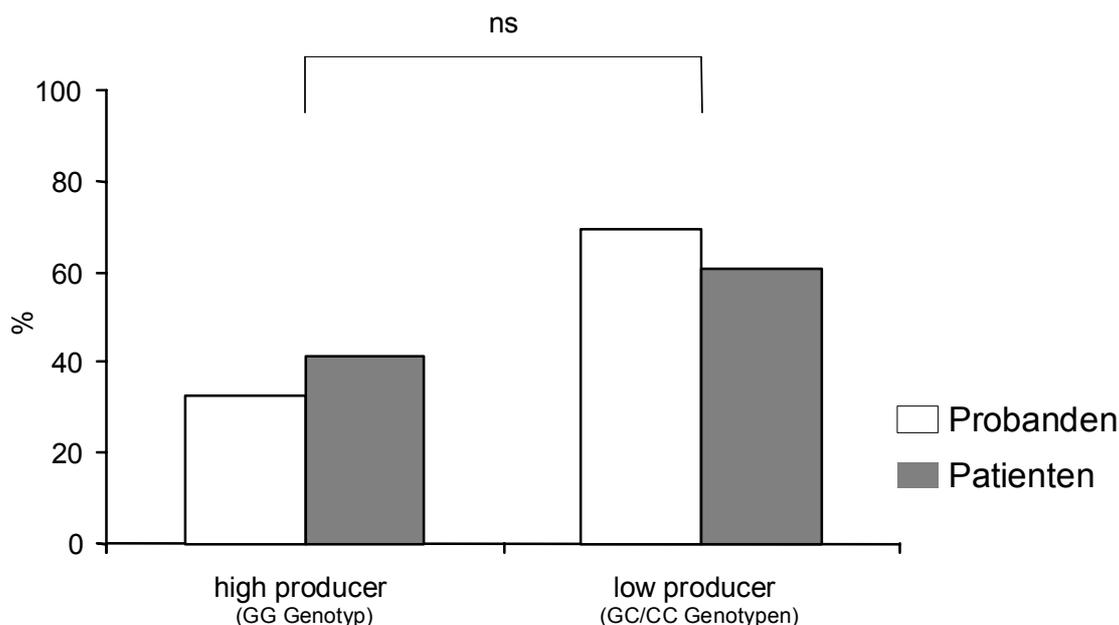


Abb. 22: CRP-Verlauf (mg/dl) nach Transplantation bezogen auf den TNF- α -308G/A-Polymorphismus: high producer (GA und AA) und low producer (GG), ns.

3.5.3 Interleukin 6 –174G/C-Genpolymorphismus

3.5.3.1 Genotypfrequenzen

Das Patientengut von n=224 Patienten wurde ebenfalls auf den –174G/C-Genpolymorphismus des IL-6 Gens untersucht. Die Genotypverteilung der high producer (GG) und low producer (GC und CC) war vergleichbar mit der Kontrollgruppe und der durch das Hardy-Weinberg-Gesetz bestimmten erwarteten Häufigkeit (Abb. 23).



Interleukin 6 –174G/C-Polymorphismus

Abb. 23: Genotypverteilung (%) von Patientenkollektiv (n=224) und Kontrollgruppe (n=100) des –174G/C-Genpolymorphismus: high producer (GG Genotyp) 40,6% / 32%, low producer (GC/CC Genotyp) 59,4% / 68 %.

Ein Zusammenhang zwischen der Genpolymorphismusverteilung und einer Nierengrund-erkrankung konnte durch einen Vergleich der Verteilung im Patientenkollektiv mit der in der Kontrollgruppe ausgeschlossen werden.

Beim Empfängeralter wie auch beim Spenderalter konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Das Empfängeralter lag in der high producer Gruppe GG bei 49 ± 12 und in der low producer Gruppe GC/CC bei 47 ± 13 Jahren. Das durchschnittliche Spenderalter betrug 48 ± 15 und 49 ± 15 Jahre. Bei der GG-Variation gab es $2,5 \pm 1,6$ und bei der GC/CC-Gruppe $2,7 \pm 1,7$ HLA-mismatches. Als weiteren möglichen Einflussfaktor verglichen wir die Kalt- und Warmischämiezeit. Die Kaltischämiezeit betrug in der high- und low producer Gruppe 16 ± 10 und 15 ± 10 Stunden und bei der Warmischämiezeit 26 ± 11 und 24 ± 11 Minuten, ns (Tabelle 7, S. 42).

3.5.3.2 Einfluss des Interleukin 6 –174G/C-Genpolymorphismus auf den Verlauf nach Nierentransplantation

Rejektionen

Die high (GG) und low producer (GC/CC) Genotypen wurden in Bezug auf das Auftreten mindestens einer biopsiegesicherten Abstoßungsreaktion untersucht. Hierbei kamen keine signifikanten Unterschiede der beiden Gruppen zum Vorschein (Abb. 24).

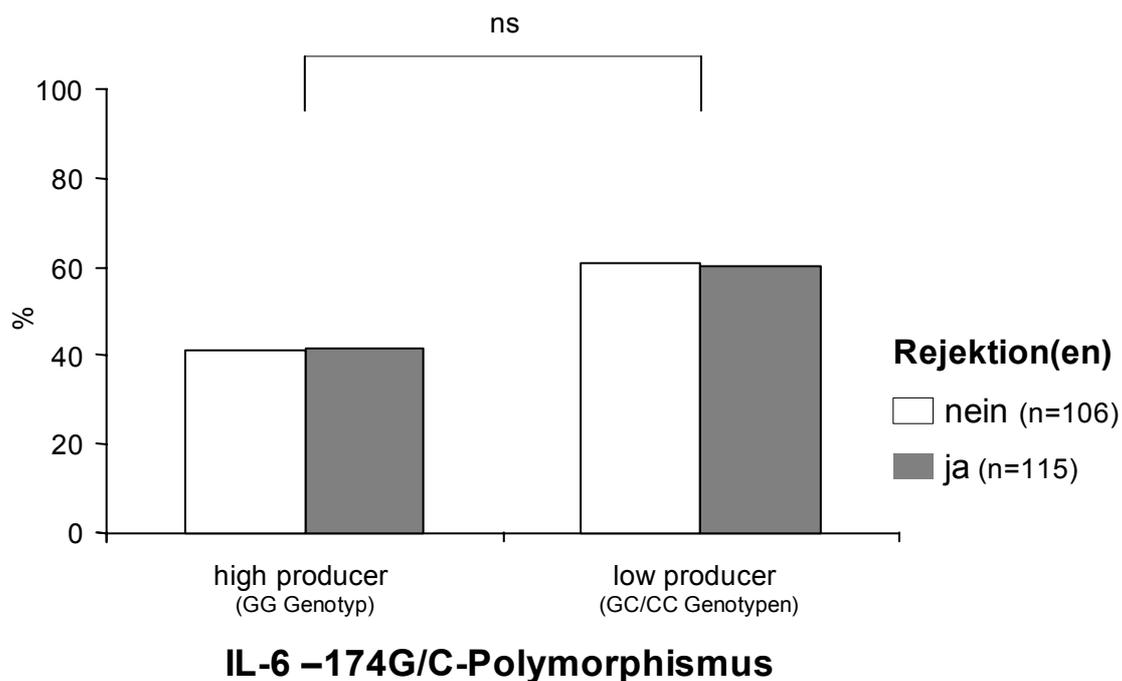


Abb. 24: Rejektion(en): IL-6 –174G/C Genotypen, high und low producer im Vergleich. Prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der Rejektionen, n=221, drei fehlende Angaben.

Nierenfunktion im Verlauf

Die Darstellung der gemittelten Kreatininwerte über den Beobachtungszeitraum von 60 Monaten lässt ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der beiden untersuchten Genotypen des IL-6 Gens erkennen (Abb. 25).

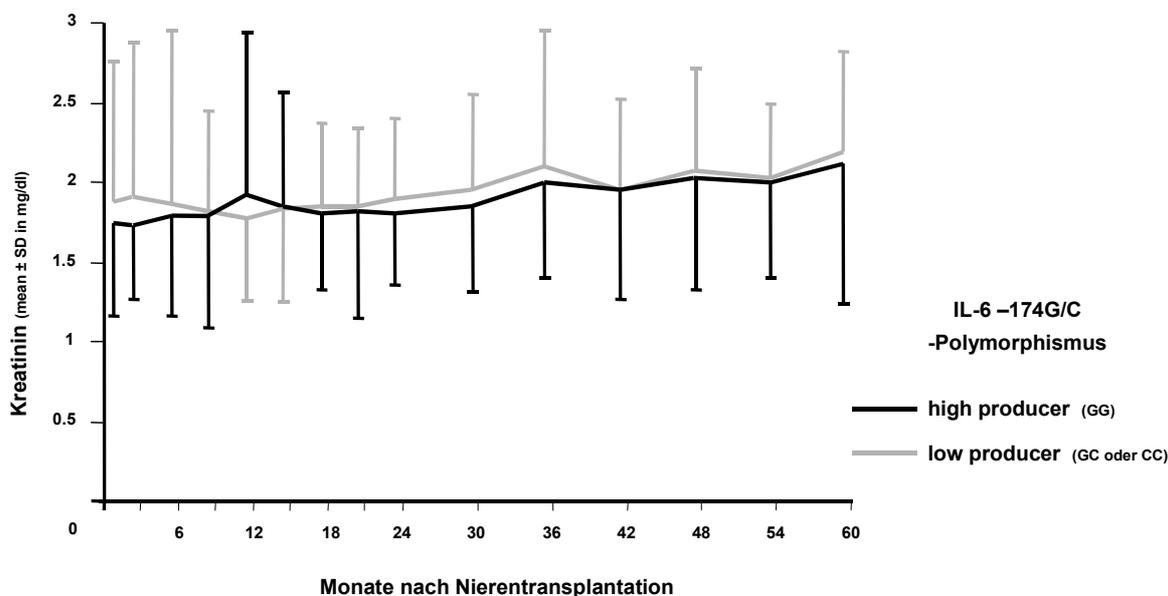


Abb. 25: Kreatininmittelwert \pm Standardabweichung im Verlauf des Beobachtungszeitraumes von 60 Monaten: IL-6 -174G/C high und low producer Genotypen im Vergleich.

Transplantatüberleben

Die Ermittlung von möglichen Unterschieden der high und low producer Genotypen des IL-6 Gens in Bezug auf die Anzahl von Transplantatverlusten und das kumulative Transplantatüberleben nach Kaplan-Meier ergab keine signifikanten Ergebnisse (Abb. 26 und 27).

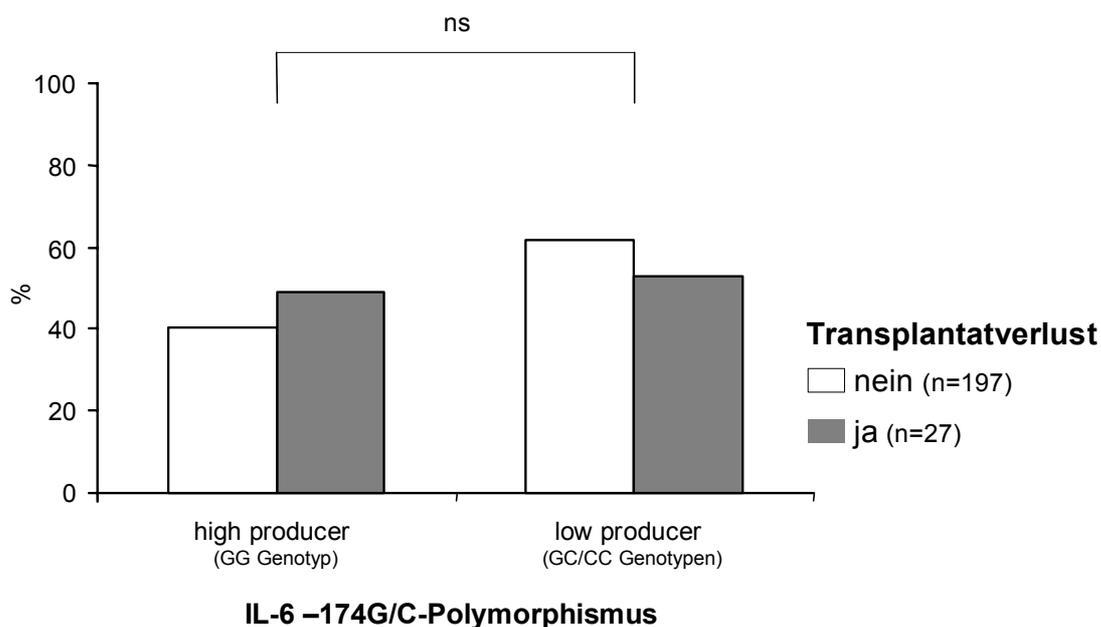


Abb. 26: Transplantatverlust: IL-6 -174G/C Genotypen, high und low producer im Vergleich.

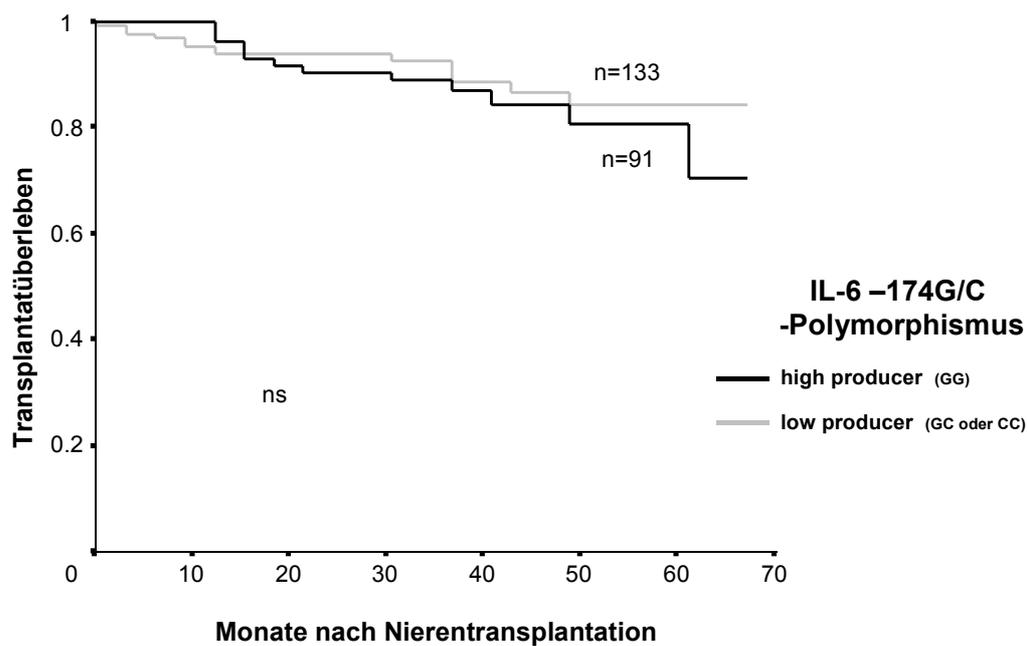


Abb. 27: Kumulatives Transplantatüberleben nach Kaplan-Meier: IL-6 -174G/C high und low producer Genotypen im Vergleich.

CRP-Verlauf

Beim Vergleich der CRP-Werte im Serum zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem high producer (GG) und dem low producer Typ (GC und CC) (Abb. 28).

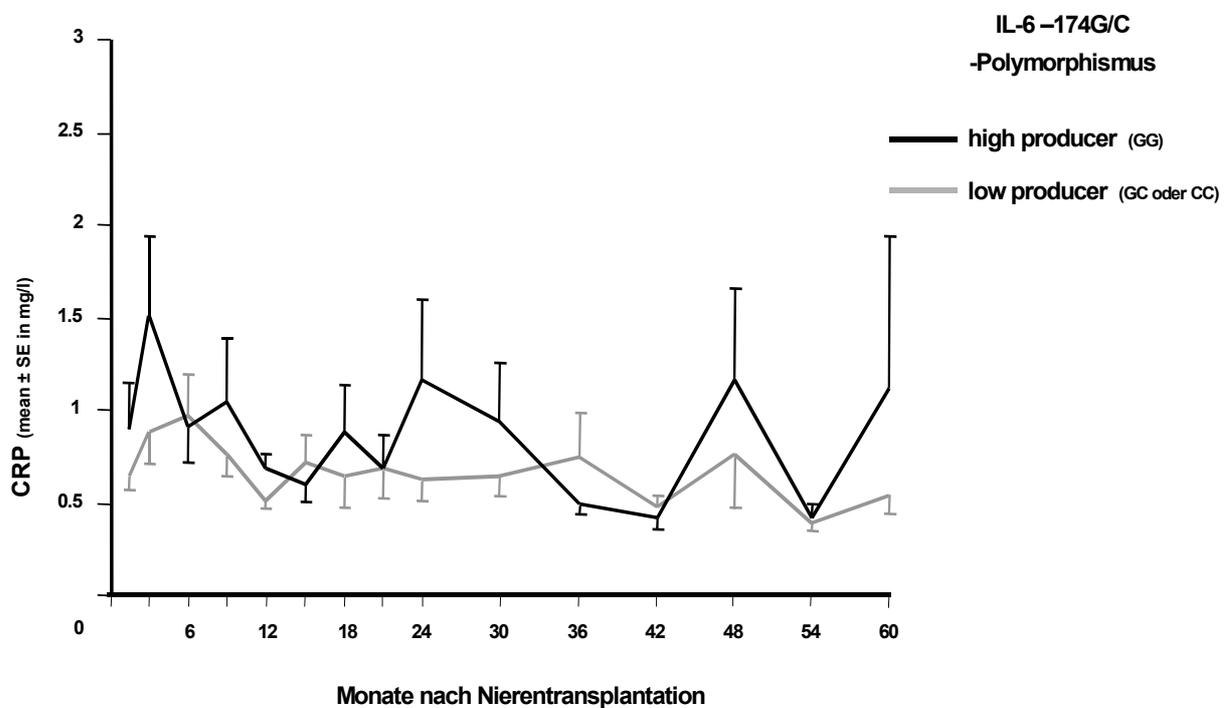


Abb. 28: CRP-Verlauf (mg/dl) nach Transplantation bezogen auf den IL-6 -174G/C-Polymorphismus: high producer (GG) und low producer (GC und CC), ns.

3.5.4 Vergleich der Genotypen unter Zusatzbedingungen

3.5.4.1 Akutes Nierenversagen

Die jeweiligen Genpolymorphismen wurden bezüglich des Auftretens von akutem Nierenversagen (ANV) gegenüber spontaner sofortiger Funktionsaufnahme nach Transplantation verglichen.

Beim *IL-10* –1082G/A Genpolymorphismus trat ein akutes Nierenversagen beim GG-Typ in 17 Fällen (33,2%) innerhalb von drei Monaten nach Transplantation und in einem Fall (2%) nach mehr als 12 Monaten auf. Im Vergleich dazu zeigte sich beim GA/AA-Typ bei 37 Patienten (21,4%) ein akutes Nierenversagen innerhalb von drei Monaten und bei einem Patienten (0,6%) nach mehr als 12 Monaten.

Der untersuchte *TNF- α* –308G/A Gen-polymorphismus zeigte beim low producer GG bei 41 Patienten (27,3%) ein ANV innerhalb von drei Monaten und in einem Fall (0,7%) ein Versagen nach über 12 Monaten. Beim high producer GA/AA konnte bei 13 Patienten (17,6%) ein ANV innerhalb von drei Monaten und bei einem Patienten (1,4%) nach über 12 Monaten verzeichnet werden.

Im Falle des *IL-6* –174G/C Genpolymorphismus trat beim GG-Typ bei 21 Nierentransplantierten (23,1%) ein akutes Nierenversagen innerhalb von drei Monaten und bei einem Patienten (1,1%) ein ANV nach über 12 Monaten auf. Der GA/AA-Typ wies in 33 Fällen (24,8%) ein akutes Nierenversagen innerhalb von drei Monaten und ein ANV (0,8%) nach über 12 Monaten auf.

Es zeigten sich hierbei insgesamt keine signifikanten Unterschiede.

3.5.4.2 HLA-DR mismatch

Die Analyse wurde ferner anhand einer Kombination der untersuchten Genpolymorphismen mit der Anzahl von HLA-DR mismatches durchgeführt. Es konnte kein signifikanter Unterschied der jeweiligen high oder low producer Genotypen in Kombination mit HLA-DR mismatches in Bezug auf das Auftreten von Abstoßungsreaktionen (Tabelle 4, 5 und 6) oder von Transplantatverlust (data not shown, ns) gefunden werden.

Tabelle 4 : Vergleich des Auftretens von Rejektionen bei den IL-10 –1082G/A Genotypen in Kombination mit dem Auftreten von ein oder zwei HLA-DR mismatches, ns.

		Rejektion		
		nein	ja	Gesamt
IL-10 –1082G/A in Kombination mit HLA-DR mismatch	GG	11	24	35
	% von Rejektion	18,6%	27,6%	24,0%
	GA/AA	48	63	111
	% von Rejektion	81,4%	72,4%	76,0%
Gesamt		59	87	146

Tabelle 5 : Vergleich des Auftretens von Rejektionen bei den TNF- α –308G/A Genotypen in Kombination mit dem Auftreten von ein oder zwei HLA-DR mismatches, ns.

		Rejektion		
		nein	ja	Gesamt
TNF- α –308G/A in Kombination mit HLA-DR mismatch	GG	37	62	35
	% von Rejektion	62,7%	71,3%	67,8%
	AA/GA	22	25	47
	% von Rejektion	37,3%	28,7%	32,2%
Gesamt		59	87	146

Tabelle 6 : Vergleich des Auftretens von Rejektionen bei den IL-6 –174G/C Genotypen in Kombination mit dem Auftreten von ein oder zwei HLA-DR mismatches, ns.

		Rejektion		
		nein	ja	Gesamt
IL-6 –174G/C in Kombination mit HLA-DR mismatch	GG	24	34	58
	% von Rejektion	40,7%	39,1%	39,7%
	GC/CC	35	53	88
	% von Rejektion	59,3%	60,9%	60,3%
Gesamt		59	87	146

3.5.4.3 Alternative Gruppeneinteilung des Interleukin-6 –174G/C- Polymorphismus

Die Untersuchung der Rejektionsanzahl und des Transplantatverlustes wurde auch in der Zuordnung der intermediären Gruppe GC zur high producer Gruppe GG durchgeführt.

Rejektionen

Die alternativen high (GG und GC) und low producer (CC) Genotypen wurden in Bezug auf das Auftreten mindestens einer biopsiesicheren Abstoßungsreaktion untersucht. Hierbei kamen keine signifikanten Unterschiede der beiden Gruppen zum Vorschein (Abb. 29).

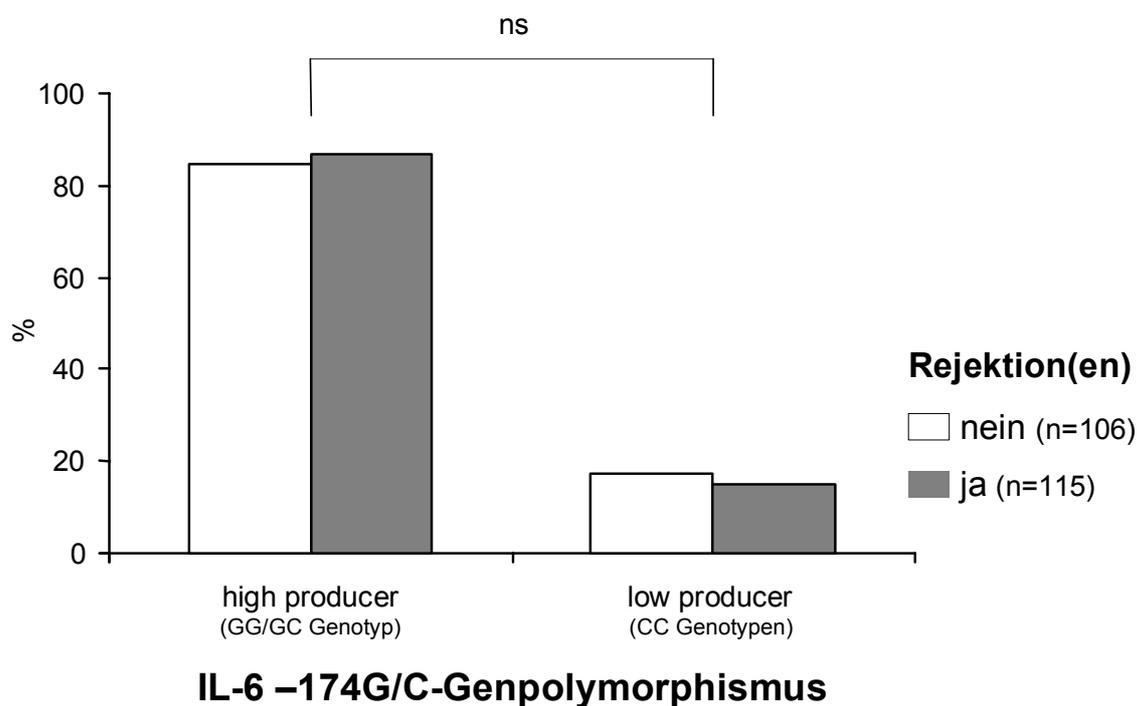


Abb. 29: Rejektion(en): Alternative IL-6 –174G/C Genotypen, high und low producer im Vergleich. Prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der Rejektionen, n=221, drei fehlende Angaben.

Transplantatverlust

Beim Vergleich der beiden alternativen IL-6 Produktionsgruppen GG/GC und CC wurde kein signifikanter Unterschied im Auftreten von Transplantatverlusten offensichtlich (Abb. 30).

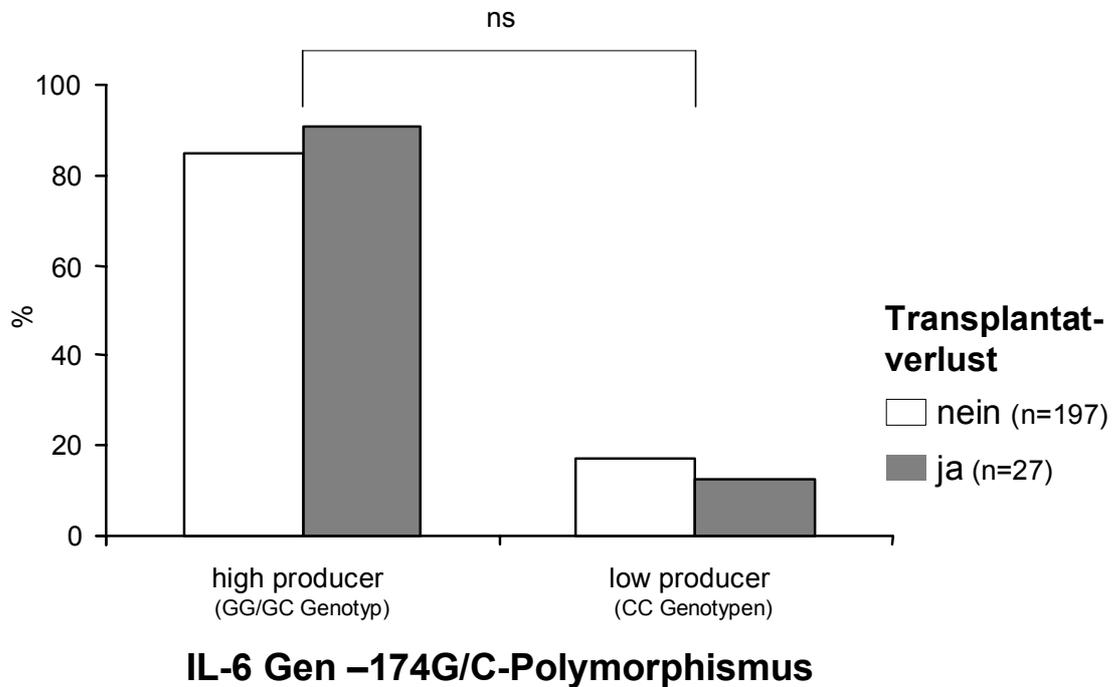


Abb. 30: Transplantatverlust in den alternativen Genotypen high und low producer des IL-6 -174G/C-Polymorphismus. Prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der Transplantatverluste, n=224.

Tabelle 7: IL-10, TNF- α und IL-6-Genpolymorphismen im Vergleich bezogen auf das Alter des Empfängers, des Spenders, die Anzahl der HLA-mismatches und die Kalt- und Warmischämiezeit, ns.

	IL-10-Genpolymorphismus				TNF- α -Genpolymorphismus				IL-6-Genpolymorphismus				
	GG	GA	AA	GA/AA	GG	GA	AA	GA/AA	GG	GC	CC	GC/CC	GC/GG alternativ
Alter Empfänger (Jahre)	48 \pm 13	48 \pm 13	47 \pm 13	48 \pm 13	47 \pm 13	49 \pm 13	50 \pm 14	50 \pm 13	49 \pm 12	47 \pm 13	47 \pm 13	47 \pm 13	48 \pm 13
Alter Spender (Jahre)	46 \pm 16	51 \pm 14	46 \pm 15	49 \pm 15	49 \pm 14	49 \pm 16	43 \pm 17	49 \pm 16	48 \pm 15	49 \pm 15	48 \pm 16	49 \pm 15	49 \pm 15
Anzahl HLA- mismatches	2,5 \pm 1,5	2,7 \pm 1,7	2,4 \pm 1,7	2,6 \pm 1,7	2,7 \pm 1,7	2,4 \pm 1,7	2,1 \pm 1,5	2,3 \pm 1,6	2,5 \pm 1,6	2,7 \pm 1,7	2,5 \pm 1,7	2,7 \pm 1,7	2,6 \pm 1,7
Kaltischämiezeit (h)	15 \pm 10	15 \pm 10	15 \pm 11	15 \pm 10	16 \pm 10	14 \pm 11	15 \pm 7	14 \pm 10	16 \pm 10	16 \pm 10	16 \pm 10	15 \pm 10	16 \pm 10
Warmischämiezeit (min)	27 \pm 10	25 \pm 11	24 \pm 11	25 \pm 11	25 \pm 10	25 \pm 12	23 \pm 14	25 \pm 12	26 \pm 11	24 \pm 10	24 \pm 11	24 \pm 11	25 \pm 11

4 Diskussion

Wir haben in unserer Studie den möglichen Einfluss von immunregulierenden Zytokinen am Beispiel von IL-10, TNF- α und IL-6 und ihrer durch Genpolymorphismen bedingten quantitativ unterschiedlichen Produktion auf den Langzeitverlauf von Nierentransplantaten untersucht. Ziel war es einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Transplantatüberleben und der genetisch geregelten individuellen Immunabwehr des Empfängers herzustellen. Hintergrund dieser Überlegungen waren unter anderem Studien, die gezeigt haben, dass die Transplantatüberlebenszeit entscheidend mit dem Auftreten von Abstoßungsreaktionen im ersten Jahr nach der Transplantation zusammenhängt.^{35, 38, 40, 43, 44, 100}

4.1 Funktion der untersuchten Zytokine in der Transplantationsmedizin

4.1.1 Interleukin-10

IL-10 wird von T-Helferzellen vom Typ 2 (Th 2), B-Zellen, Monozyten, Makrophagen und Keratinozyten produziert. Es hemmt eine Reihe von Immunantworten, einschließlich der Th1-Lymphozyten Zytokinproduktion, der Antigenpräsentation und der antigen-spezifischen T-Zellproliferation.^{48, 72} Zusätzlich zu diesen anti-inflammatorischen Eigenschaften sorgt IL-10 für eine B-Zell-Aktivierung, für die Regulierung der Immunglobulin-Produktion¹⁷ und es unterstützt die B-Zellen bei der Verhinderung von Apoptose⁷². IL-10 scheint wichtig zu sein bei der Immunregulation bezogen auf die Kontrolle des Gleichgewichts zwischen humoraler und inflammatorischer Antwort.¹⁷ Es ist involviert in Autoimmunsprozesse.^{18, 24, 84} Während akuter Abstoßungsreaktionen konnten hohe IL-10 Mengen in Nierentransplantaten¹⁰⁰ und im Serum¹⁰⁵ nachgewiesen werden. Eine andere Studie stellte fest, dass Patienten, bei denen vor der Transplantation eine erhöhte IL-10 Reaktion getestet wurde, eine erhöhte Anzahl an Abstoßungsreaktionen nach Transplantation hatten.¹¹⁵ Eine geringe Ausschüttung von IL-10 hat eine permissive Wirkung für chronische Entzündungsprozesse, die zu mikrovaskulären Veränderungen im Transplantat führen.³¹

Die von uns untersuchte Punktmutation auf Position -1082 des IL-10 Gens beinhaltet eine Substitution von Guanin durch Adenosin. Das A-Allel geht einher mit einer geringeren IL-10 Produktion in vitro¹⁰⁸ und in vivo^{60, 102}, so dass sich eine Genotypeinteilung nach der Produktion in wenig (AA) und viel produzierend (GA und GG) vornehmen lässt.

4.1.2 Tumornekrosefaktor- α

TNF- α wird von aktivierten Makrophagen, Monozyten, T-Zellen und Natural-Killer-Zellen produziert. Er ist ein pro-inflammatorisches Zytokin vom T-Helferzell-1-Typ mit vielfältigen immunologischen Funktionen, die die Aktivierung und das Überleben der T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen regulieren. Außerdem beeinflusst der Faktor die Zytokin- und

Chemokinproduktion.^{3, 59} TNF- α ist an vielen Autoimmunerkrankungen, entzündlichen und Krebserkrankungen beteiligt.^{118, 120} Bei der akuten Abstoßungsreaktion von Transplantaten wurden gesteigerte Werte von TNF- α gemessen.^{74, 79}

Wir untersuchten den TNF- α -308G/A-Polymorphismus, da in einigen Studien bei Nierentransplantationen eine Beziehung zwischen den viel TNF- α produzierenden Genotypen AA und GA und akuten Abstoßungsreaktionen nachgewiesen werden konnte.^{12, 83, 88} Der Polymorphismus geht auf eine Punktmutation in der Promoterregion des TNF- α -Gens auf Position -308 mit einem Austausch von Guanin durch Adenosin zurück. Dem A-Allel konnte eine erhöhte Transkriptionsleistung^{54, 117} und eine erhöhte in vitro Ausschüttung¹⁰ zugeordnet werden, obwohl dies noch kontrovers diskutiert wird^{2, 6, 11, 51, 52}.

4.1.3 Interleukin-6

IL-6 ist ein vielfältiges Zytokin, das durch ein weites Spektrum von Zellen wie Makrophagen und Lymphozyten produziert wird. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Induktion der Akute-Phase-Reaktion und der Immunantwort.^{48, 49, 53} In der Niere wird es sowohl von stationären als auch von eingewanderten Zellen gebildet.^{21, 28, 44} Abgesehen von seiner pro-inflammatorischen Aktivität, wie Differenzierung und Aktivierung der Makrophagen, der B- und T-Zellen, hat IL-6 auch anti-inflammatorische und immunsuppressive Eigenschaften gezeigt. IL-6 steht in Zusammenhang mit dem Fortschreiten des Septischen Schocks, mit Autoimmunerkrankungen und mit akuten Abstoßungsreaktionen bei den meisten Organtransplantationen.²¹ Bei der Nierentransplantation korrelieren die renale Expression und die Exkretion von IL-6 über den Urin mit dem Ausmaß an tubulointestinalem Schaden und mesangialer Proliferation.^{21, 29, 43, 62, 80, 93, 100} In den Nierentransplantaten wurden ferner während akuter Abstoßungsreaktionen und bei akutem Tubulusschaden hohe Produktionsraten an IL-6 sowohl durch die ortständigen als auch durch die infiltrierenden Zellen nachgewiesen.²¹

In der Promoterregion des IL-6 Gens wurde auf Position -174 ein Polymorphismus nachgewiesen, der eine Substitution von Cytosin durch Guanin beinhaltet. Dieser geht mit einer Beeinflussung der in vitro und in vivo Produktion von IL-6 einher.²⁷ Die quantitative Einteilung der Produktion des Zytokins erfolgte in den Studien unterschiedlich. Eine Arbeitsgruppe teilte in einen viel produzierenden Genotyp (GG) und einen wenig produzierenden Genotyp (GC und CC) ein.⁷⁵ Andere Studien fassten die intermediäre Gruppe GC zur Gruppe der high producer GG.^{27, 34, 66} Wiederum von anderen Autoren wurde die intermediäre Gruppe GC einzeln betrachtet^{15, 45} oder unter dem Aspekt „non G“ und „non C“ untersucht.⁶⁴

4.2 Zytokin-Genpolymorphismen und ihr Einfluss auf den Verlauf nach Nierentransplantation

4.2.1 Akute Abstoßungsreaktionen

Akute Abstoßungsreaktionen verursachen langfristig betrachtet einen Funktionsverlust des Transplantats. Die akute Abstoßungsreaktion wird von aktivierten T-Lymphozyten generiert und spricht für eine T-Zell-gesteuerte humorale Immunantwort. Daher liegt es nahe, dass Zytokine, die die Interaktion zwischen T-Zellen und antigenpräsentierenden B-Zellen koordinieren, die akute Abstoßungsreaktion beeinflussen.⁶⁵

Interleukin-10 –1082G/A

Eine Studie konnte dem high producer Genotyp (GA und GG) des IL-10 –1082 eine erhöhte Anzahl von Rejektionen nachweisen.⁸⁸ Eine andere Studie untersuchte die drei Genpolymorphismen des IL-10 (–1082, –819, –592) und konnte diese Verbindung ebenfalls bestätigen.¹¹⁴ Eine Verbindung des IL-10 high producer Typs G mit einer erhöhten Abstoßungsrate konnte eine andere Gruppe nur bei gleichzeitigem Vorliegen von HLA-DR mismatches finden.⁹⁵ Andere Untersuchungen konnten einen Zusammenhang des IL-10 –1082-Genpolymorphismus mit Rejektionen nur bei afro-amerikanischen Patienten nachweisen. Diese beiden Studien kamen aber zu widersprüchlichen Ergebnissen: Hutchings⁴⁵ stellte beim Genotyp AA weniger Rejektionen fest. Im Gegensatz dazu fand McDaniel⁶⁶ eine Verbindung des Genotyps GG/GA zu einer geringeren Anzahl von Rejektionen.

TNF- α –308G/A

Zwei Studien konnten einen Zusammenhang zwischen dem TNF- α high producer Typ (Genotypen AA und GA) und dem erhöhten Risiko einer akuten Abstoßungsreaktion beobachten.^{83, 88} Eine erhöhte Abstoßungsrate beim TNF- α high producer Genotyp wurde auch von anderen Autoren beobachtet, aber nur in einer Untergruppe von Patienten mit gleichzeitigem HLA-DR mismatch.^{34, 95} Diese Ergebnisse wurden wiederum in größeren Studien angezweifelt.^{58, 64, 90}

Interleukin-6 –174G/C

Mehrere Arbeiten konnten keinen Zusammenhang zwischen dem IL-6 –174G/C-Genpolymorphismus und akuten Abstoßungsreaktionen bei Nierentransplantaten nachweisen.^{15, 34, 45, 64, 88, 114}

Ein Einfluss der vermuteten unterschiedlichen Zytokinexpression der verschiedenen Genpolymorphismen auf die Anzahl der akuten Abstoßungsreaktionen wurde in unserer Studie nicht bestätigt. Unsere Ergebnisse korrelieren mit denen der oben genannten Studien, die keinen Einfluss der IL-10 –1082G/A-^{15, 34, 45, 64, 76, 83, 90, 95}, TNF-alpha –308G/A-^{15, 34, 45, 58, 64, 76, 90, 95, 114, 121} und IL-6 –174G/C-Genpolymorphismen^{15, 34, 45, 64, 88, 114} in univariater Analyse beobachten konnten (Tabelle 8, S. 50-51).

4.2.2 Einfluss auf das Langzeitüberleben

Unser Hauptaugenmerk legten wir auf das Langzeitüberleben von Nierentransplantaten, da es bisher nur wenige Studien zu diesem Thema gibt. Als Parameter für den Langzeitverlauf eignet sich die Ermittlung des mittleren Serum-Kreatininwertes über die Beobachtungszeit und die Dauer des Transplantatüberlebens. Dem Serum-Kreatininspiegel bei Entlassung konnte ein hoher Aussagewert für das Langzeitüberleben nachgewiesen werden.¹⁶ Ebenso zeigten andere Studien, dass zum Zeitpunkt von sechs und zwölf Monaten ein Serum-Kreatininspiegel von >1.5mg/dl mit einer niedrigeren Transplantatüberlebenszeit einhergeht.^{30, 40, 89}

Interleukin-10 –1082G/A

Wir konnten zu keinem Zeitpunkt der Datenerfassung einen signifikanten Zusammenhang zwischen Genotypverteilung und Serumkreatininwert feststellen. Ferner ließ sich in Übereinstimmung mit zwei vorhergehenden Studien kein Einfluss des IL-10 –1082G/A-Polymorphismus auf das Transplantatüberleben feststellen.^{7, 76} Andere Studien konnten einen protektiven Effekt im Langzeitverlauf, aber weniger bei den akuten Rejektionen nachweisen.^{70, 95, 108}

TNF- α –308G/A

Auch beim TNF- α –308G/A-Polymorphismus gelang kein Nachweis eines Zusammenhanges, weder in Bezug auf den Serumkreatininspiegel noch auf die Länge des Transplantatüberlebens.^{76, 121}

Interleukin-6 –174G/C

Wir konnten den in einer Studie berichteten Zusammenhang zwischen dem IL-6 –174G/C-Genpolymorphismus und dem Langzeit-Transplantatverlauf nicht nachweisen⁷⁶, obwohl wir die gleiche ethnische Gruppe und ein ähnliches immunsuppressives Protokoll und Studiendesign hatten. Auch bei einer Zuordnung der intermediären Gruppe GC zur high producer Gruppe GG

wie sie in anderen Studien erfolgte^{27, 34, 66} konnte von uns kein Zusammenhang zwischen Genpolymorphismus und Abstoßungsreaktionen bzw. Transplantatverlust erwiesen werden.

4.2.3 HLA-DR-mismatch

Unter dem zusätzlichen Aspekt der HLA-DR-mismatches in Kombination mit den untersuchten Genpolymorphismen, konnte in unserer Studie ebenfalls kein Zusammenhang gesehen werden. Andere Studien konnten bei der kombinierten Betrachtung ein unterschiedliches Abstoßungsverhalten feststellen.^{34, 95}

4.3 Interpretation der Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung, die durch vorherige Studien bestätigt wurden, schließen eine bedeutende Rolle der TNF- α -308G/A-, IL-10 -1082G/A- und IL-6 -174G/C-Genpolymorphismen als signifikante unabhängige Vorhersagewerte von Abstoßungsreaktionen bei der Nierentransplantation aus. Weiter liefert die Studie Beweise für einen fehlenden Einfluss auf das Langzeit-Transplantatüberleben. Trotz der zentralen Rolle der Zytokine in der Regulierung der Immunantwort und trotz des Einflusses der untersuchten Polymorphismen auf die Produktion dieser Zytokine, scheinen diese Genpolymorphismen keine Relevanz als Vorhersagewert für den Verlauf nach Nierentransplantation haben.

Es gibt mögliche Erklärungen für diese Diskrepanzen. Erstens könnten positive Zusammenhänge in Studien mit kleinen Untergruppen und vielfachen Vergleichen sich durch sehr sorgfältige statistische Analysen (z. B. mit der Bonferroni-Korrektur) als falsch genau/positiv und nicht-signifikant herausstellen. Eine andere Überlegung ist, dass es bei dem komplexen Apparat der immunologischen und nicht-immunologischen Faktoren, die in das Geschehen der akuten Abstoßung und des chronischen Transplantatversagens involviert sind, die genetische Komponente möglicherweise wenig Einfluss auf den klinischen Verlauf hat. Der Einfluss der Genpolymorphismen könnte im Vergleich zu anderen entscheidenden Faktoren bei der Nierentransplantation so schwach sein, dass er maskiert und nur von einem kleinen Anteil der Studien entdeckt wird. Zum Beispiel wird der Einfluss der Polymorphismen auf die Plasmaspiegel von IL-6 und TNF-alpha auch durch das Geschlecht, das Alter und den body mass index (BMI) beeinflusst.³³

Außer Acht lassen sollte man nicht, dass mehrere IL-10 Haplotypen identifiziert wurden, die die Menge der Produktion von IL-10 nach Stimulation bestimmen^{24, 101}, so dass möglicherweise nicht nur der Genpolymorphismus IL-10 -1082 ausschlaggebend ist.

Einen sehr starken Faktor stellt sicher das unterschiedliche Studiendesign dar. Ein Beispiel hierfür ist die Definition von Rejektionen. Sie wurden teilweise nicht durch eine Biopsie abgesichert, sondern am klinischen Bild festgemacht^{90, 95} oder wie in der Studie von Poole⁹⁰

unterteilt in eine Gruppe mit einer oder weniger Rejektion und in eine andere Gruppe mit mehr als einer Rejektion. Ebenfalls nicht zu unterschätzen ist der Einfluss der unterschiedlichen und eventuell fehlenden Standardisierung der Untersuchungsmethoden bei molekulargenetischen Analysen.⁹

Das immunsuppressive Protokoll war in den Studien ebenfalls nicht standardisiert. Die Patienten bekamen teilweise eine Monotherapie⁹⁵ oder Zweifachtherapie⁸⁸. In der frühen Phase nach der Transplantation bewirkt die hochdosierte Immunsuppression mit CsA eine Hemmung und einen Rückgang der inflammatorischen Th1 Zytokine. Dies könnte durch Hemmung der Transkription im TNF- α Gen eine Beeinflussung der TNF- α Produktion verursachen.⁹⁵ In unserer Studie erfolgte die Umstellung der Immunsuppression von CsA auf Tacrolimus erst bei wiederholten Abstoßungsreaktionen oder bei Unverträglichkeit von CsA. Dies ist sehr wahrscheinlich auch die Erklärung für den signifikanten Unterschied der mittleren Serumkreatininwerte der beiden Medikamentengruppen in den ersten beiden Jahren nach Transplantation. In diesen zwei Jahren fließt der erhöhte Kreatininwert der Patienten mit wiederholten Rejektionen ein, die daraufhin auf Tacrolimus umgestellt wurden.

Als signifikantere Einflussfaktoren auf das Kurz- und Langzeitüberleben der Nierentransplantate, wurde zum Beispiel die HLA-Kompatibilität in Studien nachgewiesen.^{14, 81, 103} In unserer Studie konnten wir bei den Lebendnierenspenden im Vergleich zu den Leichennierenspenden eine größere Anzahl von HLA-mismatches feststellen ($p=0,027$). Dies ist auf die Tatsache begründet, dass nicht nur Verwandte, sondern auch „HLA-ungünstigere“ Ehepartner ihre Organe spendeten. Ein signifikanter Unterschied im Transplantatüberleben bezogen auf HLA-Kompatibilität resultierte in unserer Studie nicht, so dass wir auch dieses Ergebnis nicht bestätigen können.

Die Abhängigkeit der Zytokinexpression von Genpolymorphismen wurde im Zusammenhang vieler Studien untersucht. Die verschiedenen Ergebnisse sind möglicherweise durch unterschiedliche Studienprotokolle bedingt.¹⁰⁶ Untersucht wurde sowohl Vollblut als auch isolierte Monozyten oder PBMC (peripheral blood mononuclear cells). Unterschiedlich verlief auch das Inkubationsprotokoll.¹¹² Einige Studien konnten gar keinen Zusammenhang zwischen den IL-10 -1082, TNF- α -308 und IL-6 -174 Genpolymorphismen und der Zytokinexpression in mitogenstimulierten Kulturen oder gemixten Lymphozytenkulturen feststellen.¹⁵

Die untersuchten Zytokine IL-10, TNF- α und IL-6 sind multifunktional und haben nicht rein pro- oder anti-inflammatorische Eigenschaften. Ihre Aktionen können in Abhängigkeit der immunologischen Mechanismen, die durch den jeweiligen Fall aktiviert wurden, unterschiedlich sein. Zytokine arbeiten nicht alleine, sie regulieren sich selbst und andere durch Aufbauen eines komplexen Netzwerks an interagierenden Mediatoren. Diese Tatsachen sollte man im Hinterkopf behalten, wenn der Einfluss der Zytokine auf komplexe biologische Phänomene, wie auch Abstoßung oder Immunsuppression, und ihre klinische Bedeutung interpretiert werden.

Nichtimmunologische Einflussfaktoren des Transplantatüberlebens

Weitere Einflussfaktoren bei akuten und chronischen Abstoßungsreaktionen sind das Alter und das Geschlecht des Empfängers.⁵⁰ Nicht anders sieht es bei den Organen älterer Spender aus. Sie haben ein geringeres Transplantatüberleben.^{5, 39} Weiterhin wurde in Studien gezeigt, dass eine längere Dialysepflichtigkeit einen negativen Einfluss auf das Transplantat- und Patientenüberleben hat.^{68, 69}

Der nach sechs und zwölf Monaten gemessene Kreatininspiegel korreliert mit dem Langzeitüberleben der Transplantate.^{30, 40} Zu bedenken ist dabei, dass das Serumkreatinin als Marker für das Langzeitüberleben dahingehend limitiert ist, dass es auch abhängig von Alter, Körpergewicht und Geschlecht ist.⁴⁰ Es ist aber anzunehmen, dass die nicht-immunologischen Einflussfaktoren in allen Studien zu gleichen Teilen bewertet wurden.

4.4 Schlussfolgerung

Zusammenfassend sprechen unsere Ergebnisse gegen einen wesentlichen Einfluss der untersuchten Genpolymorphismen IL-10 –1082G/A, TNF- α –308G/A und IL-6 –174G/C auf das Abstoßungsverhalten und den Langzeitverlauf nach Nierentransplantation. Wir konnten keinen Zusammenhang zwischen den Genpolymorphismen und dem Langzeitüberleben nach Nierentransplantation feststellen. Weder der gemittelte Kreatininwert im Verlauf noch die Anzahl der Abstoßungen, die Transplantatüberlebenszeit oder ein Vergleich der Entzündungswerte erbrachten signifikante Unterschiede wie sie in wenigen anderen Studien gesehen wurden.

Eine Bestimmung der Genotypen der transplantierten Patienten, um zum Beispiel ein individuelles immunsuppressives Konzept für den einzelnen Transplantierten zu erlangen, scheint nach dem Durchführen dieser Studie wenig aussichtsreich.⁴⁷ Sicher ist dabei zu beachten, dass unsere Studie retrospektiv angelegt wurde. Dies bedeutet, dass die Patienten nicht gleich behandelt wurden, sowohl in der immunsuppressiven Therapie als auch in der Abstoßungstherapie und in der Behandlung der Begleiterkrankungen.

Es stellt sich die Frage, ob es nicht sinnvoll ist prospektive Multicenter-Studien in Zusammenarbeit zu gestalten, um die These eines Einflusses der auch von uns untersuchten Genpolymorphismen zu hinterlegen. Durch die gleichen Studienbedingungen könnte man die genannten zusätzlichen Faktoren, die den Transplantatverlauf beeinflussen, herausfiltern. Hierdurch würde die klinische Bedeutung der untersuchten Polymorphismen eingegrenzt werden.

Tabelle 8: Univariate Analyse: Zusammenhang mit Rejektionen (Rej.): ja (+) / nein(-) / nicht untersucht (Ø)

			IL-10 –1082G/A		TNF- α –308G/A		IL-6 –174G/C	
Autor	Jahr	Patienten (n)	Rejektionen	Langzeit- überleben	Rejektionen	Langzeit- überleben	Rejektionen	Langzeit- überleben
Sankaran D et al ⁹⁵ (Kidney International)	1999 (6 Monate)	88	(-) (+) –1082G bei HLA-DR-mismatch	Ø	(-) (+) –308A bei HLA- DR-mismatch	Ø	Ø	Ø
Marshall SE et al ⁶⁴ (Transplantation)	2000 (30 Tage)	209	(-)	Ø	(-)	Ø	(-)	Ø
Poli F et al ⁸⁸ (Transpl Proc)	2000 (3 Monate)	169	(+) -1082G mehr Rej.	Ø	(+) -308A mehr Rej.	Ø	(-)	Ø
Cartwright NH et al ¹⁵ (Transplant Immunology)	2000 (1 Jahr)	49	(-)	Ø	(-)	Ø	(-)	Ø
Pelletier R et al ⁸³ (Transplantation)	2000 (Zeit ?)	82	(-) (+) –1082G/TNF- α - 308G	Ø	(+) -308A mehr Rej-	Ø	Ø	Ø
Asderakis A et al ⁷ (Transplantation)	2001 (5 Jahre)	88	(-)	(+) -1082G protektiv	Ø	Ø	Ø	Ø
Hahn AB et al ³⁴ (Transplantation)	2001 (bis 6 Jahre)	120	(-)	Ø	(-) (+) –308A bei HLA- DR mismatch	Ø	(-) A GG / GV=H CC=L	Ø

			IL-10 –1082G/A		TNF- α –308G/A		IL-6 –174G/C	
Autor	Jahr	Patienten (n)	Rejektionen	Langzeit- überleben	Rejektionen	Langzeit- überleben	Rejektionen	Langzeit- überleben
Poole KL et al ⁹⁰ (Transplant Immunology)	2001 (1 Jahr)	120	(-)	Ø	(-)	Ø	Ø	Ø
Müller-Steinhardt M et al ⁷⁶ (Kidney International)	2002 (3 Jahre)	158	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
Hutchings A et al ⁴⁵ (Pediatric Transplantation)	2002 (1 Mon–18 Jahre)	105	(-) (+) AA weniger Rejektionen bei Afro-Amerikanen	Ø	(-)	Ø	(-)	Ø
McDaniel DO et al ⁶⁶ (Transplant Immunology)	2003 (1-6 Jahre)	77 Afro- Amerikaner	(+)-1082G weniger Rejektionen	Ø	(-)	Ø	(-) A	Ø
Lee H et al ⁵⁸ (J Clin Pathol)	2004 (1 Jahr)	227	Ø	Ø	(-)	Ø	Ø	Ø
Wramner LG et al ¹²¹ (Transplantation)	2004 (5-12 Jahre)	157	Ø	Ø	(-)	(-)	Ø	Ø
Eigene Ergebnisse (Clin Transplant)	2007 (0,5-6 Jahre)	224	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

5 Zusammenfassung

Auf dem Gebiet der Nierentransplantation konnten in den letzten Jahren immer bessere Ergebnisse in Bezug auf die Anzahl von akuten Abstoßungsreaktionen und das Ein-Jahres-Transplantatüberleben erzielt werden. Dies hängt unter anderem mit der verbesserten immunsuppressiven medikamentösen Therapie und der besseren Überwachung des Transplantates zusammen. Die gleichen Erfolge konnten aber noch nicht in Bezug auf das Langzeitüberleben der Nierentransplantate erzielt werden. Es bleibt unklar, warum Patienten mit der gleichen HLA-Kompatibilität und der gleichen immunsuppressiven Therapie eine unterschiedliche Anzahl von Rejektionen und einen unterschiedlichen zeitlichen Transplantatverlust haben. In der vorliegenden Studie wurde in diesem Zusammenhang der Einfluss der Polymorphismen der zytokinassozierten Gene und die damit verbundene unterschiedliche Expression der Zytokine in Bezug auf den Langzeitverlauf nach Nierentransplantation untersucht.

In das Kollektiv wurden n=224 Patienten eingeschlossen, die im Transplantationszentrum Düsseldorf im Zeitraum von 1998 bis Ende 2001 nierentransplantiert wurden. Die Studie umfasste 175 Leichennieren- und 49 Lebendnierentransplantationen. Als Kontrollgruppe diente eine Gruppe von 100 nierengesunden Freiwilligen. Die Teilnehmer der Studie wurden über einen Zeitraum von $34,3 \pm 16,1$ Monate (Spanne: 6-66 Monate) beobachtet.

Wir verglichen die Anzahl und den Schweregrad der akuten Abstoßungsreaktionen, den Serum-Kreatininverlauf und die Transplantatüberlebenszeit, das heißt die Dauer bis zur erneuten Dialysepflichtigkeit.

Bestimmt wurden die drei Genpolymorphismen IL-10 -1082G/A, TNF- α -308G/A und IL-6 -174G/C mittels DNA-Präparation und anschließender PCR. Diese Polymorphismen konnten in einigen Arbeiten mit unterschiedlichem Abstoßungsverhalten nach Nierentransplantation in Zusammenhang gebracht werden. Der IL-10 -1082A-Polymorphismus mit einer niedrigeren Produktion von IL-10 wird in der Literatur als protektiv für das Transplantatüberleben beschrieben. Der TNF- α -308A-Polymorphismus geht mit einer höheren TNF- α Produktion einher. Diese konnte in einigen Arbeiten mit einer erhöhten Abstoßungsreaktion von Nierentransplantaten in Verbindung gebracht werden. Beim IL-6 -174G/C Polymorphismus konnte in einer Studie den low producer Genotypen GG und GC ein protektiver Effekt auf das Langzeitüberleben nach Nierentransplantation nachgewiesen werden.

Die Genotypverteilung der untersuchten Polymorphismen war in der Patienten- und Kontrollgruppe vergleichbar (ns). Das Spender- und Empfängeralter, die Anzahl der HLA-mismatches und die Kalt- und Warmischämiezeit unterschieden sich nicht in den Gruppen der unterschiedlichen Genotypen (ns).

In unserer Studie konnte kein Zusammenhang zwischen den Zytokinpolymorphismen und dem Auftreten von akuten Abstoßungsreaktionen festgestellt werden (ns). Der Zytokin-Genotyp korrelierte zu keinem Zeitpunkt der Beobachtung mit dem mittleren Serumkreatininwert. Außerdem ergab sich kein signifikanter Unterschied von den Genotypen zu der Häufigkeit von Transplantatverlusten in ihren Gruppen. Die Patienten der unterschiedlichen Zytokin-Genpolymorphismen zeigten ähnliche Verläufe in der Kaplan-Meier Analyse der Transplantatüberlebenszeiten (ns). Abschließend konnten wir auch keinen Einfluss der Zytokin-Polymorphismen auf akute Abstoßungsreaktion oder den Transplantatverlauf in der Untergruppe der Transplantate mit schlechterer HLA-DR Übereinstimmung nachweisen (ns).

Zusammenfassend sprechen unsere Ergebnisse gegen einen wesentlichen Einfluss der untersuchten Genpolymorphismen auf das Abstoßungsverhalten und den Langzeitverlauf nach Nierentransplantation. Sicherlich ist noch zu beachten, dass unsere Studie retrospektiv angelegt wurde. Dies bedeutet, dass die Patienten nicht gleich behandelt wurden, sowohl in der immunsuppressiven als auch in der Abstoßungs-Therapie und in der Therapie der Begleiterkrankungen. Dieses uneinheitliche Bild der Studie lässt sich ebenfalls bei anderen Studien über die Genpolymorphismen finden. Ferner hatte unsere Studie eine möglicherweise zu kurze Nachbetrachtungszeit, um abschließende Aussagen treffen zu können. Es ist sicher sinnvoll eine prospektive Multicenter-Studie durchzuführen, damit durch eine größere Patientenzahl ein möglicherweise geringer Einfluss nachgewiesen oder abschließend widerlegt werden kann.

6 Literatur

1. Abdallah AN, Cucchi-Mouillot P, Biteau N, Cassaigne A, Haras D, Iron A. Analysis of the polymorphism of the tumor necrosis factor (TNF) gene and promoter and of circulating TNF-alpha levels in heart-transplant patients suffering or not suffering from severe rejection. *Eur J Immunogenet.* 1999 Aug; 26 (4):249-255.
2. Abraham LJ, Kroeger KM. Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. *J Leukoc Biol.* 1999 Oct; 66(4): 562-566.
3. Adams AB, Larsen CP, Pearson TC, Newell KA. The role of TNF receptor and TNF superfamily molecules in organ transplantation. *Am J Transplant.* 2002 Jan;2(1):12-8. *Liver Transpl.* 2003 Feb; 9(2): 170-181.
4. Akalin E, Hendrix RC, Polavarapu RG, Pearson TC, Neylan JF, Larsen CP, Lakkis FG. Gene expression analysis in human renal allograft biopsy samples using high-density oligoarray technology. *Transplantation.* 2001 Sept 15; 72(5):948-953.
5. Alexander JW, Bennett LE, Breen TJ. Effect of donor age on outcome of kidney transplantation. A two-year analysis of transplants reported to the United Network for Organ Sharing Registry. *Transplantation.* 1994 Mar 27;57(6):871-876.
6. Allcock RJ, Williams JH, Price P. The central MHC gene, BAT1, may encode a protein that down-regulates cytokine production. *Genes Cells* 2001; 6:487-494.
7. Asderakis A, Sankaran D, Dyer P, Johnson RW, Pravica V, Sinnott PJ, Roberts I, Hutchinson IV. Association of polymorphisms in the human interferon-gamma and interleukin-10 gene with acute and chronic kidney transplant outcome: the cytokine effect on transplantation. *Transplantation.* 2001 Mar 15; 71(5):674-677.
8. Bathgate AJ, Pravica V, Perrey C, Therapondos G, Plevris JN, Hayes PC, Hutchinson IV. The effect of polymorphisms in tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, and transforming growth factor-beta1 genes in acute hepatic allograft rejection. *Transplantation.* 2000 Apr 15;69(7):1514-1517.
9. Bogardus ST, Concato J, Feinstein AR. Clinical epidemiological quality in molecular genetic research: the need for methodological standards. *JAMA* 1999; 281: 1919-1926.
10. Bouma G, Crusius JB, Oudkerk Pool M, Kolkman JJ, von Blomberg BM, Kostense PJ, Giphart MJ, Schreuder GM, Meuwissen SG, Pena AS. Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 43:456-463, 1996.
11. Braun N, Michel U, Ernst BP, Metzner R, Bitsch R, Weber F, Rieckmann P. Gene polymorphism at position -308 of the tumor-necrosis-factor- α (TNF- α) in multiple sclerosis and its influence on the gene regulation of TNF- α production. *Neurosci Lett* 1996; 215: 75-78.
12. Burlingham WJ, O'Connell PJ, Jacobsen LM, Becker BN, Kirk AD, Pravica V, Hutchinson IV. Tumor necrosis factor- α and tumor growth factor- β 1 genotype: partial association with intragraft gene expression in two cases of long-term peripheral tolerance to a kidney transplant. *Transplantation* 2000 April 15; 69 (7): 1527-1530.
13. Callard R, George AJ, Stark J. Cytokines, chaos and complexity. *Immunity* 1999; 11: 507-513.
14. Cartwright NH, Demaine AG, Hurlock NJ, McGonigle RJ, Rowe PA, Shaw JF, Szydlo RM, Kaminski ER. Cytokine secretion in mixed lymphocyte culture: a prognostic indicator of renal allograft rejection in addition to HLA mismatching. *Transpl Immunol.* 2000 Jun;8(2):109-114.
15. Cartwright NH, Keen LJ, Demaine AG, Hurlock NJ, McGonigle RJ, Rowe PA, Shaw JF, Szydlo RM, Kaminski ER. A study of cytokine gene polymorphisms and protein secretion in renal transplantation. *Transpl Immunol.* 2001 Feb;8(4):237-244.
16. Cecka MJ, Terassaki PI et al. The UNOS Scientific Renal Transplant Registry, in *Clinical Transplants*. Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory, 1988: 1-16.
17. Coakley G, Mok CC, Hajeer AH, Ollier WER, Turner D, Sinnott PJ, Hutchinson IV, Panayi GS, Lanchbury JS. Interleukin-10 promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis and Felty's Syndrome. *British Journal of Rheumatology* 1998; 37: 988-991.
18. Cush JJ, Splawski JB, Thomas R, McFarlin JF, Schulze-Koops H, Davis LS, Fujita K, Lipsky PE. Elevated interleukin-10 levels in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 38, 96-104.

19. D'Alfonso SD, Richiardi PM. A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNF α promoter. 1994 Immunogenetics 39, 150-154.
20. De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. J Exp Med 1991; 174:1209-1220.
21. Di Paolo S, Gesualdo L, Stallone G, Ranieri E, Paolo Schena F. Renal expression and urinary concentration of EGF and IL-6 in acutely dysfunctioning kidney transplanted patients. Nephrol Dial Transplant (1997) 12: 2687-2693.
22. Dorge SE, Roux-Lombard P, Dayer JM, Koch KM, Frei U, Lonnemann G. Plasma levels of tumour necrosis factor (TNF) and soluble TNF receptors in kidney transplant recipients. Transplantation 1994; 58(9):1000.
23. el Gamel A, Grant S, Yonan N, Keevil B, Aziz T, Deiraniya AK, Campbell C, Rahman A, Haselton P, Hutchinson IV. Interleukin-10 and cellular rejection following cardiac transplantation. Transplant Proc. 1998 Aug;30(5):2387-2388.
24. Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL, Keijsers V, Westendorp RGJ, Huizinga TWJ. Interleukin-10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 9465-9470.
25. Fernandes H, Koneru B, Fernandes N, Hameed M, Cohen MC, Raveche E, Cohen S. Investigation of promoter polymorphisms in the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genes in liver transplant patients. Transplantation 2002; 73: 1886-1891.
26. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR: Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. J Exp Med 170: 2081-2095, 1989
27. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. J Clin Invest 102:1369-1376, 1998
28. Frank J, Engler-Blum G, Rodemann HP, Müller GA. Human tubular cells as a cytokine source: PDGF- β , GM-CSF and IL-6 mRNA expression in vitro. Exp Nephrol 1993; 1:26-35.
29. Fukatsu A, Matsuo S, Tamai H, Sakamoto N, Matsuda T, Hirano T. Distribution of interleukin-6 in normal and diseased human kidney. Lab Invest 1991; 65: 61-66.
30. Giral M, Taddei C, Nguyen JM et al. Single center analysis of 468 first cadaveric kidney allograft with uniform ATG-CsA sequential therapy. in: Cecka MJ, Terasaki PI, eds. Clinical Transplants. Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory, 1996: 257-264.
31. Girndt M, Ulrich C, Diler B, Girndt G, Deman E, Heine G, Köhler H. Der Interleukin-10 Genotyp bestimmt die Langzeitprognose nach Nierentransplantation vor allem bei Patienten mit geringer HLA-Übereinstimmung. Klinik für Innere Medizin IV, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg. Unveröffentlichte Daten.
32. Goldfeld AE, Strominger JL, Coyle C: Human tumor necrosis factor α gene expression in phorbol ester stimulated T and B cell lines. 1991 J Exp Med 174: 73-81.
33. Haddy N, Sass C, Maumus S, Marie B, Drosch S, Siest G, Lambert D, Visvikis S. Biological variations, genetic polymorphisms and familial resemblance of TNF-alpha and IL-6 concentrations: STANISLAS cohort. Eur J Hum Genet. 2005 Jan; 13(1): 109-117
34. Hahn AB, Kasten-Jolly JC, Constantino DM, Graffunder E, Singh TP, Shen GK, Conti DJ. TNF-alpha, IL-6, IFN-gamma, and IL-10 gene expression polymorphisms and the IL-4 receptor alpha-chain variant Q576R: effects on renal allograft outcome. Transplantation. 2001 Aug 27; 72(4):660-665.
35. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. N Engl J Med 2004 Dec; 351: 2715-2729.
36. Hariharan S. Long-term kidney transplant survival. Am J Kidney Dis 2001 Dec; 38(6 Suppl 6): 44-50.
37. Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. N Engl J Med 2000 Mar 2; 342(9): 605-612.
38. Hariharan S, Kasiske B, Matas A, Cohen A, Harmon W, Rabb H. Surrogate markers for long-term renal allograft survival. Am J Transplant 2004 Jul; 4(7): 1179-1183.
39. Hariharan S, McBride MA, Bennett LE, Cohen EP. Risk factors for renal allograft survival from older cadaver donors. Transplantation 1997 Dec 27;64(12):1748-1754.
40. Hariharan S, McBride MA, Cherikh WS, Tolleris CB, Bresnahan A, Johnson CP. Post transplant renal function in the first year predicts long-term kidney transplant survival. Kidney International. 2002, 62, 311-318.

41. Hariharan S, McBride MA, Cohen EP. Evolution of Endpoints for Renal Transplant Outcome. *Am J Transplant* 2003 Aug; 3(8): 933-941.
42. Hariharan S, Savin VJ. Recurrent and de novo disease after renal transplantation: A report from the Renal Allograft Disease Registry (in process citation). *Pediatr Transplant* 2004 Aug; 8(4): 349-350.
43. Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today* 1990; 11: 443-449.
44. Horii Y, Muraguchi A, Iwano M. Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J Immunol* 1989; 143: 3949-3956.
45. Hutchings A, Guay-Woodford L, Thomas JM, Young CJ, Purcell WM, Pravica V, Perrey C, Hutchinson IV, Benfield MR. Association of cytokine single nucleotide polymorphisms with B7 costimulatory molecules in kidney allograft recipients. *Pediatr Transplantation* 2002; 6: 69-77.
46. Hutchinson IV, Pravica V, Perrey C, Sinnott P. Cytokine gene polymorphisms and relevance to forms of rejection. *Transplant Proc.* 1999 Feb-Mar;31(1-2):734-736.
47. Hutchinson IV, Turner D, Sankaran D, Awad M, Pravica V, Sinnott P. Cytokine genotypes in allograft rejection: Guidelines for immunosuppression. *Transplant Proc* 1998, 30: 3991-3992.
48. Ibelgaufts H: *Dictionary of Cytokines*. VCH Verlag 1995. ISBN:3-527-30042-2 Gb.
49. Janeway CA: *Immunologie*, 5. Auflage, S. 82-85.
50. Kelm-Kahl I. Long-time survival after kidney transplantation. Main factors are age, histocompatibility and hypertension. *Aktuelle Urol* 2003 Dec; 34(7):425.
51. Knight JC, Kwiatkowski D. Inherited variability of tumor necrosis factor production and susceptibility to infectious disease. *Proc Assoc Am Physicians* 1999; 111: 290-298.
52. Knight JC, Udalova I, Hill AV, Greenwood BM, Peshu N, Marsh K, Kwiatkowski D. A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. *Nat Genet* 1999; 22: 145-150.
53. Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bluethmann H, Kohler G. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature*. 1994 Mar 24; 368(6469):339-342.
54. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ: The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 34:391-399, 1997
55. La Flamme AC, Pearce EJ. The absence of IL-6 does not affect Th2 cell development in vivo, but does lead to impaired proliferation, IL-2 receptor expression, and B cell responses. *J Immunol*. 1999 May 15;162(10):5829-5837.
56. Laguila Visentainer JE, Rocha Lieber S, Lopes Persoli LB, Celso Vigorito A, Penteado Aranha FJ, Aparecida de Brito Eid K, Borba Oliveira G, Martins Miranda EC, Antonio de Souza C. Serum cytokine levels and acute graft-versus-host disease after HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematology*. Nov 2003, 31(11), 1044-1050.
57. Lang T, Krams SM, Villanueva JC, Cox K, So S, Esquivel C, Martinez OM. Distinct patterns of Th2 cytokine production during immune activation in pediatric liver allograft recipients. *Transplant Proc.* 1995 Feb;27(1):1146-1147.
58. Lee H, Clark B, Gooi HC, Stoves J, Newstead CG. Influence of recipient and donor IL-1alpha, IL-4, and TNFalpha genotypes on the incidence of acute renal allograft rejection. *J Clin Pathol*. 2004 Jan; 57(1):101-103.
59. Leeuwenberg JF, Van Damme J, Meager T, Jeunhomme TM, Buurman WA. Effects of tumor necrosis factor on the interferon-gamma-induced major histocompatibility complex class II antigen expression by human endothelial cells. *Eur J Immunol* 1988; 18(9): 1469.
60. Lin MT, Storer B, Martin PJ, Tseng LH, Gooley T, Chen PJ, Hansen JA. Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 2003; 349: 2201-2210.
61. Loucaidou M, McLean AG, Cairns TD, Griffith M, Hakim N, Palmer A, Paplois Y, Van Tromp J, Loucaides C, Welsh KI, Taube D. Five-year results of kidney transplantation under tacrolimus-based regimes: the persisting significance of vascular rejection. *Transplantation* 2003 Oct 15; 76(7): 1120-1123.
62. Malan Borel I, Racca A, Garcia MI, Bailat A, Quiroga F, Soutullo A, Gaitte L. Gammadelta T cells and interleukin-6 levels could provide information regarding the progression of human renal allograft. *Scand J Immunol*. 2003 Jul ; 58(1) : 99-105.
63. Marder B, Schröppel B, Murphy B. Genetic variability and transplantation. *Curr Opin Urol*. 2003 Mar;13(2):81-89. Review.

64. Marshall SE, McLaren AJ, Haldar NA, Bunce M, Morris PJ, Welsh KI. The impact of recipient cytokine genotype on acute rejection after renal transplantation. *Transplantation*. 2000 Nov 27; 70(10):1485-1491.
65. Marshall SE, Welsh KI. Review: The role of cytokine polymorphisms in rejection after solid organ transplantation. *Genes and Immunity* (2001) 2, 297-303.
66. McDaniel DO, Barber WH, Nguyen C, Rhodes SW, May WL, McDaniel LS, Vig PJS, Jerneson LL, Butkus DE. Combined analysis of cytokine polymorphism and the level of expression with allograft function in African-American renal transplant patients. *Transpl Immunol* 11 (2003): 107-119.
67. McLaughlin PJ, Aikawa A, Davies HM, Ward RG, Bakran A, Sells RA, Johnson PM. Evaluation of sequential plasma and urinary tumor necrosis factor alpha levels in renal allograft recipients. *Transplantation* 1991; 51(6): 1225.
68. Meier-Kriesche H, Port FK, Ojo AO, Leichtmann AB, Rudich SM, Amolorfer JA, PUNCH JD, Kaplan B. Deleterious effect of waiting time on renal transplant outcome. *Transplant Proc* 2001. 33: 1204-1206.
69. Meier-Kriesche HU, Port FK, Ojo AO, Rudich SM, Hanson JA, Cibrik DM, Leichtmann AB, Kaplan B. Effect of waiting time on renal transplant outcome. *Transplant Proc* 2001; 33: 1204-1206.
70. Merville P, Lambert C, Durand I, Pouteil-Noble C, Touraine JL, Berthoux F, Banchereau J. High frequency of IL-10-secreting CD4+ graft-infiltrating T lymphocytes in promptly rejected kidney allografts. *Transplantation*. 1995 Apr 27;59(8):1113-1119.
71. Middleton PG, Taylor PR, Jackson G, Proctor SJ, Dickinson AM. Cytokine gene polymorphisms associating with severe acute graft-versus-host disease in HLA-identical sibling transplants. *Blood* 1998; 92: 3943-3948. Montagnino G, Banfi G, Campise MR, Passerini P, Aroldi A, Cesana BM, Ponticelli C. Impact of chronic allograft nephropathy and subsequent modifications of immunosuppressive therapy on late graft outcomes in renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 Oct; 19(10): 2622-2629.
72. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A: Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19: 683-765, 2001
73. Mor E, Klein T, Shabtai E, Ben-Ari Z, Ortelgel JW, Micowitz R, Tur-Kaspa R, Tambur AR. Cytokine gene polymorphism in liver allograft recipients. *Transplant Proc*. 2001 Sep;33(6): 2941-2942.
74. Morel D, Normand E, Lemoine C. Tumor necrosis factor alpha in human kidney transplant rejection – analysis by in situ hybridization. *Transplantation* 1993; 55: 773-777.
75. Müller-Steinhardt M, Fricke L, Müller B, Ebel B, Kirchner H, Härtel C. Cooperative influence of the Interleukin-6 Promoter Polymorphisms –597, -572, -174 on Long-Term Kidney Allograft Survival. *Am J Transpl* 2004; 4: 402-406.
76. Müller-Steinhardt M, Härtel C, Müller B, Kirchner H, Fricke L. The interleukin-6 –174 promoter polymorphism is associated with long-term kidney allograft survival. *Kidney Int*. 2002 Nov; 62(5):1824-1827.
77. Murphy B. Genetic Polymorphisms and Transplantation. *Am J Kidney Dis* 2001 November, Vol 38, No 5: 1115-1118.
78. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CLS, O'Connell PJ, Allen RDM, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* Dec 11, 2003; 349; 24: 2326-2333.
79. Noronha IL, Eberlein-Gonska M, Hartley B, Stephens S, Cameron JS, Waldherr R. In situ expression of tumor necrosis factor-alpha, interferon-gamma, and interleukin-2 receptors in renal allograft biopsies. *Transplantation* 1992; 54: 1017-1024.
80. Ohta K, Takano N, Seno A. Detection and clinical usefulness of urinary interleukin-6 in the diseases of kidney and urinary tract. *Clin Nephrol* 1992; 38: 185-189.
81. Opelz G; Wujciak T, Dohler B, Scherer S, Mytilineos J. HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study. *Rev Immunogenet* 1999; 1: 334-342.
82. Pawlik A, Domanski L, Rozanski J, Florczak M, Wrzesniewska J, Dutkiewicz G, Dabrowska-Zamojcin E, Gawronska-Szklarz B. The cytokine gene polymorphisms in patients with chronic kidney graft rejection. *Transpl Immunol*. 2005 Mar; 14(1):49-52.
83. Pelletier R, Pravica V, Perrey C, Xia D, Ferguson RM, Hutchinson I, Orosz C. Evidence for a genetic predisposition towards acute rejection after kidney and simultaneous kidney-pancreas transplantation. *Transplantation*. 2000 Aug 27;70(4):674-680.
84. Perez L, Orte J, Brieva JA. 1995. Terminal differentiation of spontaneous rheumatoid factor-secreting B cells from rheumatoid arthritis patients depends on endogenous interleukin-10. *Arthritis Rheum* 38, 1771-1776.

85. Perrey Ch, Turner SJ, Pravica V, Howell WM, Hutchinson IV. ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, TNF- α , TNF- β and TGF- β 1 gene polymorphisms. *Transpl Immunol* 1999; 7: 127-128.
86. Plaza DM, Fernandez D, Builes M, Villegas A, Garcia LF. Cytokine gene polymorphisms in heart transplantation: association of low IL-10 production genotype with Quilty effect. *J Heart Lung Transplant*. 2003 Aug; 22(8): 851-856.
87. Pociot F, Briant L, Jongeneel CV, Molvig J, Worsaae H, Abbal M, Thomsen M, Nerup J, Cambon-Thomsen A. Association of tumor-necrosis-factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF- α and TNF- β by human mononuclear cells : a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol* 1993; 23: 224-231.
88. Poli F, Boschiero L, Giannoni F, Tonini M, Ancona G, Scalamogna M, Berra S, Sirchia G. TNF-alpha, IFN-gamma IL-6, IL-10, and TGF-beta1 gene polymorphisms in renal allografts. *Transplant Proc*. 2001 Feb-Mar; 33(1-2):348-9.
89. Ponticelli C. Renal transplantation 2004: where do we stand today? *Nephrol Dial Transplant*. 2004 Dec; 19(12): 2937-2947.
90. Poole KL, Gibbs PJ, Evans PR, Sadek SA, Howell WM. Influence of patient and donor cytokine genotypes on renal allograft rejection: evidence from a single centre study. *Transpl Immunol*. 2001 Feb; 8(4):259-265.
91. Posselt AM, Vincenti F, Bedolli M, Lantz M, Roberts JP, Hirose R. CD69 expression on peripheral CD8 T cells correlates with acute rejection in renal transplant recipients. *Transplantation* 2003; 76(1): 190-195.
92. Pravica V, Perrcy C, Plevris J, et al. Elevated frequency of TNF- α -308A allele in patients requiring liver transplantation . *Immunology* 1997; 92:13.3.
93. Ranieri E, Gesualdo L, Petrarulo F, Schena FP. Urinary IL-6/EGF ratio: a useful prognostic marker of renal damage in IgA nephropathy. *Kidney Int* 1996; 50: 1990-2001.
94. Sadeghi M, Daniel V, Wiesel M, Hergesell O, Opelz G. High urine sIL-6R as a predictor of late graft failure in renal transplant recipients. *Transplantation* 2003 Oct 27; 76(8):1190-1194.
95. Sankaran D, Asderakis A, Ashraf S, Roberts IS, Short CD, Dyer PA, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation. *Kidney Int*. 1999 Jul; 56(1):281-288.
96. Sariban E, Imanmura K, Leubbers R, Kufe D: Transcriptional and posttranscriptional regulation of tumor necrosis factor gene expression in human monocytes. *J Clin Invest* 81: 1506-1510, 1988.
97. Sayegh M, Carpenter CB. Transplantation 50 years later – progress, challenges, and promises. *N Engl J Med*. Dec 23, 2004. 351;26: 2761-2766.
98. Schaubel DE, Jeffery JR, Mao Y, Semenciw R, Yeates K, Fenton SSA. Trends in mortality and graft failure for renal transplant patients. *CMAJ*. 2002 July 23; 167 (2): 137-142.
99. Siddiqi N, McBride MA, Hariharan S. Similar risk profiles for post-transplant renal dysfunction and long-term graft failure: UNOS/OPTN database analysis (in process citation). *Kidney Int* 2004 may; 65(5): 1906-1913.
100. Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, Shapiro M, Vasconcellos L, Harmon W, Strom TB. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jan 21; 94(2):695-700.
101. Suthanthiran M. The importance of genetic polymorphisms in renal transplantation. *Curr Opin Urol* 10: 71-75.
102. Tagore A, Gonsalkorale WM, Pravica V, Hajeer AH, McMahon R, Whorwell PJ, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Interleukin-10 (IL-10) genotypes in inflammatory bowel disease. *1999 Tissue Antigens* 54: 386-390.
103. Takernoto SK, Terasaki PI, Gjertson DW, Cecka JM. Twelve year's experience with national sharing of HLA-matched cadaveric kidneys for transplantation. *N Engl J Med* 2000; 343: 1078-1084.
104. Tambur AR, Yaniv I, Stein J, Lapidot M, Shabtai E, Kfir B, Klein T. Cytokine gene polymorphism in patients with graft-versus-host disease. *Transplant Proc*. 2001 Feb-Mar; 33(1-2):502-503.
105. Tan LC, Howell WM, Smith JL, Sadek SA. Sequential monitoring of peripheral T-lymphocyte cytokine gene expression in the early post renal allograft period. *Transplantation* 2001 Mar 27; 71(6): 751-759.

106. Tian Y, Ishikawa H, Piao FY, Yamamoto H, Yamauchi T, Duan ZW, Zhang YM, Ma MY, Cui JS. Micronucleus Assay of human lymphocytes: A Comparison of Cytokinesis-block and Human Capillary Blood Lymphocytes Methods. *J Occup Health* 2003; 45: 408-409.
107. Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood*. 1994; 83:113-118.
108. Turner D, Grant SC, Yonan N, Sheldon S, Dyer PA, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Cytokine gene polymorphism and heart transplant rejection. *Transplantation*. 1997 Sep 15;64(5):776-779.
109. Vincenti F. Tacrolimus (FK 506) in kidney transplantation: five-year survival results of the U.S. multicenter, randomized, comparative trial. *Transplant Proc* 2001 Feb-Mar; 33(1-2): 1019-1020.
110. Voiculescu A, Schlieper G, Hetzel GR, Hollenbeck M, Ivens K, Willers R, Sandmann W, Grabensee B. Kidney transplantation in the elderly: age-matching as compared to HLA-matching: a single center experience. *Transplantation* 2002 Apr 27; 73(8): 1356-1359.
111. Warle MC, Farhan A, Metselaar HJ, Hop WC, Perrey C, Zondervan PE, Kap M, de Rave S, Kwekkeboom J, Ijzermans JN, Tilanus HW, Pravica V, Hutchinson IV, Bouma GJ. Cytokine gene polymorphisms and acute human liver graft rejection. *Liver Transpl*. 2002 Jul; 8(7): 603-611.
112. Warle MC, Farhan A, Metselaar HJ, Hop WC, Perrey C, Zondervan PE, Kap M, Kwekkeboom J, Ijzermans JN, Tilanus HW, Pravica V, Hutchinson IV, Bouma GJ. Are cytokine gene polymorphisms related to in vitro cytokine production profiles? *Liver Transpl* 2003 Feb; 9(2): 170-181.
113. Warle MC, Farhan A, Metselaar HJ, Hop WC, van der Plas AJ, Kap M, de Rave S, Kwekkeboom J, Zondervan PE, Ijzermans JN, Tilanus HW, Pravica V, Hutchinson IV, Bouma GJ. In vitro cytokine production of TNFalpha and IL-13 correlates with acute liver transplant rejection. *Hum Immuno*. 2001 Nov; 62(11): 1258-1265.
114. Watson N, Geczy A, Sullivan J, Broady K. *Human immunol* 2003; 64: 171.
115. Weimer R, Zipperle S, Daniel V, Carl S, Staehler G, Opelz G. Pretransplant CD4 helper function and interleukin 10 response predict risk of acute kidney graft rejection. *Transplantation*. 1996 Dec 15;62(11):1606-1614.
116. Wilson AG. Typing of tumor necrosis factor alleles. *Methods Mol Biol*. 2003; 210: 297-304.
117. Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW: Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. 1992 *Hum Mol Gene* 1:353.
118. Wilson AG, di Giovine FS, Duff GW. Genetics of tumor necrosis factor- α in autoimmune, infectious, and neoplastic diseases. *J Inflammation* 1995; 45: 1-12.
119. Wilson AG, Duff GW. Tumor necrosis factor. *Lancet*. 1995 Mar 11; 345(8950): 649.
120. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 3195-3199.
121. Wramner LG, Norrby J, Hahn-Zoric M, Ahlmén J, Börjesson PA, Carlström J, Hytönen AM, Olausson M, Hanson LÅ, Padyukov L. Impaired kidney graft survival is associated with the TNF-alpha genotype. *Transplantation*. 2004 Jul 15; 78(1): 117-121.
122. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998; 101:311-320.
123. Yan Q, Zhang P, Yang C. Chronic kidney isograft and allograft rejection. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*. 2002;22(3): 253-254.
124. Zhang Y, Hayes A, Pritchard A, Thaker U, Haque MS, Lemmon H, Harris J, Cumming A, Lambert JC, Chartier-Harlin MC, St Clair D, Iwatsubo T, Mann DM, Lendon CL. Interleukin-6 promoter polymorphism: risk and pathology of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2004 May 20; 362(2):99-102.
125. Deutsche Stiftung Organtransplantation. www.dso.de

Eigene Publikationen:

Breulmann B, Bantis C, Siekierka M, Blume C, Aker S, Kuhr N, Grabensee B, Ivens K. Influence of cytokine genes polymorphisms on long-term outcome in renal transplantation. *Clin Transplant*. 2007 Sep-Oct; 21(5): 615-21

7.1

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, deren Rat und Unterstützung diese Arbeit ermöglicht haben.

Frau Prof. Dr. med. K. Ivens für die Anregung, die Ermöglichung und die Unterstützung zur Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. med. Ch. Bantis für die Ratschläge, die großartige Hilfestellung beim Erstellen dieser Arbeit und die Motivation.

Frau Nicola Kuhr und Frau Christina Schwandt, deren fachkundige Hilfe im Labor eine große Unterstützung war, sowie dem gesamten Team des Nephrologischen Labors der Medizinischen Klinik der HHU Düsseldorf.

Den Patienten und Kontrollpersonen, die sich für diese Studie zur Verfügung gestellt haben.

Zuletzt möchte ich meinem Mann, meiner Familie und besonders meiner Schwester Eva danken für die Unterstützung, die Geduld und ihr Verständnis.

7.2 Lebenslauf

Name: Bärbel Kohlhase, geb. Breulmann

Geburtstag: 22.04.1973

Geburtsort: Ibbenbüren

Schulbildung: 1979 – 1992
Grundschule und Gymnasium
in Recke / NRW

Schulabschluss: Abitur

Ausbildung: 10/1992 – 09/1995
Ausbildung an der Hebammenschule der
Städtischen Kliniken Osnabrück

Abschluss: Staatlich examinierte Hebamme

Studium: 10/1998 – 09/2001
Studium der Medizin an der RWTH Aachen
10/2001 – 04/2005
Fortführung des Studiums der Medizin an der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Abschluss: 3. Staatsexamen
Approbation als Ärztin 05/2005

Beruflicher Werdegang: 10/1995 – 09/1998
Angestellte Hebamme, Siegen und Rheine.
06/2005 – 12/2006
Assistenzärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe im
Klinikum Niederberg, Velbert, Chefarzt Dr. G. Degoutrie
Seit 01/2007
Assistenzärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe im
Klinikum Ingolstadt, Chefarzt Prof. Dr. B. Aydeniz

Promotion: 05/2004
Poster "Influence of cytokine gene polymorphisms on
renal allograft function" beim XLI. ERA-EDTA-Congress
in Lissabon.

09/2004
Vortrag "Influence of cytokine genes polymorphisms on
long-term outcome in renal transplantation"
35. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie in Basel.

07/2007
Veröffentlichung in „Clinical Transplantation“:
Breulmann B, Bantis C, Siekierka M, Blume C, Aker S,
Kuhr N, Grabensee B, Ivens K. Influence of cytokine
genes polymorphisms on long-term outcome in renal
transplantation. Clin Transplant 2007. Sep-Oct.