Aus dem Klinikum München-Harlaching, Klinik für Nieren- und Hochdruckkrankheiten- Klinische Immunologie
Städt. Klinikum München GmbH

Akademisches Lehrkrankenhaus der Ludwig-Maximilians-Universität

Vorstand: Prof. Dr. med. J.E. Scherberich

Monozyten Phänotypie und Genpolymorphismen bei Langzeit-Nierentransplantierten: Rolle CD14+, CD16+, HLA-DR+ und Toll-like-Rezeptor positiver Blutmonozyten sowie der IL-4, IL-10, IFN-γ, GM-CSF und VDR BsmI Genpolymorphismen in der Risikostratifizierung der Transplantatprognose.

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Apostolos Farmakiotis

aus

München

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Jürgen E. Scherberich
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Thomas Nickel Prof. Dr. med. Michael Fischereder
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 22.01.2014

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung und spezifische Fragestellung

1.1 Pathologie & Morphogenese der Transplantatdysfunktion

Die chronische Transplantatdysfunktion und der damit längerfristig einhergehende funktionelle und strukturelle Verlust des Transplantates, weitgehend unabhängig der Entwicklungen in der Immunsuppression, stellt auch heute in der Nephrologie eine schwerwiegende Komplikation dar. Etwa 13 % der Nierentransplantate stellen innerhalb des ersten Jahres nach Organübertragung ihre Funktion ein, etwa 35% innerhalb der ersten fünf Jahre (Gjertson D.W. 2003). Die möglichen transplantatassoziierten Abstoßungsmechanismen, bzw. die der „Transplantatdysfunktion“, lassen sich sowohl aufgrund ihrer Pathogenese als auch nach morphologischen (histologischen) Merkmalen unterscheiden. Immunpathogenetisch wird eine humorale und eine zellvermittelte Transplantatabstoßung klassifiziert. Ausgelöst und gefördert wird sie u. a. durch Gewebs-(Zell-)inkompatibilitäten der Klasse I und Klasse II HLA-Antigene (MHC Klasse I und II). Zusätzlich beteiligt sind auch sogenannte „non-MHC Antigene“. Nach zeitlichen Gesichtspunkten werden die Abstoßungsreaktionen (engl.: graft dysfunction) in hyperakut, akut und chronisch unterteilt (Gärtner H.V. 2003).

1.2 Chronische Transplantatdysfunktion

Charakteristisch für die chronische Transplantatdysfunktion ist die progredient verminderte glomeruläre Filtrationsrate sowie die des renalen Plasmaflusses. Verbunden damit ist eine Erhöhung der Nierenretentionswerte und eine Zunahme der Proteinurie bzw. Wechsel eines tubulären in ein glomeruläres Ausscheidungsmuster. Die chronische Dysfunktion endet im kompletten Verlust des Transplantates (Gärtner H.V. 2003), das heißt, der Patient mündet wieder in die chronische Dialysebehandlung.
Faktoren, die eine chronische Dysfunktion begünstigen können, sind unter anderem die warme und kalte Ischämiezeit, Spender / Empfängerhistokompatibilität, Pharmatoxizität und verschiedene Genpolymorphismen u. a. in der Expression von Chemokinen (Almond P.S. 1993). Histologisch betrifft die Dysfunktion sowohl das Interstitium (Fibroblasten, Angioblasten, Makrophagen), die Tubuli als auch interstitielle Gefäße und die Glomeruli: Erkennbar ist im Interstitium eine vermehrte Fibrosierung, die Tubuli atrophieren, bzw. werden zerstört. Zusätzlich nimmt die Zahl immunologisch aktiver Zellen (T-und B-Zellen, Makrophagen, Monozyteninfiltration) im Interstitium zu. Vaskuläre Abstoßungsprozesse werden in Form einer chronischen „Transplantatvaskulopathie“ mit stenosierender Intimafibrose und einer glomerulären Beteiligung beschrieben. Faktoren, die eine chronische Dysfunktion begünstigen, sind neben den bereits erwähnten immunologischen

Parameter, die arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, „Mikroinflammation“, Infekte (insbes. CMV, Polyoma-Viren), aber auch die Anzahl akuter Abstoßungen (Gärtner H.V. 2003).
Die Vorgänge der chronischen Dysfunktion lassen sich allgemein unter dem Bild „zellproliferativer Veränderungen“ zusammenfassen. In der ersten Phase kommt es zu einer zunächst gering zunehmenden, persistierenden Infiltration immunkompetenter „aktivierter“ Zellen in das Transplantat, z. B. CD14+ Zellen. Die Ausschüttung von Zytokinen und chemotaktischer Faktoren vermittelt weitere Zellinfiltrate aus dem Blut in das Transplantat. Die Freisetzung von Zytokinen verstärkt dabei die Aktivierung von Endothelzellen und Fibroblasten; dadurch werden Adhäsionsmoleküle, HLA DR Antigene und Entzündungsmediatoren hochreguliert (Tilney N.L.1991, Hayry P. 1992, Paul L.C. 1992, Tullius S.G. 1995).

1.3 Faktoren, die eine chronische Transplantatdysfunktion begünstigen

Schrittmacher, die eine chronische Transplantatdysfunktion begünstigen, werden in zwei pathogenetisch relevante Gruppen eingeteilt. Zum einen handelt es sich um immunologisch abhängige und zum anderen um immunologisch unabhängige Faktoren (Almond P.S. 1993). Zu den immunologisch <u>un</u>abhängigen Faktoren (Alloantigen-unabhängige Faktoren) gehören:

- kalte und warme Ischämiezeiten
- die individuelle Immunsuppression
- Infektionen
- Anzahl in Funktion befindlicher Nephrone
- Einfluss einer Protein- und Lipidrestriktion
- Hirntod des Spenders

Zu den immunologisch relevanten Faktoren gehören:

- Akute Abstoßungsreaktionen (Monozyten, T / B Zellen, NK- Zellen)
- HLA Kompatibilität (HLA-Inkompatibilität)
- Adhäsionsmoleküle (vermehrtes „rolling“ aktivierter Monozyten)
- Komplementaktivierung
- Antikörpervermittelte Zellzytotoxizität
- immungenetische Faktoren
- angeborene / erworbene Immunität

Wenig beachtete Faktoren, denen zukünftig eine noch größere Rolle zugeschrieben werden muss, sind immunologische Ausprägungen (Phänotypen) auf Blutmonozyten als hauptsächliche Ziel- und Effektorzellen. Zu den interessantesten gehören deren

Differenzierungsmarker CD14, CD16 sowie TLR2 und TLR4 als Mustererkennungsrezeptoren (PRR, „pattern recognition receptor“).
Nierentransplantate mit chronischer Transplantatdysfunktion zeigen eine starke Akkumulation CD14 positiver Makrophagen im Interstitium und in den Glomeruli. CD14+CD16+ Monozyten als eine proinflammatorische Subpopulation, sind reife Monozyten mit Eigenschaften von Gewebsmakrophagen. Studien zeigten (Scherberich J.E. 2004), dass selbst unter optimaler Immunsuppression bei nierentransplantierten Patienten eine Erhöhung proinflammatorischer CD14+CD16+ Monozyten im Blut vorliegt. Es ist somit davon auszugehen, dass NTX Patienten aufgrund erhöhter inflammatorischer Mediatoren Zeichen einer „Mikroinflammation“ aufweisen, die u.a. die NTX-Vaskulopathie beschleunigen (akzelerierte Atherosklerose). So können CD14+CD16+ exprimierende Zellen, als Quelle reifer Gewebsmakrophagen, das Transplantat durchsetzen und dessen Funktion ungünstig beeinflussen (Abb. 1).
Mit gleicher Wertigkeit muss die Expression der TLR Rezeptoren auf den Monozyten betrachtet werden. TLR Rezeptoren und insbesondere TRL2 und TLR4 sind als Komponenten des angeborenen Immunsystems an einer adäquaten Antigenerkennung und Immunabwehr beteiligt. „Endogene Faktoren“, so z.B. membrangebundene und lösliche Alloantigene, die nach erfolgter Transplantation im Gewebe freigesetzt werden, führen über TLR2 und TLR4 zu einer Aktivierung und Migration auch (monozytärer) dendritischer Zellen (Goldstein D.R. 2006). Es gibt zunehmend Hinweise, das Toll-Like Rezeptoren bzw. TLR Polymorphismen, insbesondere von TLR4, das Nierentransplantatüberleben unmittelbar beeinflussen (Ducloux D. et al. 2005; Scherberich J.E. und Farmakiotis A. et al. 2008, 2009). Untersucht man dagegen immunkompetente Zellen (T/B-Lymphozyten, Monozyten) nach NTX bei eineiigen Zwillingen, so bleibt eine „Immunaktivierung“ des Empfängers durch potenzielle Antigene des Spenders aus, wie wir an einem unserer eigenen klinischen Fälle nachweisen konnten (Hüser N. et al. 2009).

Abgerundet wird diese Betrachtung durch Einbeziehung der zellmolekularen Genetik, durch die weitere Surrogatparameter bekannt wurden. Genetische Polymorphismen von Chemokingenen (u.a. CCR5, MCP1), Zytokinen (IL-4, IL-10, IFN γ, GM-CSF), der Vitamin-D Steroidhormonrezeptoren (VDR) und wahrscheinlich auch der TLR Rezeptoren, modulieren zusätzlich eine chronische Transplantatdysfunktion bzw. das Transplantatüberleben. Die vorgelegte Dissertation beschäftigt sich deshalb u.a. mit der möglichen Beziehung aktivierter antigenpräsentierender Zellen und deren funktionellen Markerproteine (Endotoxin-Rezeptor, Fc-Gamma III Rezeptor, HLA-DR Expression, Expression von TLR).

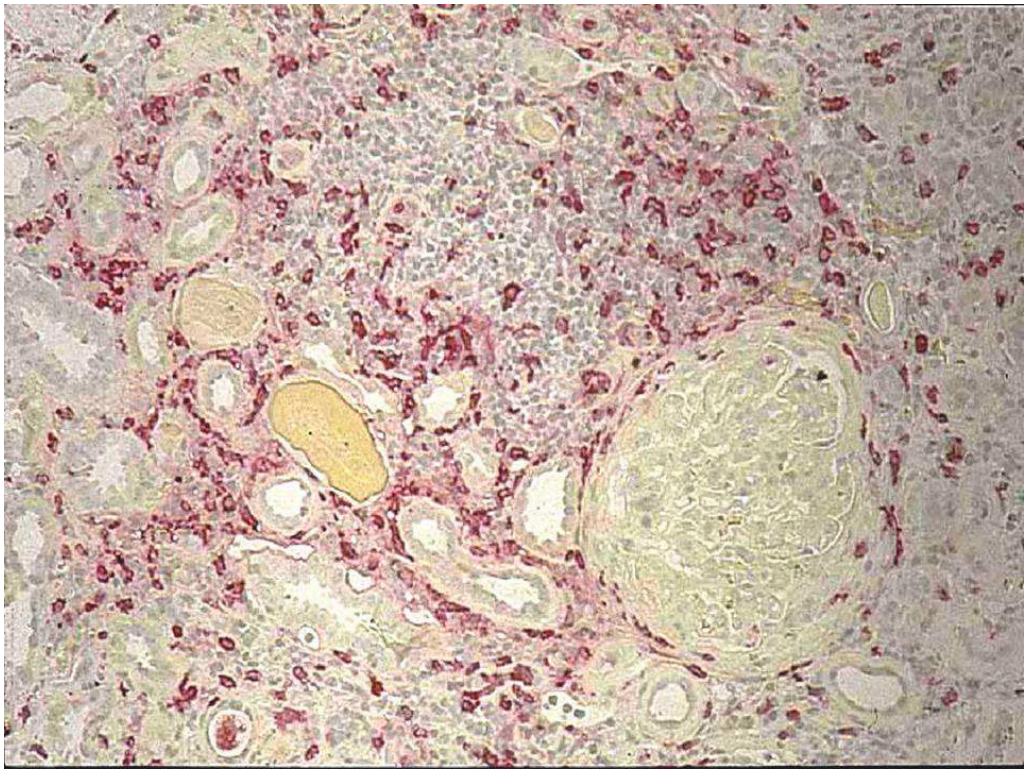


Abbildung 1: Immunhistochemische Markierung Gewebe infiltrierender Monozyten / Makrophagen, eines Nierentransplanat mit chron. progredienter Transplantatdysfunktion. Positive Reaktion auf CD 68, Vergrößerung ca. 80fach (J.E. Scherberich et al.).

1.4 Einteilung der chronischen Transplantatdysfunktion

Histopathologisch wird die chronische Abstoßungsreaktion anhand der sogenannten Banff-Klassifikation in drei Stadien eingeteilt. Die Hauptkriterien für die Einteilung sind das Ausmaß der interstitiellen Fibrose und die Atrophie der Tubuli. Grad I beschreibt eine milde interstitielle Fibrosierung mit (a) oder ohne (b) spezifische Veränderungen einer chronischen Abstoßung (geringgradige chronische Ischämie). Grad II beschreibt eine moderate interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie, verknüpft mit den Zeichen einer mäßigen chronischen Ischämie. Grad III beschreibt histologisch eine fortgeschrittene interstitielle Fibrose mit tubulärer Atrophie und tubulären Verlust, zusammen mit den Zeichen einer schweren chronischen Ischämie (Campbell P.M. 2004).

The Banff 97 scoring criteria

1. Normal, see Definitions

2. Antibody-mediated rejection
   Rejection due, at least in part, to documented anti-donor antibody ('suspicious for' if antibody not demonstrated); may coincide with categories 3, 4 and 5
   Type (Grade):
   I. ATN-like – C4d+, minimal inflammation
   II. Capillary- margination and/or thromboses, C4d+
   III. Arterial – v3, C4d+

3. Borderline changes: 'Suspicious' for acute cellular rejection
   This category is used when no intimal arteritis is present, but there are foci of mild tubulitis (1–4 mononuclear cells/tubular crosssection) and at least i1; may coincide with categories 2 and 5

4. Acute/active cellular rejection
   T-cell-mediated rejection; may coincide with categories 2 and 5

   Type (Grade) Histopathological Findings:

   IA Cases with significant interstitial infiltration (>25% of parenchyma affected) and foci of moderate tubulitis (>4 mononuclear cells/tubular cross section or group of 10 tubular cells)

   IB Cases with significant interstitial infiltration (>25% of parenchyma affected) and foci of severe tubulitis (>10 mononuclear cells/tubular cross-section or group of 10 tubular cells)

   IIA Cases with mild-to-moderate intimal arteritis (v1)

   IIB Cases with severe intimal arteritis comprising >25% of the luminal area (v2)

   III Cases with 'transmural' arteritis and/or arterial fibrinoid change and necrosis of medial smooth muscle cells with accompanying lymphocytic inflammation (v3)

5. Chronic/sclerosing allograft nephropathy
   Fibrosing changes in the allograft, with or without features of true alloimmune injury to the graft; may coincide with categories 2, 3, and 4

   Grade Histopathological Findings:

   Grade I (mild) Mild interstitial fibrosis and tubular atrophy without (a) or with (b) specific changes suggesting chronic rejection

   Grade II (moderate) Moderate interstitial fibrosis and tubular atrophy (a) or (b)

   Grade III (severe) Severe interstitial fibrosis and tubular atrophy and tubular loss (a) or (b)

6. Other
   Changes not considered to be due to rejection; may coincide with categories 2, 3, 4, and 5

Reprinted with permission from Blackwell Publishing, ref 57517, American Journal of Transplantation 2003; 3: 708–714

Tabelle 1: Banff Klassifikation. Am. J. Trans. 2003; 3: 708-714, 2008; 8: 753-760

1.5 Therapieoptionen der chronischen Transplantatdysfunktion

Die klinisch umsetzbaren Therapiemöglichkeiten eines chronischen Transplantatversagens sind sehr beschränkt. Aktuell gibt es keine etablierten Therapieformen, die den Prozess der chronischen Dysfunktion gezielt verhindern könnten. Die zur Verfügung stehenden Konzepte beschränken sich in einer „Abschwächung" Alloantigen-unabhängiger Faktoren, um eine unspezifische „Traumatisierung" des Transplantates zu vermeiden (Terasaki P.I. 1995, Gulanikar A.C. 1992, Basadona G.P. 1993). In dieses Therapieschema gehört auch die Vermeidung potenziell zelltoxischer Einflüsse vor und während der Transplantatentnahme, wie z.B. Röntgenkontrastmittel, lineare Gadoliniumhaltige Kontrastmittel wie früher für die MRT- gebräuchlich, nephrotoxische Antibiotika (Aminoglycoside), nichtsteroidale Antirheumatika/Analgetika, etc. (Land W. 1998).

Ischämie- und Reperfusionsschäden aktivieren im Spenderorgan Zytokine und Chemokine und erhöhen die Expression von Adhäsionsmolekülen. Am NTX Überleben sind ganz offensichtlich auch Toll-like-Rezeptoren (TLR) beteiligt, wie aus den hier dargestellten Befunden ersichtlich wird. Generell findet sich bei Nierentransplantierten eine geringere TLR4 und TLR2 Expression auf peripheren Monozyten und neutrophilen Granulozyten, die jetzt unsere Daten unterstützen (Farmakiotis A., Scherberich JE. 2008; Nogueira E. et al. 2010). In Nierenbiopsien von Nierentransplantaten waren die mRNA Konzentrationen verschiedener TLR´s (TLR1-10) tendenziell unter akuten Abstoßungsreaktionen erhöht (Dessing MC. et al. 2010); d.h. dass von einer verminderten Zytokin-vermittelten Rekrutierung inflammatorischer, das NTX einwandernder Entzündungszellen auszugehen ist. Abregulation von TLR (über z.B. TLR Antagonisten) und Unterbrechung oder Abschwächung, der daraufhin vermittelten Zytokin/Chemokinkaskade könnte, eine Behand- lungsoption der chronischen Transplantatdysfuntion sein. Schon länger bekannt ist der Zusammenhang zwischen Ischämiezeit und Langzeitüberleben des Transplantates (Kasike B.L. 1997, Rao K.V. 1990, Chertow G.M. 1996, Cecka J.M. 1995, Hariharan S. 1997), wobei pathophysiologisch Sauerstoffradikale, TLR-Aktivierung, verstärkte Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen in der Reperfusionsphase wirksam werden und durch geeignete „Inhibitoren“ nephroprotektiv auf das Transplantatüberleben wirken sollten. Des Weiteren ist die rechtzeitige Behandlung von Infektionen immunsupprimierter Patienten für die Langzeitfunktion des Transplantates entscheidend. Die Infektion mit dem Cytomegalievirus ist für eine nicht unerhebliche Anzahl von Komplikationen nach einer Transplantation verantwortlich (Loebe M. 1990, Koskinen P.K. 1993). Eine richtige Einstellung der enteralen Protein- und Fettaufnahme des Patienten kann ebenfalls Einfluss auf die Funktion des Transplantates nehmen. So verbessert eine diätische eiweißarme Kost die Langzeitfunktion des Transplantates (Feehally J. 1986), wie auch die Einstellung der Fettaufnahme und insbesondere der Cholesterinaufnahme, die zu Lipideinlagerungen und zu Schädigung des Endothels (endotheliale Dysfunktion) führen können (Gao S.Z. 1987). Zur Vorbeugung einer chronischen Transplantatdysfunktion ist die zeitgerechte Behandlung akuter Abstoßungsreaktionen essenziell. Die Anzahl akuter Abstoßung-reaktionen beeinflusst unmittelbar das Langzeitüberleben eines Nierentransplantates.

1.6 Spezifische Fragestellung

Wir untersuchten die immunologischen Zusammenhänge zwischen der Phänotypie bestimmter Monozyten-Subpopulationen und Transplantatdysfunktion bei Kurz- und Lanzeittransplantierten. Dabei stand die Expression verschiedener funktionell bedeutsamer Moleküle peripherer antigenpräsentierender Blutzellen (Monozyten) Nierentransplantierter (NTX), die ein Transplantatüberleben von mehr als 14 Jahren aufwiesen (stabile Langzeittransplantierte) im Vordergrund.

Ungeachtet gleicher immunsuppressiver Medikation ist der Grund für dieses „Langzeitüberleben“ des Transplantates noch weitgehend unklar. Aus unseren Voruntersuchungen war bekannt, dass bestimmte zelluläre proinflammatorische Phänomene durch aktuelle medikamentöse Therapieschemata nur bedingt beeinflussbar waren. Dabei standen CD14+CD16+ HLADR+ Monozyten, neben Lymphozyten als die entscheidenden Ziel- und Effektorzellen einer Transplantatdysfunktion, im Fokus unserer Analysen. Explantierte Nieren wiesen in der quantitativen Bildanalyse massive maladaptive Strukturveränderungen und einen um den Faktor 10 erhöhten Anteil gewebsständiger CD14-positiver Zellen auf (Scherberich JE. et al 1989, Chenchanna-Merzhäuser 2006).

Die Verlaufsbeobachtung schloss, neben klinischen Kriterien, alle wesentlichen Routine-Blutparameter und das quantitative Proteinausscheidungsmuster im Harn aller nierentransplantierter Patienten ein. Wir untersuchten die Messgrößen über einen Langzeitverlauf von jeweils mehr als 14 Jahren, um zu klären, ob mit wenigen „Markern“ eine zuverlässige „Vorhersage“ der Transplantatfunktion (Prognose) möglich ist.

Des Weiteren untersuchten wir den möglichen immunologischen und genetischen Zusammenhang obiger Parametern zwischen Aktivierungsmarkern peripherer Blutmonozyten auf drei definierten Subpopulationen und der Phänotypie pro-inflammatorischer und antiinflammatorischer Zytokine sowie eines Steroid-hormonrezeptors. Aktivierte periphere Monozyten sind an der Freisetzung sowohl proinflammatorischer als auch antiinflammatorischer Zytokine beteiligt, die wie-derum Rückwirkungen auf die Transplantatdysfunktion nehmen können.

Wir fokussierten uns auf folgende spezifische Fragestellungen:

- **Wie ist der Verlauf von Standard (Routine)- Blutparametern und des quantitativen Proteinausscheidungsmusters im Harn bei Nierentransplantierten im Kurz-und Langzeitverlauf?**
- **Wie ist der Verlauf roter und weißer Blutzellparameter Nierentransplantierter nach erfolgter NTX über mindestens 14 Jahre (Langzeitbeobachtung)?**
- **Welche zellimmunologischen Merkmale haben von uns definierte Subpopulationen peripherer Monozyten (Immunphänotypie) von NTX Patienten?**
- **Wie verhalten sich die funktionellen Zellmarker CD14 (pleiotroper Endotoxin Rezeptor), CD16 (niedrig affiner Fc-gamma-IIIR), HLA-DR und die Toll-Like-Rezeptoren TLR2 und TLR4 im Kurz- und Langzeitverlauf nach Nieren-transplantation, jeweils untersucht auf den verschiedenen Monozyten-subpopulationen?**
- **Welche zellimmunologischen Merkmale stehen im Zusammenhang mit einem Transplantatüberleben von <u>über 14 Jahren</u>?**

- **Welche molekulargenetischen Merkmale weisen „Langzeittransplantierte“ für antiinflammatorische Zytokine IL4, IL10, proinflammatorische Zytokine IFN γ, GM-CSF und des Vitamin-D Rezeptors auf?**
- **Welche Schlussfolgerungen ergeben sich aus den erhaltenen Analysedaten?**

2. Grundlagen CD14

2.1 CD14 (pleiotroper LPS-Rezeptor und mehr)

CD14 ist ein Differenzierungsmarker (Cluster of Differentiation, CD) auf antigenpräsentierenden Zellen (APC), wie es reife Monozyten, Makrophagen und u.U. auch B-Zellen sind (z.B. Simmons D.L. 1989). Differenzierungsmarker (CD) sind Glykoproteine, die zellspezifisch exprimiert werden und unterschiedliche Funktionen erfüllen. Neben der Rezeptor- und Signalfunktion konnten für einige Differenzierungsmarker auch eine enzymatische Aktivität belegt werden (z.B. CD10= neutrale Peptidase-24-11; CD26: Dipeptidylpeptidase IV etc.). Einige Hundert Moleküle wurden als Differenzierungsmarker bis zum heutigen Zeitpunkt näher analysiert und vermutlich wird ihre Anzahl in den nächsten Jahren weiter ansteigen (Leukocyte Typing VII, Oxford University press 2002).
Beschrieben wurde das CD14 Epitop erstmalig 1982 auf dem ersten Leukozyten-Typisierung Workshop (Bernard A. 1984). Zehn monoklonale Antikörper zeigten eine hohe Affinität gegenüber einer homogenen Antigenbande menschlicher Blutmonozyten (Todd R.F. 1984, Griffin J.D. 1984). Auf der dritten Leukozyten-Typisierung Konferenz 1986, wurde diesem Differenzierungsmarker ein breites Spektrum an Epitopen zugewiesen, welche sie als Antigene erkennen konnten. Darüber hinaus wurde CD14 auf CD14 positiven Zellen durch Immunpräzipitation und Western-Blot Analyse nachgewiesen (Bazil V. 1986a, Goyert S.M. –Ferrero E. 1986).
Der Differenzierungsmarker CD14 ist ein 55 kDa Glykoprotein auf der Membranoberfläche von Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (Todd R.F. 1984).
Das Gen, das CD14 codiert, befindet sich auf dem fünften Chromosom in Position 5q23-31, welche in Zusammenhang mit diversen Zytokinen und myleoid-spezifischen Faktoren, wie Interleukine und GM-CSF, steht (Goyert S.M. –Ferero E., 1988). Genetische Untersuchungen der CD14 cDNA an Mäusen, Hasen und Menschen ergaben eine bemerkenswerte Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz (Lee J.D. 1992).
Die Zahl der CD14 Moleküle auf peripheren Blutmonozyten wird auf etwa 50.000 / pro Zelle geschätzt (Van Voorhis W.C. 1983). Neutrophile Granulozyten haben dagegen nur ein Zehntel der Anzahl an CD14 Epitopen im Vergleich zu Blutmonozyten (Wright S.D. 1991a).
Das CD14 Antigen wurde erstmals als „myeloides Differenzierungsantigen“ auf reifen antigenpräsentierenden Zellen entdeckt, das wiederum auf myeloiden Vorläuferzellen fehlt. Seine Expression wurde mit verschiedenen Formen maligner myeloider Leukämien in Zusammenhang gebracht. Die wichtigste Funktion, die man für das CD14 Molekül entdeckt hat, ist die Erkennung von LPS (Lipopolysaccharid, Endotoxin) sowie die der LPS-LBP-(Lipopolysaccharid Binding Protein) Komplexe (Wright S.D. 1990a).
Charakteristisch für den Aufbau des CD14 ist, dass eine transmembrane Aminosäure-sequenz völlig fehlt, was auf die Notwendigkeit eines weiteren Moleküls für die Signalweiterleitung („signaling“, Signaltransduktion,) schließen lässt (Kielian T.L. 1995). Bei

Analysen an Monozyten stellte sich heraus, dass CD14 mit einer Tyrosin-Kinase Aktivität (ko) präzipitiert und es wohl mehrere Wege zur Aktivierung der Tyrosin-Kinase existieren (Stefanova I. 1991, Weinstein S.L. 1993, Han J. 1994). Als alternativer Weg zur Signaltransduktion kommt auch eine Transduktion durch intrazelluläre Translokation von G-Proteinen infrage (Yasui K. 1992). Erst aber die Entdeckung der Toll-like-Rezeptoren (TLR) ermöglichte eine differenzierte Charakterisierung und Einordnung des CD14 Moleküls (Anderson K.V. 2000), da CD14 auch Partner von TLR-Molekülen, z.B. von TLR4, sein kann. CD14 ist nicht direkt an der Transduktion des Signals beteiligt, sondern liefert eine Bindungsstelle für LPS auf der Zelloberfläche (Lee J.D. 1993). CD14 bindet nicht nur LPS auf der Membranoberfläche, sondern transloziert („führt") quasi das gebundene LPS, sodass weitere Signalproteine auf deren Zelloberfläche dieses als Antigen erkennen können (Raetz CRH. 1991). Diese wichtige Eigenschaft des Differenzierungsmarkers CD14 wird durch seine besondere Verankerung auf der Oberfläche der Zellen vermittelt (Simmons D.L. 1989).
Zwei Zustandsformen von CD14 werden unterschieden: eine membrangebundene (mCD14) und eine im Plasma lösliche Form von CD14 (sCD14, „soluble" CD14).
Die membrangebundene Form von CD14 (mCD14) partizipiert an der Bindung von LPS und LPS-LPB Komplexen auf Monozyten, Makrophagen und Granulozyten, wohingegen die lösliche Form des CD14 (sCD14) an der Aktivierung von Zellen beteiligt ist, die keine Expression des Differenzierungsmarkers auf ihrer Oberfläche aufweisen. Die Serum Konzentration von sCD14 zeigt krankheitsspezifische Veränderungen u.a. bei Infektionen und Systemerkrankungen und wird im Harn bei Nierenerkrankungen vermehrt eliminiert.
(Nockher W.A. et al., Scherberich J.E. et al. 1994, 1997, 2000)

2.2 Aufbau des CD14 Membranproteins (mCD 14).

Die Sequenz des CD14 Clusters besteht aus 17 hydrophoben und neutralen Aminosäuren an seinen carboxyterminalen Ende, sowie fünf potenziellen Seiten für eine N-vermittelte Glykosylierung (Goyert S.M. 1988). Das Molekül beinhaltet eine leucinreiche Sequenz, die im Zusammenhang mit der Formung von amphipathischen Molekülen durch Interaktion mit Lipiden steht (Setoguchi M. 1989).

2.3 Verankerung des CD14 (mCD14) auf der Membranoberfläche

CD14 ist durch einen GPI–Anker (Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol Anker) auf der Oberfläche der Zellen verankert (Haziot A. 1988, Simmons D.L. 1989). Der Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol Anker ist ein weit verbreitertes Verbindungsglied auf der Membran-

oberfläche zahlreicher eukaryotischer Zellen (Abb. 2). Viele unterschiedliche Proteine verwenden diesen Verankerungsmechanismus zu ihrer Befestigung auf Zellmembranen. Gemeinsames Merkmal der Proteine, die einen GPI–Anker zur Befestigung verwenden ist, dass sie an ihrem C-terminalen Ende eine Verbindungsdomäne besitzen, die keine hydrophobe Sequenz aufweist (Low M.G. 1987). Der Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol Anker selbst wird aus drei Bereichen zusammengesetzt:

1 Einem Phospatidyl-Inositol Molekül, dessen 1,2 Diacylglycerol-Anhang in der Lipid-Doppelschicht der Membran verankert ist.
2 Einem Glykanmolekül mit variabler Struktur und Zusammensetzung. Die Verbindung zwischen dem Glykan und dem Phosphatidylinositol Molekül erfolgt über eine glykosidische Verbindung mit einem Glukosamin, das eine freie Aminogruppe besitzt.
3 Einem Ethanolamin, das über ein Amid mit seinem Aminoende an die a-carboxyl Gruppe der C-terminalen Aminosäure eine Verbindung eingeht. Das nicht reduzierende Ende des Glykanmoleküls enthält Mannose- 6-Phosphat, das über einen Phosphodiester an die Hydroxylgruppe des Ethanolamid gebunden ist (siehe Abbildung 2).

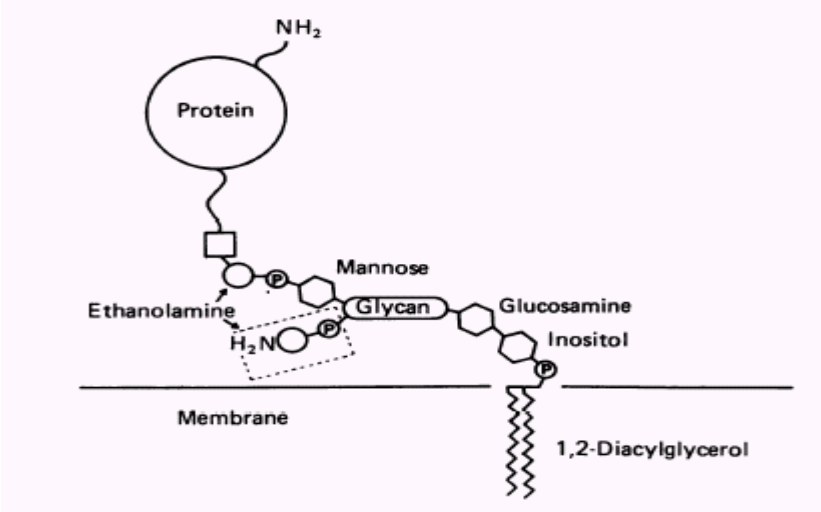


Abbildung 2: Aufbau des GPI-Anker's (Low M.G., Saltiel A.R.: Structural and functional roles of Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol in membranes. Science 1988; (239): 258-275

Die Verbindung von Proteinen mittels eines GPI-Ankers auf der Membranoberfläche bietet zwei Vorteile gegenüber anderen transmembranen Verankerungsmechanismen. Zum einen gewährleistet es die Mobilität des zu befestigenden Proteins, zum anderen begünstigt diese Verbindungsart die Freisetzung („Schedding“) und Aufnahme von

Proteinen. Die erhöhte Mobilität des GPI-Ankers lässt auch Seitenbewegungen der Proteine zu, was die Ausrichtung dieser während einer Komplexbildung begünstigt und deren physiologische Eigenschaften verstärken bzw. modulieren kann (Low M.G. 1987).

2.4 Regulation der CD14 Expression

Die Expression von CD14 wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst und reguliert. Darunter gehören auch Mediatoren, die an der Reifung von Monozyten zu Makrophagen beteiligt sind (Landmann R. 1990), diverse Zytokine (IL-1β) und Lipopolysaccharide (Gassani 1993). Die Expression der Differenzierungsmuster auf Makrophagen *in vivo* ist verschieden stark ausgeprägt und unterscheidet sich in den Geweben, in denen diese repräsentiert werden. Alveolarmakrophagen haben eine geringere, Peritonealmakrophagen eine höhere Expression von CD14 (Passlick B. 1989). Sowohl die Exposition antigenpräsentierender CD14-positiver Zellen mit Zytokinen oder Liganden wie LPS, oder Zell-zu-Zell Interaktionen, haben einen Einfluss auf die Ausprägung von mCD14. 1,25- Dihydroxy-VitaminD_3 Hormon induzierte in prämonozytischen THP-1 Zelllinien eine (erhöhte) CD14 Expression und korrelierte mit einer erhöhten Bindungsaffinität gegenüber LPS. Die Zugabe von Antikörpern gegen CD14 während der Zellreifung prämonozytischer THP-1 Zelllinien reduzierte die Affinität gegenüber LPS (Martin T.R. 1994). IL-4 induziert eine dosisabhängige Regulierung von CD14 und mindert nicht nur die Expression von CD14 auf Monozyten, sondern auch die Freisetzung des löslichen CD14 im Serum. Analog beeinflusst auch IFN-γ (Interferon γ) die Freisetzung von sCD14 im Serum und vermindert dessen Freisetzung aus Makrophagen und Monozyten, wie auch die Expression von mCD 14 auf der Zelloberfläche (Landmann R. 1992, Lauener 1990a). Andere Zytokine wie IL-1-, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6 und TGF-β (Transforming Growth Factor) scheinen dagegen kaum die CD14 Expression zu beeinflussen. Eine modulierende Wirkung von TNF-α wird kontrovers diskutiert. Die Mehrzahl der Untersuchungen weißt auf einen geringeren Einfluss von TNF-α bei Makrophagen und Monozyten hin als ursprünglich angenommen (Wright S.D. 1991b, Landmann R. 1990, Lauener R.P. 1990a). TNF-α, GM-CSF, G-CSF sollen eine bis zu zweifache Erhöhung der Expression von CD14 auf neutrophilen Granulozyten induzieren (Hansen P.B. 1993, Wright S.D. 1991b). Glukokortikoide hemmen dagegen die CD14 Synthese. Glukokortikoide reduzieren akut und prolongiert dosisabhängig mCD14 und sCD14 sowie CD16 auf peripheren Blutmonozyten. Dies kann einerseits eine erhöhte Infektanfälligkeit einer Medikation mit Glucocorticoiden besser verstehen helfen (Nockher W. und Scherberich J.E. 1997), andererseits aber auch eine deregulierte Hyperinflammation z.B. Sepsis verhindern.

Die CD14-Antwort (Synthese, Modulation) nach Stimulation von Zielzellen mit Zytokinen, sowohl in vitro als auch in vivo, ist abhängig vom untersuchten Gewebe, verschiedene Zellsubpopulationen, der Menge eingesetzter Zytokine sowie der experimentellen Bedingungen, unter denen die Untersuchungen durchgeführt wurden, wobei speziesspezifische Unterschiede bestehen.

2.5 Lipopolysaccharid als Bestandteil gramnegativer Bakterien

Lipopolysaccharid (LPS) ist ein wichtiger funktioneller Bestandteil gramnegativer Bakterien. Man bezeichnet LPS auch als Endotoxin (Wurfel M. 1997). Lipopolysaccharide werden aus drei Untereinheiten zusammengesetzt. Aus einer O-spezifischen antigenpräsentierende Seitenkette, einer zentralen Polysaccharid-Kernzone, und einem Glucosamindisaccharid mit einer variablen Zahl an Fettsäuren (Chan S. 1994, Olson 1988), das man als Lipid A bezeichnet. Lipid A ist die biologisch aktive Komponente der Lipopolysaccharide, während im Gegensatz dazu, die Oligosaccharidketten für die große Anzahl an Antigenvarianten verantwortlich ist (Wurfel M. 1997). LPS hat keine Wirkung, solange es an der Bakterienmembran gebunden ist. Zerfällt die bakterielle Zellmembran, kommt es zur Freisetzung von LPS. Erst das freigesetzte LPS ist für die Auslösung einer immunologischen Antwort im Wirtorganismus verantwortlich (Rietschel E.T. 1994). Ebenfalls bekannt ist, dass nicht allein Lipopolysaccharid (Endotoxin) selbst für die gravierenden Konsequenzen eines septischen Schocks verantwortlich ist, sondern erst die durch LPS ausgelöste übermäßige Freisetzung potenter Mediatoren und Zytokine, wie IL-1β oder auch TNF-α (Morrison D.C., Ryan J.L., 1987). LPS ist ein lösliches amphiphiles Molekül, das in flüssigen Medien Aggregate bildet. Dadurch ist es dem Lipopolysaccharid selbst nicht möglich spontan zu diffundieren und den CD14 Rezeptor zu erreichen, sondern es bedarf eines Transportproteins wie dem des LPB (Wurfel M. 1994).

2.6 Einfluss von LPS auf die Regulierung von CD14

Der Hauptligand für den (pleiotropen) CD14 Rezeptor ist LPS. Die Stimulation von LPS auf den antigenpräsentierenden Zellen kann, in Abhängigkeit der Zielzelle, unterschiedliche Effekte auf deren CD14 Expression haben. Sowohl periphere Blutmonozyten als auch Alveolarmakrophagen erhöhen nach Exposition mit LPS deren CD14 Expression (Brugger W. 1991, Birkenmaier C. 1992). Dieser Schritt hängt von der LPS-Konzentration ab. Wir beobachteten auch eine Blockierung und Hemmung der CD14 Expression bei höheren LPS Konzentrationen *in vitro*. In Makrophagen, die sich von Monozyten ableiten, sowie in Monozyten, die aus Patienten mit einer Sepsis stammen, zeigt LPS kaum oder

sogar einen hemmenden Effekt auf deren Differenzierungsmarker CD14 (Wright S.D. 1991b, Birken Maier C. 1992). Auch die Infusion von LPS bei Gesunden hatte nach Untersuchungen von Smith et al., sechs Stunden nach der Exposition keine signifikante Erhöhung der Rezeptordichte auf den Zellen zur Folge (Smith P.D. 1994). Die Datenlage ist jedoch widersprüchlich (Martin T.R. 1992). Diese unterschiedlichen Beobachtungen zeigen u.a, dass die Effekte von LPS abhängig vom Reifegrad der Zellen im Moment der Exposition sind. Ein weiterer Faktor ist die Zeit, in der die Zellen diesem Stimulus ausgesetzt sind (was häufig über längere Kulturzeiten unter in vitro-Bedingungen nicht immer untersucht wird); nicht immer werden mögliche Konzentrationsabhängigkeiten der Liganden (LPS) auf die CD14 Expression in vitro/in vivo, und/oder die Zeitintervalle im Verlauf über mehrere Tage, untersucht (Kielian T.L. 1995, M. Sehner 2010).

2.7 Funktion des CD14 Differenzierungsmarker

Aktivierung des CD14 Clusters mit LPS führt zur Ausschüttung diverser Zytokine wie IL- 1, IL- 6, IL- 8 und TNF-α (Dentener M.A. 1993). Die LPS induzierte Stimulation dieser Mediatoren ließ sich in Untersuchungen durch Inaktivierung der CD14 Cluster mittels monoklonaler CD14 Antikörper (CD14 mAb), hemmen. Im Gegensatz hierzu war die Freisetzung dieser Mediatoren durch Stimulation der antigenpräsentierenden Zellen mit Zymosan, PMA, IL-1β und TNF-α nicht beeinträchtigt (Dentener M.A. 1993). Diese Beobachtung unterstreicht die Bedeutung des CD14 für die Erkennung bakteriellen Endotoxins. Genetische Untersuchungen durch Lee et al., mittels Transfektion von CD14 cDNA, unterstrichen diese Beobachtungen auch auf genetischer Basis (Lee J.D. 1992). Weitere Funktion von CD14 ist die Zell-zu-Zell-Interaktion und Aktivierung CD14 negativer Zellen, wie es (in der Regel) Epithelzellen sind. Behandlung von Monozyten mit monoklonalen CD14 Antikörpern verhindert eine Adhäsion der im peripheren Blut zirkulierenden Monozyten an aktivierte Endothelzellen (Beekhuizen H. 1991, Lue K.H. 1991, Worthen G.S. 1992). CD14 komplexiert mit TLR2 und TLR4, was zu einer verstärkten Signaltransduktion und Initiierung von Transkriptionsfaktoren für die Signalweiterleitung in das Zellinnere führt.

2.8 CD14 und TLR2

Als oberflächliches Membranprotein ist CD14 selbst nicht in der Lage ein Signal auf direkten Weg in die Zelle zu übermitteln, sondern dient dem TRL2 Rezeptor bei der Erkennung der LPS-Liganden. Die Koexpression von CD14 zusammen mit TLR 2 verstärkt die Signaltransduktion durch die Zellmembran. Genetische Untersuchungen zeigten, dass

die Koexpression von CD14 und TLR2 eine Gentranskription und Zytokinsekretion vermittelt (über Nf-kappa B). Diese war um den Faktor sieben höher als in Zellen, die ausschließlich nur TLR2 auf ihrer Oberfläche exprimierten und kein CD14 als Kofaktor bzw. Partner hatten. Somit ist es möglich selbst bei geringsten LPS Konzentrationen eine effektive Immunantwort in Zielzellen auszulösen (Kirschning C.J. 1998).

2.9 Weitere Funktionen der membrangebundenen Form mCD14

Zellen, deren Lebenszyklus endet, werden durch Phagozytose oder Apoptose im Organismus eliminiert. Untersuchungen von Savil et al. zeigten einen Zusammenhang zwischen der Phagozytose apoptotischer Zellen und der Präsenz von CD14 Molekülen (Savil J. 1993). Die Phagozytose apoptotischer Zellen erfolgte ohne Entzündungsmerkmale. CD14 interagiert mit diesen Zellen und „markiert“ diese für die Phagozytose (Devitt A. 1998).

2.10 Die lösliche Form von CD14 (sCD14)

Lösliches CD14 (sCD14) ist ein Serumprotein mit einem Molekulargewicht von 48 kDa. Es ist kleiner als die membrangebundene Form von CD14 (mCD14), was vermuten lässt, dass es durch enzymatische Abspaltung und Lösung seines GPI Membrananankers freigesetzt wird (Bazil V. 1989). Die Behandlung von Monozyten mit Phosphatidylinositol spezifischer Phospholipase C führt zu einer unvollständigen Ablösung von CD14 aus der Zelloberfläche (Haziot A. 1988). Die biochemische Untersuchung des durch Phospholipase C freigesetzten CD14 Proteins zeigt, dass dieses Molekül größer ist als das im Serum vorhandene sCD14 Protein. Der Unterschied liegt im Fehlen von Ethanolamin, einem Kompartiment des GPI-Verankerungssystems, im sCD14 (Haziot A. 1988). Spezifische Phospholipasen oder auch Proteasen können eine Abtrennung vom GPI-Anker herbeiführen („Schedding“). Zudem wird *in vivo* sCD14 im Harn nierenerkrankter Patienten, oder auch im Harn von Patienten mit einer sekundären Amyloidose (Kielian T.L. 1995), ausgeschieden. Bei *in vitro* Untersuchungen an Kulturbeständen von HLA 60 Zellen, nach Einleitung einer Monozytendifferenzierung, oder in Kulturmedien transfizierter CD14 exprimierender Zellen, kann ebenfalls sCD14 im Überstand nachgewiesen werden (Haziot A. 1988, Bazil V. 1991, Maliszweski C.R. 1985, Sudan A. 1995). Die lösliche Variante von CD14 besteht aus einer einzelnen Kette. In dieser Kette sind Disulfid-Bindungsstellen eingebaut. Die Konzentration von sCD14 im Serum unter physiologischen Bedingungen beträgt bis zu 6µg ml^{-1}.

2.11 Regulierung der sCD14 Freisetzung

Lösliches CD14 wird, ähnlich der membrangebundenen Form (mCD14), durch Stimulation mit LPS oder Zytokinen, wie TNF, reguliert. Ebenfalls einen Effekt auf die Freisetzung haben IL4 und PGE_2 (Prostaglandin E_2). *In vitro* Daten an Mono Mac 6 Zellen führten zu einer verstärkten Freisetzung von sCD14 nach Zugabe von PGE_2 oder LPS. Eine ähnliche Wirkung wird auch *in vivo* erwartet. LPS und TNF-α erhöhen die Konzentration von sCD14, wohingegen IL4 und IFN-γ zu einer Verminderung der Konzentration in Gewebekulturen führt (Landmann R. 1992, Schütt C. 1992).
Die Gabe von Glukokortikoiden kann, sowohl *in vitro* als auch *in viv*o, zur Abregulation der Plasmakonzentration löslichen sCD14 (Nockher W., Scherberich J.E. 1997, 1999).

2.12 Funktionen von sCD14

Eine bekannte Funktion von sCD14 ist die Aktivierung CD14-negativer Zellen und Bindung von LPS im Blutstrom. sCD14 interagiert im zirkulierenden Blutstrom mit Endotoxin und moduliert erst durch diesen Komplex CD14-negative Zellen (Frey E.A. 1992, Read M.A. 1993, Von Asmouth EJU. 1993); andererseits scheint sCD14 an der Aktivierung von TLR´s (insbesondere TLR4), Nierenzellen und Uroepithelien (mucosaassoziierte Abwehrkaskade bei Harnwegsinfektionen) beteiligt zu sein (Scherberich JE. et al. 2008). „Aktivierung“ bedeutet u.a. eine erhöhte Permeabilität der Epithelzellschicht und eine vermehrte Freisetzung diverser Zytokine wie IL -1 und IL- 8 auf der Epithelzelloberfläche (Goldblum S.E. 1994).

2.13 LPB, Lipopolysaccharid bindendes Protein

Das Lipopolysaccharid-Bindende-Protein (LPB) ist ein 60 kDa Glykoprotein, das im Serum unter physiologischen Bedingungen in einer Konzentration zwischen 0,5-1µg ml^{-1} vorkommt. Es handelt sich um ein Akute-Phase-Protein und wird in der Leber synthetisiert. In Akute-Phase-Serum kann es sogar Konzentrationen über 200 µg ml^{-1} erreichen (Tobias S.P. 1992). Weitere Quellen für die LPB-Synthese wurden bis zum heutigen Zeitpunkt nicht nachgewiesen (Tobias S.P. 1989). Seine besondere Eigenschaft bezieht sich auf seine hohe Affinität gegenüber der hydrophoben Portion von LPS, dem Lipid A (Mathison J.C. 1992). Es besteht aus einer Polypeptidkette von 452 Aminosäuren und beinhaltet vier Cysteine und fünf potenzielle Glykolysierungsstellen. Das aminoterminale Ende des Proteins beinhaltet die eigentliche Bindungsstelle für LPS, während im Gegensatz das carboxyterminale Ende für die Interaktion mit dem CD14 Molekül verantwortlich ist (Schuhmann R.R. 1990). LBP vermittelt die Interaktion zwischen LPS und CD14 auf zwei

möglichen Wegen. LPB opsoniert LPS Strukturen, sodass diese von CD14 auch erkannt werden können. Im weiteren unterstützt LPB den Organismus in seiner Immunantwort, in dem es selbst kleinste Konzentrationen an LPS für diesen erkennbar macht (Wright S.D. 1990b, Schuhmann R.R. 1990). LPB erhöht die Sensibilisierung von Leukozyten gegenüber kleinsten, sogar im Nanogramm-Bereich, Mengen an LPS (Lee J.D. 1992).
Die Synthese von LPB in Hepatozyten wird durch LPS, IL-1, TNF- α, IL-6 und Glykokortikoiden reguliert. Die Behandlung der Hepatozyten mit LPS führt zur erhöhten Freisetzung von Zytokinen, die wiederum die Synthese von LBP beschleunigen (Wan Y. 1995). LBP alleine ist nicht in der Lage einen stabilen Komplex mit CD14 zu bilden. Eine weitere Eigenschaft von LBP ist seine Fähigkeit LPS an Lipide wie HDL-Komplexe zu transferieren, wo es neutralisiert wird (Wurfel M. 1994, Wurfel M. 1995).
Zusammengefasst besitzt LBP zwei wesentliche Eigenschaften:

1) Verstärkung der LPS Aktivität
2) Neutralisation von LPS

Bei gesunden Patienten ist LBP mit LDL/VLDL gebunden und zirkuliert als Komplex im Körper. Untersuchungen von Vreugdenhill et al. zwischen den Lipoproteinen LDL/VLDL und LPS wiesen auf eine verstärkte Affinität dieser Lipoproteine für LPS. Im Serum von Patienten mit einer Sepsis zirkuliert nur ein kleiner Anteil an LBP frei. Der größte Anteil an LBP ist mit LDL/VLDL gebunden. Es können sowohl LBP-LPS Komplexe als auch freie LBP und LPS Moleküle an den Lipoproteinen gebunden werden (Vreugdenhil A.C. 2001).

2.14 Weitere Erkennung und Transportproteine für LPS

Ein weiteres potenzielles LPS-Erkennungs- und Transportprotein für LPS im Serum könnte Septin sein. Untersuchungen durch direkte Blockierung von LPB mit LPB spezifischen Antikörper konnten keine vollständige Verhinderung der Bindung von Phagozyten an opsonierten LPS Molekülen bewirken (Wright S.D. 1992).
Alternative Rezeptoren für LPS können CD18 auf Leukozyten (Wright SD. 1990b), p73 ein 80 kDa Protein auf der Oberfläche von B und T Lymphozyten, PMN (polymorphonuclear leukocytes) und Makrophagen, p18, p25, p65 und p55 binden.

3. Grundlagen CD16

3.1 CD16, ein Fcγ Typ III Rezeptor

CD16 ist ein weiterer Differenzierungsmarker auf der Oberfläche von Monozyten. CD16 ist ein niedrig affiner Fc-Rezeptor Typ III, ein Rezeptor für Immunglobulin G (Van der Winkel J., 1991). Fc Rezeptoren sind Signal übermittelnde Moleküle für die Erkennung von Immunkomplexen. Es sind insgesamt drei (neu: vier) Klassen Fc Rezeptoren für Ig-G bekannt, FcγR I (CD64), FcγR II (CD32) und III (CD16) (Ravetch J.V. 1991). Fcγ Rezeptoren sind in der Lage unterschiedliche biochemische Prozesse auszulösen, darunter die Stimulation von Phospholipase C, die Modulation des intrazellulären Calciums und die Aktivierung der Proteinkinase C (Unkeless J.C. 1988, Ravetch J.V. 1989, Ravetch J.V. 1991). CD16 hat eine niedrige Affinität für monomeres Ig-G, ist aber in der Lage polymeres Ig-G oder auch Ig-G Komplexe mit einer hohen Affinität zu binden (Clarkson S.B. 1988). Der FcγR III (CD16) existiert in zwei Isoformen vor, FcγR IIIA und FcγR IIIB. Die FcγR IIIA Isoform des Rezeptors ist ein hetero-oligomerer Rezeptor mit einer zur Ligandenbindung bestimmten Untereinheit sowie dimeren γ Ketten. FcγR IIIA ist als Transmembranprotein auf der Oberfläche von NK Zellen und Makrophagen zu finden. Im Gegensatz dazu ist die zweite Isoform FcγR IIIB auf der Oberfläche von Granulozyten als GPI verankertes Protein zu finden (Ravetch J.V. 1989, Simmons D. 1988, Scallon B.J. 1988) und somit unfähig ein Signal von der Membranoberfläche in das Zellinnere zu übermitteln. Beide Isoformen haben einen ähnlichen extrazellulären Aufbau von ungefähr 190 Aminosäuren und besitzen identische Bindungsspezifizitäten (Ravetch J.V. 1989). Im Aufbau unterscheiden sich beide Isoformen des FcγR III Rezeptors an Position 203 ihres Aminosäureskelettes. Die transmembrane FcγR IIIA Isoform geht an der Oberfläche der Zellmembran, mit Untereinheiten weiterer Rezeptorsysteme, Assoziationen ein. Auf der Membranoberfläche von Makrophagen geht die FcγR IIIA Isoform des Rezeptors eine Assoziation mit der γ-Kette des IgE FcεR Rezeptors ein, und auf NK Zellen geht der FcγR IIIA Rezeptor eine Assoziation mit CD3 ein (Anderson P. 1990, Lanier L, Yu G. 1989). Ähnlich wie CD14 ist auch bei diesem Differenzierungsmarker eine lösliche Form von CD16 nachweisbar, die entweder durch Lösung aus der Membranoberfläche oder durch alternatives Splicen entsteht (Ravetch J.V. 1989, Huizinga T.W. 1990).

Interaktionen der Fcγ Rezeptoren mit Immunkomplexen führt zur Freisetzung diverser Mediatoren. Darunter gehören Leukotriene (Rouzer C.A. 1980), Prostaglandine (Rouzer C.A. , Kempe J.1980), hydrolytische Enzyme (Cardella C.J 1974) aber auch Zytokine wie IFN-γ, IL-1 und 6, sowie TNFα (Anegon I. 1988, Debets J.M.H. 1990). Weitere Funktionen, welche durch Fc- Rezeptoren reguliert werden können, sind Aktivierung und Proliferation von Lymphozyten (Klaus G. 1987).

3.2 Regulation der Fcγ Rezeptoren Expression

Die Regulation der Fcγ Rezeptoren erfolgt durch unterschiedliche Mediatoren wie Zytokine, Wachstumsfaktoren oder auch Lipoproteine, Hormonen und Glukokortikoiden. Unter der Gruppe der Zytokine sind IFN-γ, IL-4 und G-Csf (Granulocyte Colony Stimulating Factor) die wichtigsten Mediatoren, wobei ihr modulierender Effekt auf die verschiedenen Rezeptorisoformen sehr unterschiedlich sein kann. IL-4 hat eine hemmende Wirkung auf die Expression aller drei Isoformen, während INF-γ im Gegensatz eine Verstärkung der Expression des Fcγ RI bewirkt (Te Velde A.A. 1990, Hibbs M.L. 1989). TGFβ induziert eine Erhöhung der Fcγ RIIIa Rezeptorexpression auf Monozyten, wohingegen TNFα eine Verminderung der Fcγ RIIIb Oberflächenexpression bewirkt (Welch G.R. 1990). G-CSF reguliert die Fcγ RI Ausprägung auf Neutrophilen, aber nicht auf Monozyten (Guyre P.M. 1990). Durch weiterführende Untersuchungen lies sich ein Einfluss von LDL Lipoproteinen auf die Fcγ RI nachweisen. LDL kann sowohl die Expression als auch die Funktion des Rezeptors modulieren (Bigler R.D. 1990). Glukokortikoide hemmen die Wirkung des IFN-γ auf neutrophile Granulozyten, während sie im Gegensatz dazu die Wirkung von IFN-γ auf Monozyten verstärken (Passlick B. 1989). Direkten Einfluss, durch ihre hemmende Wirkung, können Glukokortikoide auf die Expression des Fcγ RIIIa auf Lymphozyten und Monozyten nehmen (Huizinga T.W.J et al., im Druck). Weitere Mediatoren, die modulierend auf die Fc- Rezeptorisoformen wirken können, sind Proteaseinhibitoren (Tax W.J.M. 1990), proteolytische Enzyme (Van der Winkel J.G. 1989) und Adenosin, das die Funktion des Fc-R, aber nicht dessen Expression beeinflusst (Salmon J.E. 1990).

3.3 Koexpression von CD14 und CD16 auf Monozyten

Monozyten leiten sich von den Monoblasten ab, die wiederum myeloiden Ursprungs sind. Aus der Population der Monozyten entwickeln sich, nachdem sie im Blut für zwei bis drei Tage zirkuliert haben, durch Diffusion in den unterschiedlichen Geweben die Makrophagen (Mazzarella G. 1998). Wichtigstes Antigen auf der Oberfläche der Monozyten ist der Differenzierungsmarker CD14, der spezifisch für die Aktivierung durch LPS mitverantwortlich ist. Der CD16 Differenzierungsmarker ist im Gegensatz zum CD14 ein Fcγ III Rezeptor, welcher spezifisch für IgG–Komplexe ist (s.o.). Dieser Unterschied in ihrer Spezifizität, lässt sich auch in ihrer Verteilung auf Monozyten und Makrophagen beobachten. Untersuchungen nach dem Prinzip der zwei Farben-Immunfluoreszenz mit monoklonalen Antikörper für CD14 und CD16 lassen mindestens zwei Subpopulationen an Monozyten erkennen (Ziegler Heitbrock 1994). Die eine Subpopulation an Monozyten ist stark CD14 positiv jedoch CD16 negativ, die zweite Subpopulation ist schwach CD14 positiv aber dafür CD 16 positiv (CD14+CD16+). Die CD14++ positiven Monozyten machen

ungefähr 90% aller Monozyten aus. CD 14++ Monozyten exprimieren von den Fcγ Rezeptoren den Fcγ I (CD64) und den Fcγ II (CD32) Rezeptor, dafür aber nicht den Fcγ III (CD16) Rezeptor (Nockher W.A., Scherberich J.E. 1998). Die CD14++CD16+ Monozyten machen dagegen nur 5-10 % der Gesamtmonozyten bei Gesunden aus, was einer Zellzahl von ungefähr 50/µl Vollblut entspricht (Ancuta P. 2000, Ziegler Heitbrock 1993, Ziegler Heitbrock 1996). CD14+CD16+ Zellen weisen auf ihrer Oberfläche eine Anzahl interessanter Oberflächenmoleküle und Muster auf. Im Vergleich zu CD14++ zeigen CD14++CD16+ Zellen auf ihrer Oberfläche eine geringere Expression von CD11b (CR3), CD33 und CD64 Molekülen. Dafür besitzen sie eine höhere Expression an MHC II Antigene (HLA-DR), VLA-4, intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1 (ICAM 1) (Ziegler Heitbrock 1996, Ziegler Heitbrock 1993), CD11a, CD18 und CD45RA (Gabriele H. 1994) sowie TRL2 und TLR4 (Scherberich et al. 2005).
Aufgrund der wichtigen Assoziation CD14+CD16+ Monozyten zu definierten Krankheitsbildern (wie auch hier bei Nierentransplantierten) wurde jüngst eine einvernehmliche internationale Nomenklatur erarbeitet, an deren Gestehung auch wir unmittelbar beteiligt waren (Heimbeck J. et al. 2010; Ziegler-Heitbrock L. et al. 2010).

3.4 Reifegrad der CD14++CD16+ Monozyten

Untersuchungen der CD14++CD16+ Subpopulation zeigen, im Vergleich zu den traditionellen CD14++CD16neg. exprimierenden Monozyten, eine andere Morphologie.
Sie sind kleiner, was im Punktdiagramm eine Vorwärts- und Seitwärtslichtstreuung zur Folge hat, sodass diese im Bereich zwischen Lymphozyten und der „Hauptmonozytenwolke“ (FACS Histogramm) liegen. Die CD14++CD16+ Monozyten können als „reife“ (mature) Monozyten betrachtet werden, die Eigenschaften von Gewebsmakrophagen aufweisen, ohne eine Epithelschranke überschritten zu haben. CD14++CD16+ Monozyten exprimieren auch den Differenzierungsmarker CD33 (Horelt Calzada-Wack 1996, Ziegler Heitbrock 1996,1993). Bekannt ist, dass Differenzierungsmarker spezifisch für eine Zellart oder deren Entwicklungsstufe sind (Leukocyte Typing VII, Oxford University Press). Der Differenzierungsmarker CD33 kommt während der Ausreifung myelomonozytischer Stammzellen vor, wobei die Expressionsdichte auf der Oberfläche progressiv abnimmt (Ziegler Heitbrock 1996).
Die Reifung der CD14++CD16+ Monozyten wird u.a. durch Zytokine reguliert. Verschiedene *in vitro* Studien wiesen nach, dass TGF-β (Transforming Growth Factor β), M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) oder auch Interleukin-10 an der Reifung dieser beteiligt waren. Zugabe von Zytokinen, wie IL- 4 und GM-CSF (Granulocyte-Makrophage CSF), modulierte ebenfalls die Expression. IFN-γ verstärkt *in vivo* den Effekt

von M-CSF und beteiligt sich ebenfalls an der Ausreifung CD14++CD16+ Monozyten. Da im Organismus immer eine Kombination verschiedener Zytokinen präsent ist, hängt die monozytäre Maturierung vom Gleichgewicht bzw. Ungleichgewicht pro- und anti-inflammatorischer Mediatoren ab (L. Ziegler-Heitbrock 1993, 1996).

3.5 Zellmigration durch die Epithelschranke

Besonderheit der CD14++CD16+ Zellen ist ihre Eigenschaft als reife Monozyten die Epithelschranke an Gefäßwänden zu passieren, um einen Entzündungsherd zu erreichen. Begünstigt wird dieser Prozess durch Ausprägung von CD11a und c, wie auch von VLA -4 (very late antigen) auf der Zelloberfläche. CD11a und c binden an ICAM-1 (intracellular adhesion molecule) während VLA-4 eine Affinität für VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule) aufweist (Ziegler Heitbrock 1996).

3.6 Funktionscharakteristika „nichttraditioneller“ CD 14++CD16+ Monozyten

Wichtigste Funktion CD14+ und CD16+ exprimierender Monozyten (gegenüber CD14++CD16neg.: sog.“nichttraditionelle CD14+ Monozyten) ist die Erkennung von LPS. CD14++CD16+ Monozyten sind in der Lage die Epithelschranke von Gefäßen zu passieren, um im Gewebe z.B. in Entzündungsherden zu akkumulieren. Darüber hinaus sind sie an der Produktion und Ausschüttung von Zytokinen, z.B. über die Stimulation mit LPS, beteiligt, darunter Zytokine wie IL-6 und IL-1 sowie TNF. Dagegen ist die Produktion des antiinflammatorischen Zytokines IL-10 gegenüber den CD14++ Monozyten mengenmäßig geringer oder gar nicht nachweisbar (Frankenberger M. et.al.1996). Weitere Funktionen im Gewebe sind derer von Makrophagen sehr ähnlich. Darunter fallen auch die Fähigkeiten der Phagozytose sowie die Produktion reaktiver Sauerstoffradikale. Scherberich et al. konnten in Untersuchungen für die CD14++CD16+ Subpopulation eine signifikant höhere Phagozytoseaktivität nachweisen (Scherberich J.E. 2001). Ebenfalls bestätigen konnte diese Feststellung Untersuchungen durch Rothe et al. (Rothe F.G. 1996).

3.7 M-DC8 positive Leukozyten als CD 14++CD 16+ Subpopulation

Eine Population M-DC 8 positiver Leukozyten wird als „neue“ Subpopulation dendritischer Zellen (DC) beschrieben. Besonderheit dieser M-DC8 positiver Zellen ist ihre

Expression von CD16 auf der Membranoberfläche. Daneben zeigen M-DC8 positive Zellen auch eine geringe CD14 Expression. FACS-Analyse dieser Zellen durch Siedlar et al. zeigte eine Expression von M-DC8 auf mehr als ein Drittel aller CD14++CD16+ Zellen. Umgekehrt konnte dieses Ergebnis auch auf die M-DC8 positiven Zellen beobachtet und übertragen werden. Dies lässt auf eine Assoziation zwischen M-DC8 und CD14+CD16+ schließen. Der Anteil der CD14++CD16+ Zellen ist etwa drei Mal höher als der Anteil M-DC8 exprimierender Zellen. Zusammengefasst definieren sich die M-DC8 positive Zellen als eine CD14++CD16+ Subpopulation (Siedlar M. 2001). Zu Nomenklatur von Monozyten und dendritischen Zellen siehe: Ziegler-Heitbrock et al. 2010.

3.8 CD14++CD16+ Monozyten bei nierenkranken Patienten

Patienten mit chronischem Nierenversagen, die auf eine Dialyse angewiesen sind, haben eine erhöhte Zellzahl von CD14++CD16+ Monozyten im Blut (Nockher und Scherberich J.E. 1997). Dies betrifft sowohl Patienten, die auf die Hämodialyse als auch auf die Peritonealdialyse angewiesen sind. Diese Patienten entwickeln Infektionen gegenüber eine verstärkte Anfälligkeit (Scherberich J.E. 2004). Die Funktion neutrophiler Granulozyten und der Monozyten ist im Vergleich zu Gesunden eingeschränkt. Das urämische Milieu dieser Patienten verschlechtert sowohl die humorale wie auch die zelluläre Immunität (S. Kato et al 2008; A.B. Hauser et al. 2007). Begünstigt wird die erhöhte Infektanfälligkeit auch durch den Kontakt von Blutbestandteilen mit der Dialysemembran. Es kommt zu einer verstärkten Aktivität der Monozyten und im weiteren Verlauf zu einer erhöhten Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1β, TNF oder IL-6 (Sainioji K. 2001). Diese Beobachtung der erhöhten Monozytenaktivität scheint mit einer ebenfalls erhöhten Konzentration an M-CSF einher zu gehen. Die Anzahl der CD 14++CD16+ Monozyten bei Hämodialysepatienten (HD) entspricht der Anzahl, die bei Patienten mit der Peritonealdialyse (CAPD) gefunden wurde. Auch konnten keine Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Verfahren der Hämodialysen nachgewiesen werden. Eine erhöhte M-CSF Konzentration konnte in beiden Kollektiven nachgewiesen werden. Daneben kommt es zu einer moderaten Erhöhung der IL-8 und GM-CSF Konzentrationen in beiden Gruppen (Saionji K. 2001).

Verantwortlich für die Immundefizienz von Hämodialysepatienten ist die Dysfunktion der Monozyten. Die Monozytose bei diesen Patienten resultiert aus einer Erhöhung der absoluten Zellzahl, welche im Mittel höher als normal liegt. Während der Hämodialyse kommt es zu einer Sequestration und „Deletion“ zirkulierender Monozyten. Verantwortlich für die selektive Sequestration der CD14++CD16+ Monozyten sind Prozesse, die während der Hämodialyse stattfinden. Während der Hämodialyse resultiert eine komplementäre

Aktivierung der Anaphylatoxine C3a und C5a (Deppisch R. 1990), wohingegen der direkte Kontakt der Zellen mit der Membran zu einer zellulären Aktivierung führt (Betz M. 1988). Daneben kann eine Kontamination des Dialysates mit bakteriellen Endotoxin, das durch die Membran in den Blutkreislauf gelangt, diesen Prozess begünstigen (Lonnemann G. 1992, Laude-Sharp 1990). Gemeinsames Merkmal dieser Prozesse sind vorübergehende Veränderungen der Adhäsionsmoleküle CD11a und CD11b auf der Zelloberfläche der zirkulierenden Zellen. Der Prozess der Sequestration ist jedoch nur temporär z.B. im Strombahngebiet der Lunge, sodass es am Ende der Dialyse wieder zu einer Erhöhung (Rezirkulation) der Monozytenanzahl kommt (Nockher W., Scherberich J.E. et. al 2001). Sester et. al konnten in ihren Untersuchungen diese Ergebnisse bestätigen. Auch hier kam es, unter Verwendung einer Cellulose-Membran für die Hämodialyse zu einer temporären Leukopenie. Die Zahl der CD14++CD16+ Monozyten erreichte erst nach sechs Stunden ihren Ausgangswert. Der Prozess der Sequestration beruht wahrscheinlich ebenfalls auf eine veränderte Expression der MHC-Molekülen (Nockher W. et al.1998, Sester U. 2001, Scherberich J.E. 2003).

3.9 CD14++CD16+ als Marker bei chronischen und akuten Infektionen Hämodialysepatienten (HD)

Die CD14++CD16+ Monozyten stellen mit 5-10% bei Gesunden nur einen Anteil der Monozyten an der Gesamtpopulation dar (Passlick B. 1989, Ziegler Heitbrock 1996). Untersuchungen von Scherberich et al. belegten für diese Monozytenuntergruppe eine wichtige Funktion. HD Patienten mit einer rekurrierenden Infektion hatten über die bei Urämie typisch nachweisbare erhöhte Zahl CD14++CD16+ Monozyten wesentlich höhere Anzahl dieser proinflammatorischen Zellen. Dagegen war die Anzahl traditioneller CD14++. Zellen in beiden Gruppen unverändert. Dies lässt auf eine Verschiebung der Leukozytenzahl in Richtung der CD14++CD16+ Monozytenpopulation schließen. Somit liefert diese Subpopulation eine wichtige Indikatorfunktion bei chronischen Infektionen und kann als ein Marker für chronische Infektionen herangezogen werden (Nockher W. 1998, Scherberich J.E. 2003).

Ähnlich verhält es sich während einer akuten Infektion bei Patienten, die sich einer Hämodialyse unterziehen. Auch hier kommt es zu einer Erhöhung der CD14++CD16+ Monozytensubpopulation, wohingegen die Veränderung der CD14 Expression auf den Zellen als zum Teil erheblich variabel darstellte (Nockher W.A., Scherberich J.E. 1998).

3.10 HLA-DR Antigen Expression auf der Oberfläche CD14++CD16+ Zellen

Vergleiche der HLA-Antigene auf der Oberfläche zwischen den verschiedenen Monozytenpopulationen lassen Unterschiede bezüglich ihrer Expressionen erkennen. Die statistisch signifikantesten Unterschiede betreffen die Expression der MHC-Klasse II Antigene (HLA-DR, -DP, -DQ). Dagegen zeigen sich keine Unterschiede, was die MHC Klasse I Antigene betrifft (HLA-A, -B, -C). HLA-DR sowie HLA-DP Antigene waren im Vergleich zur CD14++ Population um den Faktor drei bis vier erhöht (Nockher W.A., Scherberich J.E. 1998).

4. Toll Like Rezeptoren

4.1 Grundlagen

Toll-Like-Rezeptoren (TLR) sind Typ I transmembranale Proteine, die unter anderem an der Aktivierung des Immunsystems beteiligt sind. TLR´s sind nicht nur auf immun- kompetenten hämatopoetischen Zellen wie Makrophagen und Lymphozyten exprimiert, sondern auch auf Epithelzellen verschiedener Organe. Sie reagieren auf eine Vielzahl pathogener Erreger und initiieren eine immunologische Reaktion durch die Erkennung pathogener Muster (PAMP´s, „pathogen associated molecular patterns“) auf deren Oberfläche. Bekannteste Vertreter der pathogen assoziierten molekularen Muster (PAMP´s) sind Lipopolysaccharide (LPS) als wichtigster Bestandteil gramnegativer Bakterien, bzw. Lipoteichonsäure (LTA) und Peptidoglykan (PGN) als Bestandteile grampositiver Bakterien (Medzhitov R. 1997). Bis zum heutigen Zeitpunkt sind zwölf TLR-Rezeptoren TLR1-TLR12 dokumentiert worden (Tsan M.F. 2004). TLR´s können aufgrund des Aufbaus ihrer Aminosäuresequenz und ihres genetischen Phänotypus in Haupt-und Untergruppen werden. TLR Hauptgruppen sind TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 und TLR9. Die TLR2 Untergruppe besteht aus TLR1, TLR6 sowie TLR10. TLR1 und TLR6 sind in der Lage mit TLR2 sog. Heterodimere zu bilden. Die TLR9 Untergruppe dagegen besteht aus TLR7 und TLR8 (Tsan M.F. 2004, Takeda K. 2003). TLR´s interagieren ebenfalls mit einer Vielzahl endogener Liganden (z.B. Matrixkomponenten, Hitzeschockproteine, Zellabbauprodukte) und kontrollieren somit die Strukturintegrität von Geweben und Zellprozessen. Unter den wichtigsten Krankheiten, die unter anderem auch durch TLR´s beeinflusst werden, gehören Asthma, das akute respiratorische Distress- Syndrom, kardiale Ischämie, ventrikuläres Remodelling, arterielle Koronarerkrankungen, akute tubuläre Nekrosen (insbesondere Ischämie- Reperfusionsschäden), Psoriasis, rheumatoide Erkrankungen inkl. einige Kollagenose wie systemischer Lupus Erythematodes, Sarkoidose, Fertilität und Transplantatabstoßungen (Christofaro P. 2006).

Toll-Like-Rezeptoren waren ursprünglich als Teil der Organogenese in Embryos der Fruchtfliege entdeckt worden, aber auch als Teil des Immunsystems von Larven und erwachsenen Fliegen in der Abwehr gegenüber mikrobiellen Infektionen. In Säugetieren beteiligen sich TLR´s an der relativ restriktiven, jedoch schnell agierenden Immunantwort auf bakterielle Expositionen hin. Sie lösen eine Signalübertragungskaskade innerhalb der Zelle aus („intracelluläres Signalling“), und setzen eine Vielzahl proinflammatorischer Zytokinen, wie z.B. Interleukine (IL1ß, TNFalapha, IL6) oder auch immunregulierendes TypI-Interferon (IFN-alpha, IFN-beta) frei. Die Freisetzung dieser Zytokine ist für die Immunantwort des Wirtes von ausschlaggebender Bedeutung, da dadurch die „Erregerclearance“ gefördert wird (Phagozytenrekrutierung, erhöhte Phagozytoseaktivität). Andererseits jedoch kann eine unkontrollierte exzessive Reaktion, die in eine

Hyperinflammation mündet zum septischen Schock des Wirtorganismus führen (Ulevitch R.J. 1995).

4.2 TLR Liganden

TLR´s als membranständige Mediatoren an der Oberfläche von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen, aber auch endosomal (intrazellulär), besitzen die Eigenschaft sowohl Lipoproteine als auch Lipopolysaccharide ssRNA, dsRNA, dsDNA, ssDNa u.a. als mögliche Liganden zu erkennen und diese zu binden. LPS als Bestandteil der äußeren Zellwand gramnegativer Bakterien aktiviert als Ligand TLR2 und insbesondere TLR4 (über den MD2-CD14 Komplex), wobei sich LPS an eine elektrostatisch ausgewiesene Kavitation des Adaptormoleküls MD2 anlegt. TLR1 (als Heterodimer mit TLR 2) besitzt eine Affinität für triacylierte Lipopeptide (Takeuchi O. 2002). Peptidoglykan (PGA) und Lipoteichonsäure (LTA) als Bestandteile der Zellwand grampositiver Bakterien sind ebenfalls potente Liganden für TLR2. Doppelsträngige RNA (dsRNA) ist ein Ligand für TLR3 (Alexopoulou L. 2001), während TLR5 bakterielles Flaggelin als Liganden erkennt (Hayashi F. 2001). TLR6 als Dimer mit TLR2 seinerseits kann diacylierte Lipopeptide erkennen (Takeuchi O. 2001), und TLR7 hat die Eigenschaft Einzelstrang-RNA (ssRNA) als solche zu erkennen (Ling J.M. 2004) sowie weitere Nukleinsäuresequenzen, wie Imidazoquinoline (Hemmi H. 2002). TLR9 als Membranrezeptor ist spezifisch für die Erkennung nicht-methylierter CpG DNA (Hemmi H. 2003). Bis heute wurde noch kein Ligand für TLR 10 entdeckt und beschrieben (Tsan M.F. 2004). Im Humansystem sind bisher etwa 13 TLR (von insgesamt 15) bekannt geworden.

4.3 Aufbau der TLR-Rezeptoren

Alle Rezeptoren der Toll Gruppe sind Typ I Rezeptoren, und verfügen über eine externe und integrale zytoplasmatische Domäne. Gemeinsames Merkmal ist ihre Ähnlichkeit in der Ausprägung sowohl der extrazellulären als auch intrazellulären Domänen: Die extrazelluläre Domäne besteht aus 18-31 Leucinreiche Sequenzwiederholungen (LRR, Leucine Rich Repeats) sowie cysteinreiche Sequenzen, die mit 550-980 Aminosäuren sehr lang sind (Schneider D. 1991, Pantoja M. 1997). Am N-terminalen Ende der extrazellulären Domäne befindet sich eine 31 Aminosäure lange Sequenz, die in diversen LRR Membranproteinen wie RP105, Decorin und Biglycan vorkommt (Medzhitov R. 1997). Am C-terminalen Ende der LRR-Sequenz ist eine Cysteinreiche Domäne integriert. Es wird angenommen, dass diese extrazelluläre Sequenz zahlreiche Ligandenbindungsstellen beinhaltet. Der zytoplasmatische Anteil des Rezeptors besteht aus etwa 200 Aminosäuren und ähnelt in seinem Aufbau dem zytoplasmatischen

Anteil des IL-1 Rezeptors (TIR, Toll/IL-1 receptor homologous region) (Schneider D. 1991, Pantoja M. 1997). Toll-Like Rezeptoren in Säugetieren unterscheiden sich in ihrem extrazellulären Aufbau und bieten dadurch unterschiedliche, allerdings restriktive Bindungsstellen für unterschiedliche Liganden, wie oben erwähnt. TLR2 und TLR4 ähneln sich in 24 % ihres extrazellulären Aufbaus (Anderson K.V. 2000).

4.4 Aktivierung von Toll-Like Rezeptoren

Biochemische und genetische Untersuchungen an Zellen konnten einen komplexen Mechanismus, der im Inneren der Zelle nach Aktivierung von TLR stattfindet, aufdecken. Ziel dieses Mechanismus ist die Initiierung von Transkriptionsfaktoren (NF-kB) und Kinasen, welche ihrerseits zu einer Expression genetischer Phänotypen im Zellinneren führen, und zur Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen beitragen (Anderson K.V. 2000, Williams M.J. 1997). Unabhängig der Divergenz der verschieden Oberflächenmuster (PAMP`s), welche zur Zellaktivierung beitragen, die im inneren der Zelle ablaufende Prozesse ähneln sich bei allen bekannten TLR´s, mit wenigen Ausnahmen (z.B. TLR3; Tsan M.F. 2004). TLR3 hat die Eigenschaft, sein Signal unabhängig des zytoplasmatischen Adaptormoleküls MyD88, weiter bis zum NF-kB Faktor zu leiten (Alexopoulou L. 2001). Die intrazelluläre Signaltransduktion und die Initiierung der NF-kB Proteine wird, nach aktuellen Erkenntnissen, durch drei Proteinkomplexe vermittelt: Der Erste direkt am zytoplasmatischen Anteil des Rezeptors, ein zweiter Komplex für die Phosphorylierung des Inhibitors IkB und ein dritter Komplex für die Degradierung von IkB (Abb. 3) (Anderson K.V. 2000).

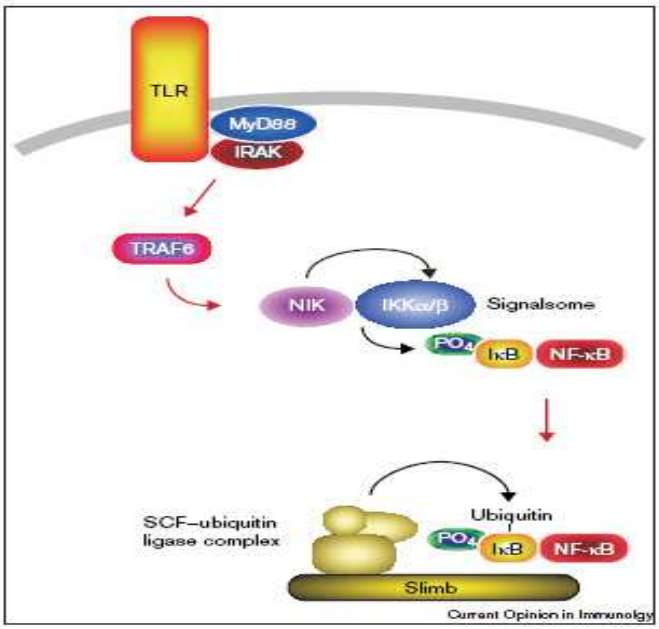


Abbildung 3: Anderson K.V., Current Opinion Immunology 2000; 12: 13-19

Der erste Proteinkomplex, am zytoplasmatischen Anteil des Rezeptors, besteht hauptsächlich aus zwei Proteinen, MyD88 (myeloider Differenzierungsfaktor) und einer Kinase aus der Gruppe der SIIK-Kinasen (Serin-Threonin innate immunity kinase) IRAK (IL-1 receptor asociated kinase) (Williams M.J. 1997, Zhang Y. 1993). Nach erfolgter Stimulation der TLR an der Membranoberfläche wird MyD88 im Zellinneren durch Interaktion mit der TIR Homologen Region rekrutiert. Der zweite Proteinkomplex wird durch einen TRAF 6 Faktor (TNF-receptor associated factor 6) aktiviert, und besteht aus einen Kinasekomplex. Dieser Kinasekomplex wird wiederum durch NIK (NF-kB-inducing kinase) und den IKK-Komplex (IkB Kinase), mit den IkB Kinaseuntereinheiten IkBα/β und γ, gebildet (Cohen L. 1998). Der Komplex phosphoryliert IkB und führt dadurch zum dritten Teil der Signaltransduktion, in dem βTrCp als Substraterkennungseinheit aktiviert wird (Spencer E. 1999). Ein MyD88 unabhängiger Signalweg generiert in erster Linie eine antiviral geprägte Immunantwort über die Synthese von Typ-I-Interferon (Einzelheiten vergl. Abb.3).

4.5 LPS, Bestandteil gramnegativer Bakterienzellen

LPS ist ein komplexes Lipopolysaccharid und besteht aus einen hydrophoben (Lipid A) und einen hydrophilen Anteil (Polysaccharid und O-Antigene Strukturen). Lipid A bildet den Hauptteil des Moleküls während zwischen den O-antigenen Strukturen unterschiede im Aufbau erkennbar sind. Der Lipid A Anteil ist maßgeblich an der Stimulation der TLR 4 Rezeptoren beteiligt, während der hydrophile Anteil für die Aktivierung der TLR 2 Rezeptoren mitverantwortlich ist. Diese Eigenschaft von LPS ist für die verschiedenartige Stimulation von LPS, unterschiedlicher Herkunft, verantwortlich. Sowohl der TLR 2 als auch der TLR 4-MD-2 Komplex zeigen eine Affinität zum Lipid A. Daraus lässt sich ableiten, dass die Unterschiede in der Erkennung und dem Ausmaß der Aktivierung von LPS spezifischen Oberflächenrezeptoren, abhängig der Herkunft des LPS Ligand sein kann. Die Selektivität der LPS-Liganden gegenüber TLR 2 ist zusätzlich vom hydrophilen Aufbau dieser abhängig (Shimazu R. 1999).

4.6 TLR induzierte Abwehrmechanismen

TLR Rezeptoren regulieren die Biosynthese wichtiger Entzündungsmediatoren wie z.B. IL-1, IL-6, IL-12 und TNFα, und die Regulation weiterer Abwehrmechanismen wie z.B. die Produktion von iNOS mRNA (Inductible nitric oxid synthase) und Stickstoffmonoxid (NO) (Campos M.A. 2001, Moors M.A. 2001, Brightbill 1999, Byrd-Leifer C.A. 2001). Jedoch ist bekannt, dass die Produktion von iNOS nicht nur TLR abhängig ist, sondern auch über weitere Mechanismen ebenfalls aktiviert werden kann (Means T.K. 2001). Bakterien sind in der Lage, die Produktion von iNOS (Inductible nitric oxid synthase) über Mechanismen, welche unabhängig des TLR Rezeptorsystems sind, einzuleiten (Strominger

J.L. 2001). Dies legt die Vermutung nahe, dass TLR Rezeptoren mit weiteren Rezeptortypen bei der Aktivierung von Abwehrmechanismen zusammenarbeiten. LPS kann unter anderem die Aktivität der Phagozyten-Oxidase in Makrophagen, durch Stimulation anderer Rezeptoren einleiten. Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die TLR-Rezeptoren durch unterschiedliche immunologische Stimuli in der Lage sind, eine auf diese Stimuli differenzierte und abgestimmte Abwehrreaktion zu koordinieren (Underhill D.M. 2002). Dies konnte Jones et al. in seinen Untersuchungen eindrucksvoll belegen (Jones B.W. 2001). LPS, welches von P. gingivalis stammte, war nicht in der Lage in Makrophagen eine Sekretion von Zytokinen und Chemokinen auszulösen, im Gegensatz zu LPS aus E. Coli. Ähnliche Ergebnisse zeigte die Aktivierung durch die TLR2 und TLR4 Agonisten Lipoarabinomannan und Phosphatidylinositol Di-Mannosid. Beide Agonisten waren in der Lage die Sekretion von TNFα zu regulieren, während der Gabe von LPS als Agonist, zur Sekretion von IL-1β führte (Pullendran B. 2001). Dadurch ist es möglich, spezifische Mediatoren der Zellaktivierung (Zytokine und Chemokine) den unterschiedlichen TLR-Rezeptoren zuzuordnen. TLR4 spezifische Abwehrreaktionen lösen die Produktion und Ausschüttung von IP-10, IFN-γ und IL 12-p70 aus. IL-12p70 und IP-10 ist seinerseits an der Reifung der Th1 Zellen beteiligt (Strominger J.L. 2001). IP-10 ist ein chemotaktischer Faktor aus Makrophagen und NK Zellen (neutrophile Killerzellen), der in der Lage ist insbesondere Th1 Zellen zu steuern (Bonechi R. 1998). IL-12, mit seinen Untereinheiten p35 und p40, gehört zu den Hauptzytokinen, die ebenfalls an der Proliferation von Th1 Zellen beteiligt sind. Die IL-12-p40 Untereinheit ist als limitierender Faktor bei der IL-12p70 Produktion bekannt, während sein Homodimer als Antagonist des IL-12 Rezeptors wirken kann (Strominger J.L. 2001). Dieses Homodimer der IL-12p40 Untereinheit ist insofern wichtig bei der Reifung der Th Zellen, da es zur Proliferation der Th2 Zellen führt. Dies ist bei der Aktivierung von TLR2 zu beobachten. TLR2 spezifische Reaktionen führen zur Sekretion von IL-8, IL-12 p40 Homodimer (einer hemmenden Form von IL-12, das an der Reifung der Th2-Zellen beteiligt ist) und p19/IL-23. Eine Eigenschaft der TLR-Rezeptoren ist die Bildung von Homodimeren auf ihrer zytoplasmatischen Seite. Die Homodimerisierung von intrazellulären TLR4 Domänen in Makrophagen vermag die Produktion und Ausschüttung von TNFα zu induzieren. TLR4 dimerisiert nicht mit anderen zytoplasmatischen Domänen, was auf eine Divergenz im intrazellulären Aufbau schließen lässt (Strominger J.L. 2001).

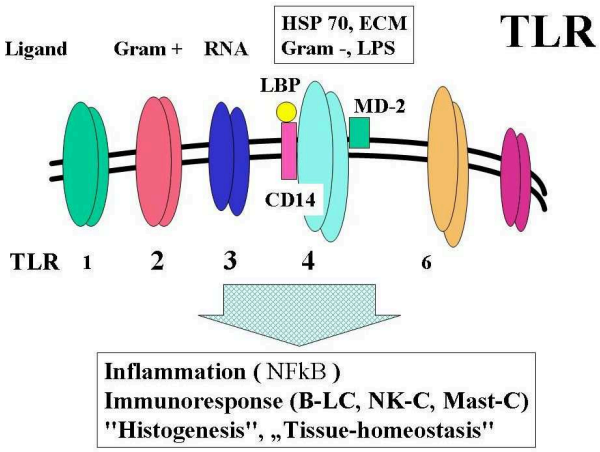


Abbildung 4: TLR Liganden (Abb. Prof. J.E. Scherberich)

4.7 Endogener Ligand für TRL´s, MyD88

MyD88 ist ein 35kD großes Adaptor-Protein, das drei funktionelle Sequenzen besitzt, eine aminoterminale Sequenz (sog. „death domain“, eine Domäne, die zu einer kontrollierten Apoptose der Zellen führt) die 150 Aminosäuren lang ist, eine intermediäre Domäne und eine carboxyterminale Sequenz TIR (Lord K.A. 1990, Hultmark D. 1994), die 152-296 Aminosäuren lang ist (Wesche H. 1997). Medzhitov et al. konnten in Ihrer Studie zeigen, dass eine Überexpression von MyD88 als gesamtes Protein, sowie die Expression einer genetischen Mutation des Proteins in der nur die aminoterminale Sequenz und die intermediäre Sequenz exprimiert wurden, zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kB führten. Die Ausprägung nur der carboxyterminalen Sequenz hemmt den nukleären Transkriptionsfaktor NF-kB, sowohl bei der Aktivierung des IL-1 als auch des TLR4 Rezeptors (Medzhitov R. 1998, Wesche H. 1997). Immunologische Untersuchungen konnten das carboxyterminale Ende (TIR) des Proteins MyD88 als die eigentliche Verbindungsstelle zwischen Protein und Rezeptor ausmachen. Somit vermittelt dieses carboxyterminale Ende die intrazellulären homophilischen Interaktionen mit anderen TIR Domänen (Kopp E.B. 1999). Die aminoterminale Domäne ist die Verbindungsstelle zwischen dem Rezeptorkomplex und der IRAK Kinase, die im weiteren Verlauf phosphoryliert (Medzhitov R. 1998). MyD88 besitzt als ein Adaptor-Protein die Fähigkeit zwischen, verschiedenen Proteinen und Rezeptoren zu vermitteln (Kopp E.B. 1999). So kommt MyD88 ebenfalls bei der Aktivierung von IGIF (Interferon-γ induzierender Faktor) vor. IGIF kann seinerseits ebenfalls NF-kB, über die IRAK Kinase in Th1 Zellen, induzieren. Während die carboxyterminale Sequenz am Rezeptorkomplex ansetzt, bindet auf seiner aminoterminalen Domäne die zu aktivierende Kinase an. Die Serin-Threonin homologe Kinase, IRAK, setzt ebenfalls mit ihrer aminoterminale Sequenz („death domain“) am Adaptor-Protein an (Muzio M. 1998). Die Expression und „Sequestrierung“ von MyD88 wird intrazellulär von Zytokinen, wie IL-6, gesteuert und reguliert (Medzhitov R. 1998).

4.8 TIRAP, ein weiteres intrazelluläres Adaptor-Protein

Ein in der Funktion MyD88 ähnliches Protein ist TIRAP (MyD88 Adaptor Like Protein, Mal). Es handelt sich auch hier um ein intrazelluläres Adaptor-Protein, das in seinem Aufbau MyD88 gleicht. Es besitzt eine „TIR-Domäne“, mit der es intrazellulär am TLR-Rezeptor binden kann. TIRAP wird mit den TLR1/2, TLR2/6 und TLR4 in Verbindung gebracht und mit keinen weiteren TLR Rezeptor (Yamamoto M. 2002, Horng T. 2002).

4.9 Serin-Threonin-Kinase „IRAK“

Die Serin-Threonin Kinase IRAK, gehört zur Gruppe der SIIK-Kinasen (serin-threonin innate immunity kinases), die sowohl in Pflanzen, in Wirbeltieren als auch in wirbellosen Tieren zur Aktivierung des Immunsystems führen (Hammond-Kosack K.E. 1996, Belvin M.P. 1996). Die IRAK Kinase besitzt die Eigenschaft der Autophosphorylierung. Nur die phosphoryrilierte Form der Kinase ist in der Lage mit MyD88 zu interagieren (Wesche H. 1997). Diese Eigenschaft lässt die Schlussfolgerung zu, dass die nicht phosphorylierte Form der Kinase am Komplex von MyD88 rekrutiert wird, und erst durch Bildung des Rezeptorkomplexes diese durch Autophosphorylierung aktiviert wird. Nach der Phosphorylierung interagiert IRAK mit einen weiteren Adaptor, TRAF 6, aus der Gruppe der TNF-assoziierten Faktoren (TNFR associated factor) (Munzio M. 1997). Die Interaktion zwischen IRAK und TRAF 6 findet nicht direkt am Rezeptorkomplex, sondern im Zytoplasma erst nach der Phosphorylierung von IRAK (Wesche H. 1997).

4.10 TRAF 6 (TNFR-associated factor 6)

Die Proteine der TNFR-Familie sind bekannt, unterschiedliche physiologische Mechanismen kontrollieren und regulieren zu können, wie Zellapoptosis, die Genese der Osteoklasten sowie immunologische Reaktionen. Eine Vielzahl an Oberflächenrezeptoren benutzen die TRAF Proteine für ihre Signaltransduktion, darunter CD40, IL-Rezeptoren und TLR Rezeptoren. Gemeinsame Eigenschaft dieser Signalübermittlungen ist, dass sie zur Exprimierung der Transkriptionsfaktoren NF-kB und API führen. Ein weiteres gemein- sames Merkmal ist, dass alle Proteine mit Ausnahme von TRAF, 1 durch einen ähnlichen Aufbau charakterisiert werden, eine carboxyterminale Sequenz, eine spiralförmige TRAF-N Domäne und eine ringförmige aminoterminale Domäne (Lomaga M.A. 1999). Die carboxy- terminale Sequenz, welche als TRAF Domäne bekannt ist, reguliert sowohl die Oligo- merisierung des Proteins als auch die Interaktionen mit weiteren Signalproteinen. Das aminoterminale Ende dient bei der Signalübermittlung, es konnten jedoch keine Proteine aufgedeckt werden die mit dieser Sequenz interagieren.

TRAF 6 ist bei der Signalweiterleitung über verschiedene Rezeptoren beteiligt, IL-1, TLR`s, CD40. TRAF 6 führt bei Aktivierung dieser Rezeptoren zur Aktivierung der Transkriptions- faktoren NF-kB und API (Medzhitov R. 1998, Muzio M. 1998, Ishida T. 1996). Immunologische Studien zeigten in diesem Zusammenhang, dass TRAF 6 im weiteren Verlauf mit den sogenannten MAP3K Kinasen

(mitogen activated protein kinase) präzipitiert. Zur Gruppe der MAP3K gehört die NF-kB induzierende Kinase (NIK) (Song H.Y. 1997, Malinin N.L. 1997). Die NIK Kinase aktiviert ihrerseits die IkB Kinasen (IKK´s), welche essenziell für die weitere Phosphorylierung und Degradierung des NF-kB Inhibitors IkB sind (Nakano H. 1998, Ling L. 1998). Die Degradierung der IkB Kinase setzt den Transkriptionsfaktor NF-kB frei, welcher wiederum im Nukleolus zur entsprechenden Genexpression führt (Nakano H. 1998).

4.11 IKK´s

Die IkB Kinasen, IKK-α und IKK-β, bilden lange Komplexe zusammen mit weiteren Proteinen. Die IKK´s haben eine ähnliche Domainstruktur, sind ungefähr 750 Aminosäure lang und besitzen drei funktionelle Bereiche. Diese bestehen aus einer aminoterminalen Kinasedomäne, einer leucinreichen Domäne und einer Carboxy-terminalen Domäne in Form einer Helixschleife. IKK-α weist im Vergleich zur IKK-β Kinase eine geringere Aktivität, selbst bei Überexpression dieser, auf. Die Aktivierung der IKK´s erfolgt durch eine Phosphorylierung statt. Nach der Aktivierung kommt es zu einer Phosphorylierung zweier Serin Aminosäuren auf dem IkB Inhibitor, was eine Degradierung des Proteins zur Folge hat (Zandi E. 1997, Woronicz J.D. 1997, Mercurio F. 1997, Di Donato J.A. 1997). Die Regulierung und Koordinierung der IKK´s erfolgt durch Unterstützung zweier Proteine NEMO und IKAP (NF-kB essential modulator, IKK complex asociated protein) (Yamaoka S. 1998, Cohen L. 1998).

4.12 TLR2 Rezeptoren

Toll-Like Rezeptoren können sowohl durch Komponenten der äußeren Membran gramnegativer als auch durch grampositive Bakterien aktiviert werden (Sen J. 1998, Levashina E.A. 1999). Wichtigstes biologisches Element der äußeren Membran gramnegativer Bakterien ist LPS, während im Gegensatz dazu die wichtigsten biologischen Bestandteile auf grampositive Bakterien PGA (Peptidoglykan) und LTA (Lipoteichonsäure) sind (Schwandner R. 1999). Isoliertes LPS, PGA und LTA sind in der Lage eine Vielzahl klinischer Manifestationen einer bakteriellen Infektion auszulösen (Gupta D. 1996). TLR2 Rezeptoren sind an der Signalübertragung durch gramnegative als auch grampositive Bakterien beteiligt. Sowohl LPS als auch PGA und LTA können eine Signalkette an TLR2 Rezeptoren auslösen. Ähnlich wie LPS binden PGA und LTA an den CD14 Rezeptoren der äußeren Plasmamembran, um ein Signal durch den Rezeptorkomplex einzuleiten (Schwandner R. 1999). Genetische Untersuchungen an menschlichen embryonalen 293 Nierenzellen (HEK293 Zellen) durch Kirschning et al. und Yang et al. zeigten, dass eine Überexpression transferierter TLR2 Rezeptoren in direkter Abhängigkeit zur LPS-Konzentration eine entsprechende Signalübertragung aufzeigen (Kirschning C.J. 1998,

Yang R.B. 1999). Yang RB et al. transferierten TLR 2 cDNA in die Zellen, welche dadurch die Möglichkeiten entwickelten auf LPS und LPB (LPS binding protein) zu reagieren. Die so ausgelösten intrazellulären Mechanismen wurden durch die Ko-Transferierung eines weiteren Membranproteins CD14 verstärkt. Dazu kommt, dass die LPS Signalweiterleitung am Rezeptor, in Gegensatz zu PGA und LTA, serumabhängig ist, da das Serum als Quelle von LPB (LPS-binding protein) und löslichen CD14 (sCD14) dient (Schwandner R. 1999).
HEK293 Zellen exprimieren an ihrer Oberfläche TLR 2 Rezeptoren aber keine TLR1 und TLR4 Rezeptoren. Kirschning et al. kam in seiner Studie zum Ergebnis, dass unter anderem die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kB durch LPS abhängig von der TRL2 Expression an der Oberfläche der HEK293 Zellen war (Kirschning C.J. 1998). In der gleichen Studie wurde auch der Zusammenhang zwischen PGA / LTA grampositiver Bakterien und TLR2 gezeigt. PGA (Peptidoglykan) ist, im Gegensatz zu LTA, (Lipoteichonsäure) nicht selber der Lage eine Signaltransduktion auszulösen. Erst in Zusammenhang mit CD14 war es möglich einen Signalkomplex an den Zellen zu bilden, der im weiteren Verlauf zu einer Induktion eines Signals durch die Membran führte (Schwandner R. 1999). Koexpression von TLR 2 und CD14 führt bei niedrigen Konzentrationen von PGA zu einer signifikant höheren Signalübertragung. Dagegen zeigte die CD 14 Koexpression keine signifikant erhöhte Signalübertragung im Zusammenhang mit LTA. Zelluläre Aktivierung durch PGA scheint, genau wie LPS, CD14 abhängig zu sein, während die LTA-Aktivierung wahrscheinlich CD14 unabhängig ist (Schwandner R. 1999). Anderseits konnte in früheren genetischen Untersuchungen ein Zusammenhang zwischen LTA, als auslösende Komponente grampositiver Bakterien, und CD 14 gestellt werden (Gupta D. 1996, Cleveland M.G.1996, Hattor Y. 1997). Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen ist wahrscheinlich Folge eines Mangels des CD14 Komplexes, welcher in HEK293 Zellen transferiert wurde (Schwandner R. 1999).
Genetische Untersuchungen an CHO Fibroblasten (Chinese hamster ovary fibroblasts) welche auf ihrer Oberfläche zwar TLR 4 aber keine TLR2 Rezeptoren exprimieren (Yang R. 1998), wiesen ebenfalls einen Zusammenhang zwischen TLR2 / CD14 und grampositiven Bakterien auf (Yoshimura A. 1999).

4.13 TLR 2 induzierte Abwehrmechanismen

TLR2 spezifische Reaktionen führen zur Sekretion von IL-8, IL-12 p40 Homodimer (einer inhibierten Form von IL-12 welches an der Reifung der Th2-Zellen beteiligt ist) und p19/IL-23 (Re F. 2001). TLR 2 führt, über den Weg des Transkriptionsfaktors NF-kB überwiegend in dendritischen Zellen, zur Transkription des p19 Gen. P19 ist ein Protein welches ein Dimer mit p40 bildet. Es erschafft somit seinerseits ein weiteres Zytokin, IL-23,

welches in seinen Eigenschaften ähnlich dem IL-12 ist. Obwohl die biochemischen Eigenschaften von IL-23 noch nicht ausreichend bekannt sind (induziert kein INF-γ in reifen T-Zellen), kann mit IL-23 eine fehlende IL-12 Produktion TLR2 stimulierter dendritischer Zellen kompensiert werden (Re F. 2001).

4.14 TLR 4 Rezeptor

Invasive Infektionen mit gramnegativen Bakterien werden überwiegend durch LPS vermittelt. TLR4 Rezeptoren sind hauptsächlich an der LPS induzierten Übermittlung des Signals in Abwehrzellen (Makrophagen, PMN, NK) beteiligt. TLR4 assoziiert physisch mit einen extrazellulären Komplex, bestehend aus CD14 und dem extrazellulären akzessorischen Protein MD-2 (Underhill D.M. 2002). Jede dieser Komponenten ist für die erfolgreiche Signalübertragung von Bedeutung. Da Silva et al. konnte in seinen Untersuchungen durch Konjugation von LPS an einen photoaktiven Verbinder (Linker), den räumlichen Zusammenhang zwischen TLR4 -MD-2- CD14 und LPS ausmachen (Da Silva C. 2001). In diesem Rezeptorkomplex liefert CD14 das LPS-Molekül an den TLR4-MD 2 Komplex ab, und bindet es an diesen. Biochemische Untersuchungen konnten eine ähnliche Affinität zwischen CD14 und MD-2 zu LPS aufweisen (Viriyakosol S. 2001). Einen ähnlichen Komplex wie CD14 und MD-2 sind weitere Akzessorproteine ebenfalls in der Lage mit den TLR 4 Rezeptoren einzugehen. Es ist bekannt, dass CD-11b und CD18 (bekannt auch als Mac-1 und CR-3) als Ligand für LPS und Taxol fungieren. Dies konnte in immunologische Untersuchungen an Mäusen beobachtet werden, die kein CD-11b exprimieren. Das Fehlen von CD-11b resultierte in einer fehlenden selektiven immunologischen Reaktion der Abwehrzellen. Diese waren nicht in der Lage IL-12p70 und COX-2 zu produzieren (Perera P.Y. 2001). Bis zum heutigen Zeitpunkt ist noch nicht sicher geklärt ob CD-11b als integraler Baustein des TLR 4 Rezeptors anzusehen ist oder nicht (Underhill D.M. 1999).

4.15 TLR 4 als Rezeptor für Protein F, HSP 60, EDA & Taxol

Eine weitere Komponente, welche durch TLR4 Rezeptoren erkannt wird, ist das F-Protein (fusion protein) des RS-Virus (Respiratory Sycitial Virus) (Kurt-Jones E.A. 2001). Das Fusionsprotein induziert die Produktion von Zytokinen in Monozyten und Makrophagen. Diese Abwehrreaktion fehlt vollständig in Zellen, die sowohl keine CD14 als auch TLR4 Rezeptoren aufweisen. Die Rolle, welche MD-2 in diesen Zusammenhang hat, konnte noch nicht eindeutig festgestellt werden. Untersuchungen mit HSP 60 (Heat-Shock

Protein), sowohl menschlicher als auch mikrobieller Herkunft, konnte eine Entzündungskaskade über die Aktivierung der TLR4 Rezeptoren auslösen (Ohashi K. 2000, Sasu S. 2001, Vabulas R.M. 2001). Der Komplex aus TLR4 und MD-2, aber nicht TRL 4 oder MD-2 selber, ist in der Lage HSP 60 als Trigger einer immunologischen Antwort zu erkennen. Ähnlich wie TLR4 scheint auch TLR2 auf HSP 60 zu reagieren, wobei keiner der beiden Rezeptoren selektiv für HSP 60 zu sein scheint. Dies liegt daran, dass die beobachteten Effekte von HSP aufgrund einer Kontamination dieses mit LPS und LPS assoziierten Molekülen zustande kommt (Tsan M.F. 2004). Es zeigt jedoch die Möglichkeit der Aktivierung von TLR nicht nur ausgehend von exogenen mikrobiellen Mustern (PAMP´s), sondern auch durch endogen gebildete Moleküle (welche bei Nierentransplantierten während der kalten und warmen Ischämiezeiten entstehen) (Tsan M.F. 2004).

Ein weiteres endogenes Produkt, welches über TLR4 zur Aktivierung der immunologischen Zellen führt, ist EDA (extra Domain A) eine Region des Fibronektin. EDA kommt in Fibronektin unter regelrechten Umständen nicht vor, aber alternatives „Splicen“ in Zusammenhang mit einer Verletzung von Gewebe führt zur Produktion von Fibronektin mit einer EDA-Domäne (Okamura Y. 2001). EDA ist in der Lage, nach einer Verletzung von Gewebe, einen Entzündungsprozess in monozytischen Zellen auszulösen, indem es an den TLR4-MD-2 Komplex an der Oberfläche dieser Zellen ansetzt. Weitere Untersuchungen mit LPS-Antagonisten konnten nachweisen, dass EDA selbst unter Zugabe von LPS-Antagonisten in der Lage war, ein Signal auszulösen. Diese Erkenntnis lässt auf den Rückschluss folgern, dass EDA und LPS an unterschiedlichen Ligandenbindungsstellen des TLR 4- MD-2 Rezeptorkomplexes anbinden.

Weitere Moleküle bzw. PAMP´s, aus denen eine potenzielle Aktivierung des TLR 4 Komplexes ausgehen könnte, sind Fibrinogen, bakterielle Fimbrien und Teichuronsäure. Weiterführende Studien müssen diese als potenzielle Auslöser immunologischer Reaktionen untersuchen (Underhill 2002).

4.16 TLR-Adaptormolekül MD 2

Für die Bildung des extrazellulären TLR4 Komplexes ist ein extrazelluläres Zugangsprotein von Bedeutung. MD-2 wurde als MD-1 homologes Protein beschrieben. MD-1 nimmt bei der Aktivierung von RP 105 eine zentrale Rolle ein (Shimazu R. 1999). MD-2 ist ähnlich wie MD-1 160 Aminosäuren lang, und obwohl MD-2 keine intrazelluläre Domäne besitzt, verbleibt es während der Signalinduktion mit TLR4 in einen Komplex assoziiert, und reguliert die Sensitivität dieses gegenüber LPS. Schromm et al. konnte dies in seiner Untersuchung an CHO Zellen deutlich machen, und MD-2 als wichtigen Partner

für die Induzierung des Signals durch LPS ausmachen. TLR4 braucht somit MD-2 für die Erkennung von LPS gramnegativer Bakterien (Underhill M. 2002, Schromm A.B. 2001). Dabei geht LPS eine direkte Verbindung zur Oberfläche des TLR4-MD-2 Komplex ein (Underhill M. 2002). MD-2 bildet zusammen mit TLR4 an der Zelloberfläche ein Homodimer oder einen größeren Oberflächenkomplex (Shimazu R. 1999). Durch Konjugation von LPS an einen photoaktiven Verbinder konnte Ulevitch et al. diesen direkten Zusammenhang, in Abhängigkeit zu CD14, feststellen (Da Silva C.J. 2001).
Genetische Untersuchungen an C3H/HeJ und C57BL/10ScCr Mäusen, die eine verminderte immunologische Antwort auf LPS aufweisen, haben ebenfalls die Funktion von MD-2 gegenüber TLR4 nachweisen können. Durch Übertragung von cDNA welche den genetischen Phänotypus für MD-2 beinhaltet in C3H/HeJ Zelllinien, konnte eine Oberflächenexpression von TLR4 auf diesen nachgewiesen werden. Jedoch konnte keine erhöhte Sensitivität der Empfängerzellen gegenüber den LPS Liganden festgestellt werden. Erst die zusätzliche Übertragung von MD-2 ermöglichte es diese Zellen gegenüber LPS zu sensibilisieren (Shimazu R. 1999). Ähnliche Ergebnisse erhielt man durch Untersuchungen an humanen 293T Nierenzellen. MD-2 erhöhte die Sensitivität des Rezeptors sowie die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-kB um das Zwei- bis Dreifache (Kirschning C.J. 1998, Muzio M. 1998). MD-2 assoziiert wahrscheinlich auch mit weiteren TRL´s und ist für deren Eigenschaft, ein breites Spektrum an PAMP´s zu erkennen, mit verantwortlich (Shimazu R. 1999).

4.17 TLR 4 Signaltransduktion, unabhängig von MyD88

Untersuchungen konnten einen weiteren Weg ausmachen, der zur Signalweiterleitung über TRL 4 Rezeptoren führt und ebenfalls eine Induktion des Transkriptionsfaktors NF-kB auslösen kann. Dieser Weg der Weiterleitung ist unabhängig von MyD88und lies sich nur deshalb aufzeigen, weil die NF-kB Aktivität in Zellen die keinen MyD88 Faktor haben zwar sehr stark vermindert ist, jedoch nicht vollständig fehlt. Dagegen fehlt dieser parallele Weg der Signalweiterleitung vollständig in Zellen, die keine TLR 4 auf ihre Oberfläche exprimieren (Kawai T. 1999). Kaisho et al. konnte diesen biologischen Alternativweg, während der durch LPS ausgelösten Reifung dendritischer Zellen, in seinen Untersuchungen beschreiben (Kaisho T. 2001). Ein weiteres Molekül TIRAP (oder MAL, MyD88-adaptor-like Protein) konnte in diesem Zusammenhang identifiziert, und beschrieben werden. TIRAP interagiert mit TLR 4 und ist für eine MyD88 unabhängige Kaskade der Signalübermittlung verantwortlich (Fitzgerald K.A. 2001, Horng T. 2001).
TIRAP/MAL besitzt ähnlich wie MyD88 eine carboxyterminale TIR Domäne, sowie eine aminoterminale Domäne („death domain“), mit einer im Gegensatz zu MyD88 unbekannten

Funktion. Überexpression von TIRAP/MAL kann eine NF-kB Aktivierung auslösen, die im Zusammenhang mit einer Aktivierung des TLR 4 Rezeptors und nicht des IL 1 Rezeptors steht (Fitzgerald K.A. 2001, Horng T. 2001).

Der Unterschied zwischen TIRAP/MAL und MyD88 liegt unter anderem darin, dass TIRAP/MAL mit der IRAK-2 Kinase interagieren kann und nicht mit der IRAK-1 Kinase. MyD88 interagiert dagegen mit allen beiden Kinasen intrazellulär (Fitzgerald K.A. 2001). Die Entdeckung von TIRAP/MAL eröffnet die Möglichkeit eines weiteren Weges der Zellaktivierung ausgelöst durch LPS. Beobachtungen einer direkten Interaktion zwischen TIRAP/MAL und einer PKR Kinase („double stranded dsRNA-binding protein kinase"), lassen auf eine weitere durch LPS induzierte Signalweiterleitung schließen. Es ist bekannt, dass PKR seinerseits die p38 MAPK Kinase und die Produktion von iNOS (inducible nitric oxide synthase) regulieren kann (Fitzgerald K.A. 2001).

Eine von MyD88 ebenfalls unabhängige Signalweiterleitung erfolgt, ähnlich wie TIRAP, über ein drittes Adaptor-Protein TRIF (TIR-containig adaptor inducing Interferon-β) (Tsan M.F. 2004, Yamamoto M. 2002). Auch dieses Protein besitzt genau wie TIRAP und MyD88 eine TIR homologe Domäne und induziert die Ausschüttung von IFN-β (Interferon β). TRIF ist ein Adaptorprotein, welches im Zusammenhang mit TLR 3 und TLR 4 steht. Es aktiviert über einen Transkriptionsfaktor (IFN regulatorischer Faktor 3) eine subsequente Ausschüttung von IFN-β (Interferon β) und ist an der Reifung dendritischer Zellen beteiligt (Yamamoto M. 2003).

Ein ebenfalls in dieser Gruppe der MyD88 unabhängigen Adaptor-Proteine viertes Protein ist TRAM (TRIF-related adaptor molecule) und steht in Verbindung zu TLR 4 und nicht zu TLR 3. TRAM ist, ähnlich wie TRIF bei der Produktion von IFN-(Interferon) beteiligt (Yamamoto M. 2003).

5. HLA-DR Antigen

5.1 Grundlagen

HLA (Human Leukocyte Antigen) sind Antigene, die im Zusammenhang mit der Transplantationsmedizin zuerst auf Leukozyten entdeckt worden sind. HLA-Antigene, bzw. dessen Epitope, sind in der Zellmembran verankerte Glykoproteine und befinden sich auf nahezu allen Zellen. Sie gehören zur Gruppe der Immunglobuline und sind an der Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen durch das Immunsystem essenziell beteiligt (Waßmuth R. 1995).

5.2 Genetische Grundlagen und Einteilung

Charakteristisch für den Genotyp der HLA-Antigene ist, dass mit einer Ausnahme alle Gene für diese Moleküle auf dem sechsten Chromosom lokalisiert sind. Sie lassen sich in drei Klassen unterteilen und werden als Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC, Major Histocompatibility Complex) bezeichnet. Die Einteilung umfasst: HLA–Klasse I, HLA–Klasse II sowie HLA–Klasse III. Die Nomenklatur der HLA-Antigene beinhaltet drei Teile: die Abkürzung HLA, die Isotypbezeichnung für das exprimierende Gen (z.B. HLA –A, -B, -DR) und eine Ziffer, welche die spezifische Variante des Antigens beschreibt (Waßmuth R. 2005).

5.3 HLA-Klasse I Antigene

Zu der Gruppe der HLA- Klasse I Antigene gehören die Isotypen HLA-A, -B und –C. HLA- Klasse I Antigene bestehen aus einer α –Kette und β –Kette. Auf diesen zwei Ketten unterscheidet man insgesamt vier Domänen, eine α1, α2, α3 und β2 Domäne. Von den zwei Ketten ist nur die α-Kette transmembranär verankert. An der transmembranal verankerten α-Kette bindet extrazellulär das β2-Globulin. Dadurch entsteht im extrazellulären Raum eine Bindungsstelle für Peptide. Bei den Peptiden handelt es sich um Proteinfragmente, die durch den Abbau körpereigener Proteine freigesetzt werden. Auf diese Weise lassen sich körpereigene von körperfremden Zellen unterscheiden. (Waßmuth R. 1995).

5.4 HLA-Klasse II Antigene

Die Gruppe der HLA-Klasse II Antigene wird durch die Isotypen HLA-DP, -DQ, -DR, -DN und –DO gebildet. Ähnlich der Klasse I bestehen auch diese Isotypen aus zwei Ketten, einer α –Kette und einer β –Kette. Im Gegensatz zur Klasse I sind alle beiden Ketten der Klasse II HLA-Anitgene transmembranal verankert. Der extrazelluläre Anteil beider Ketten

wird in vier Domänen unterteilt α1, α2, β1 und β2. Die α1 und β2 Domänen bilden zusammen eine extrazelluläre Bindungsstelle. Klasse II Antigene sind auf der Membranoberfläche Antigen-präsentierender Zellen (APC`s) vorhanden, wie es z.B. Makrophagen und reife Monozyten sind (Waßmuth R. 1995); vergl. Tabelle

.

Tabelle 2: MHC I, MHC II Klasse

MHC I	HLA-A HLA-B HLA-C	■ Alle kernhaltigen Zellen ■ Thrombozyten ■ Nicht Erythrozyten
MHC II	HLA-DR HLA-DR HLA-DQ	■ B-Zellen und Makrophagen ■ Dendritische Zellen ■ Endothelzellen

5.5 HLA-Klasse III Antigene

HLA-Klasse III Proteine sind komplementäre Faktoren und werden in CL, C4 und Bf eingeteilt. Es handelt sich hierbei um Plasmaproteine, die an der unspezifischen Immunabwehr beteiligt sind (Waßmuth R. 1995).

5.6 HLA-DR unter akuten Infektion bei HD-Patienten

Untersuchungen bei Hämodialysepatienten bezüglich der CD14++CD16+ Verteilung und ihrer HLA-DR Expression zeigten, dass sich während der akuten Phase einer Infektion parallel zur Erhöhung der CD14++CD16+ Monozytenpopulation die HLA-DR Expression verringerte (Nockher WA & J.E. Scherberich 1998; Scherberich J.E. 2000).

5.7 HLA Antigene bei nierentransplantierten Patienten

Die chronische Transplantatdysfunktion und der Verlust des Transplantates bleiben ungeachtet der Fortschritte im Bereich der Immunsuppression, ein noch wenig verstandenes Problem, wobei sich „immunologische“ und „nichtimmunologische“ Faktoren überschneiden. Die gute biologische Potenz der verwendeten Immunsuppressiva hat mittlerweile soweit geführt, dass in einigen Transplantationszentren vor der Transplantation bewusst auf eine HLA-Bestimmung zwischen Spender und Empfänger verzichtet wird. Sowohl HLA-Klasse I Antigene (HLA- A, und HLA-B) als auch Klasse II Antigene (HLA-DR) haben jedoch einen Einfluss auf das Transplantatüberleben, insbesondere der Effekt der Klasse II Antigene. Eine Übereinstimmung der HLA-DR Antigene zwischen Spender und Empfänger scheint für eine langfristige Transplantatfunktion wichtig zu sein.(Rodriguez D.S. 2004, Pirsch J.D. 1992). Schon in der Ära vor Cyclosporin A erkannten Ayoub und Terasaki die Wichtigkeit einer Übereinstimmung des HLA-DR Isotypes (Ayoub G. 1982). Eine retrospektive Analyse Nierentransplantierter an der Universität von Wisconsin ergab, dass innerhalb des ersten Jahres die meisten Vorfälle einer akuten Abstoßungsreaktion des Transplantates sich ereigneten (sowohl bei Patienten die eine Kadaverniere oder eine

Lebendspende bekommen hatten). Die höchste Rate einer akuten Abstoßungsreaktion im ersten Jahr zeigten jedoch die Patienten mit einer Kadaverniere, die eine geringe Übereinstimmung der HLA-DR Antigene aufwiesen (Rodriguez D.S. 2004). Je größer die HLA-DR Übereinstimmung, desto geringer waren im ersten Jahr die akuten Abstoßungsreaktionen. Ähnliche Ergebnisse zeigten in der gleichen Studie Patienten, die eine Lebendspende erhielten. Auch hier zeigte sich eine deutliche Signifikanz zwischen Anzahl der HLA-DR Übereinstimmungen und (geringeren) akuten Abstoßungsreaktionen im ersten Jahr. Je größer die HLA-DR Übereinstimmung desto geringer war die Anzahl akuter Ereignisse (Rodriguez D.S. 2004).

In derselben Studie wurde auch die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit des Transplantates analysiert. Auch hier konnte eine Signifikanz zwischen Transplantatüberleben und HLA DR Übereinstimmung aufgezeigt werden. Patienten mit einer Lebendspende hatten nach fünf Jahren ein um so besseres Transplantatüberleben je höher die HLA-DR Übereinstimmung war (Rodriguez D.S. 2004).

Ähnliche retrospektive Studien von Roberts et al. zeigten eine Verbindung zwischen einer HLA-DR Übereinstimmung und einer langen Transplantatfunktion. Eine geringere Übereinstimmung der HLA-A und -B Antigene hatte keinen nachteiligen Einfluss auf die Trans- plantatfunktion. Dagegen zeigte eine hohe Übereinstimmung der HLA-DR Antigene ein verbessertes Transplantatüberleben (Roberts J.P. 2004).

6. Grundlagen Zytokine IL-4, IL-10, IFN-γ, GM-CSF

6.1 Definition; Regulierung

Zytokine sind Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 7 bis 60 kD. Sie werden sowohl von immunologisch aktiven (z.B.CD4CD25+ Lymphozyten, Makrophagen), als auch von immunologisch nicht aktiven Zellen gebildet (Endothelzellen, Keratinozyten) (Lowry S.F., 1993, Oppenheim J.J. 2001). Die Regulierung und Sezernierung von Zytokinen erfolgt überwiegend posttranskriptional. Dieser Regulierungsmechanismus überwiegt allgemein bei kurzlebigen Proteinen, wie es z.B. bei Zytokinen der Fall ist. Daneben existiert ein weiterer Regulierungsmechanismus auf transkriptioneller Ebene (Wang E. 1997, Black R. 1991).

Die Einteilung der Zytokine erfolgt nach Art der Immunantwort (zellulär oder humoral), sowie nach ihrem „biologischen Effekt“. Zytokine, die aufgrund einer zellulären Immunantwort sezerniert werden, bezeichnet man als Typ-I Zytokine. Zur Gruppe der Typ I Zytokine, die durch T_H1 und antigenpräsentierenden Zellen (APC´s) freigesetzt werden, gehören IL-2, IFN-γ und IL-12. Zytokine, die von Zellen der humoralen Immunität (T_H2) ausgeschüttet werden, gehören zur Gruppe der Typ-II Zytokine. Unter dieser Typ-II Gruppe fallen IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. Nach ihrer regulatorischen Eigenschaft während einer Entzündungsreaktion unterscheidet man proinflammtorische und antiinflammatorische Zytokine. Zu der Gruppe der proinflammatorischen Zytokinen gehören IL-1, IL-2, IL-8, IL-12, Il-18, CSF (Colony Stimulating Factor, M-CSF, GM-CSF) und TNF-α (Metcalf D. 1986, Pestka S. 1987, Smith K.A. 1988, Beutler B. 1989, Praloran V. 1991, Mukaida N. 1994, Trinchieri G. 1998). Zur zweiten Gruppe, der antiinflammatorischen Zytokinen, zählen IL-10, Il-13 und TGF-β (Letterio J.J. 1997, Moore K.W. 2001). Zytokine vermitteln, je nach Wirkort, auto- oder parakrine Effekte.

Die Expression proinflammatorischer Zytokine durch tubuläre Epithelzellen spielt eine wichtige Rolle sowohl während einer chronischenTransplantdysfunktion als auch während akuter Ereignisse im Transplantat. *In vitro* Analysen an (proximalen und) distalen Tubuluszellen der menschlichen Niere belegen eine schnelle Hochregulierung primär nicht konstitutiver HLA-DR Antigene und des (konstitutiven) intrazellulären Adhäsionsmoleküls (ICAM-1) nach einer Exposition mit proinflammatorischen Zytokinen (Baer PC et al. 2000; Scherberich J.E. 2000, 2008).

6.2 Zytokinwirkung auf Makrophagen und Monozyten

Die Produktion von Zytokinen durch Makrophagen und Monozyten wird wiederum durch diverse Zytokine selbst reguliert. Diese können die Zellen entweder aktivieren oder hemmen. Zu den wichtigsten Makrophagen / Monozyten regulierenden Zytokinen gehören IL-10, IL-4, IL-13 und TGF-β. Sie deaktivieren Makrophagen und wirken inhibitorisch auf deren Zytokinproduktion. Darüber hinaus können IL-10 und TGF-β die Phagozytose-eigenschaft weiterer immunologisch aktiver Zellen herabregulieren. Im Gegensatz hierzu induzieren IFN-γ, und GM-CSF als potenteste Zytokine die Aktivierung bzw. Stimulation von Makrophagen / Monozyten Funktionen. IFN-γ und GM-CSF vermitteln eine verstärkte monozytäre Freisetzung von IL-12, das wiederum an der Reifung von T-Zellen und NK Zellen als ko-stimulierender Faktor beteiligt ist und gleichzeitig die zytotoxischen Eigenschaften von Lymphozyten erhöht (Kobayashi M. 1989, Nathan C.F. 1983, Kubin M. 1993).

6.3 Interleukin 4 - Grundlagen

Interleukin 4 ist ein 15kD Polypeptid, das vor allem von Mastzellen, T-Zellen und Stromazellen im Knochenmark gebildet wird. Seine biologische Wirkung erstreckt sich auf Monozyten, Endothelzellen, T- und B-Lymphozyten sowie auf Fibroblasten (Callard R. 1994). Es gehört zu den antiinflammatorischen Zytokinen und zeigt seine größte Wirkung gegenüber Monozyten. IL-4 hemmt die Freisetzung weiterer Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF-α aus Monozyten. IL-4 soll protektive Eigenschaften in atherosklerotischen Läsionen haben (Vadiveloo P.K. 1994).

6.4 Biologische Effekte von Interleukin 4

Interleukin 4 beeinflusst die Differenzierung der B-Lymphozyten und moduliert deren Produktion von IgG und IgM (Defrance T. 1988). Undifferenzierte T-Zellen reifen unter Einfluss von IL -4 zu Th_2 Zellen, wobei IL-4 von T-Zellen selbst gebildet wird (D´Andrea A. 1995). IL-4 induziert die Proliferation von Thymozyten ausgehend von hämatopoietischen Stammzellen, hemmt jedoch das Wachstum von Thymus–Epithelzellen. IL-4 inhibiert in Makrophagen und Monozyten die Expression von IFN-γ induzierten Genen sowie die Differenzierung dieser Zellen. Die Behandlung von Monozyten mit IL-4 generiert strukturell „zytoplasmatische Ausläufer“ (der Plasmamembran) und lässt diese als dendritische Zellen erscheinen (De Waal M. 1993). IL-4 ist in der Lage, *in vitro*, aus CD

14++ Monozyten dendritische Zellen in zwei Schritten zu generieren. IL-4 in Kooperation mit GM-CSF formt im ersten Schritt unreife dendritische Zellen. Im zweiten Schritt kommt es unter Einfluss proinflammatorischer Zytokine zur Ausreifung CD83+ dendritischer Zellen. Besonderheit von IL-4 ist die vermehrte Expression von MHC Klasse I und II Molekülen auf der Oberfläche sowie weiterer kostimulatorischer Moleküle und Chemokinrezeptoren (Salusto F. 1994, Romani N. 1996, Ebner S. 2001).
Zugabe von IL-4 in Monozytenkulturen, die unter Einwirkung von GM-CSF gereift sind, hemmt die Expression von Oberflächenmarkern wie CD14 und Fc Rezeptoren (Salusto F. 1994, Peters J.H. 1991). Die Kurzzeitbehandlung mit IL-4 verstärkt die Expression der Differenzierungsmarker CD11b, CD11c, CD18 und CD23 (Bogdan C. 1993, Verceli D., 1988, De Waal M. 1993). IL-4 hemmt die Produktion und Freisetzung von IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 p35 und p40 (die leichte p35 und schwere p40 Kette des IL-12), GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TNF-α und IFN-α. Es verstärkt im Gegensatz dazu die Freisetzung des IL-1 Rezeptorantagonist (IL1-ra) in Monozyten; es gibt jedoch hierzu widersprüchliche Daten (Wieser M. 1989). Durch diese unterschiedlichen Beobachtungen lässt sich die Komplexität des IL- 4 Einfluss auf Zellen erkennen. Diese divergierende Beobachtungen resultieren zum Teil auch durch die Anwendung ungleicher Versuchsparameter auf verschiedenen Zellpopulationen unterschiedlicher Herkunft (Molina I.J. 1991).

6.5 Interleukin 13 ähnelt im Aufbau und Funktion Interleukin 4

Interleukin 13 ist ein weiteres Zytokin, das in seinem Aufbau und in seiner Funktion IL-4 ähnelt. Es wird von T-Helfer Zellen Typ 2 (Th2) ausgeschüttet, und vermittelt bei allergischen Abwehrreaktionen. Der Effekt von Interleukin 13 basiert auf seine Untereinheit, welche dem Aufbau der α-Kette des IL-4 Rezeptors (IL-4Ra) ähnlich ist. Es induziert die Produktion und Freisetzung von IgE in B-Lymphozyten, hat aber keinen Effekt auf T-Zellen und NK Zellen. Seine eigentliche Wirkung ist eine Brückenfunktion welche allergische Entzündungszellen an immunologisch inaktiven Zellen bindet, und deren physiologische Funktionen verändert (Wynn T.A. 2003).

6.6 Interleukin 10 - Grundlagen

Interleukin 10 wird von einer Vielzahl differenter Zellen gebildet. Die frühere These, dass IL-10 ausschliesslich von TH 2 Zellen der humoralen Immunität gebildet wird, ist durch aktuelle Analysen widerlegt. IL-10 kann sowohl von TH 1 als auch TH 2 Zellen und

darüber hinaus auch von aktivierten B-Lymphozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen gebildet werden (Fiorentino D.F. 1991, Moore K.W. 2001).
IL-10 hat ein Molekulargewicht von 18 kD und besteht aus 160 Aminosäuren (Moore K.W. 1990, Vieira P. 1991). Sekundäre Strukturanalysen zeigen, dass IL-10 eine hohe α-Helix besitzt,die ähnlich weiteren Zytokinen, wie IL-4, GM-CSF IFN-β und IFN-γ, ist. Die biologisch aktive Form besteht aus zwei nicht kovalent gebundenen Untereinheiten und beinhaltet vier Cysteine, Cys 12, Cys 62, Cys 108, Cys 114 die über Disulfidbrücken paarweise verbunden sind und für die biologischen Eigenschaften verantwortlich sind (Windsor W.T. 1993).

6.7 Biologische Effekte von Interleukin 10

IL-10 hat direkten Einfluss auf die Ausschüttung von Zytokinen, die durch Th1 Zellen generiert werden. Darunter gehören IFN-γ, IL-2, IL-3, TNF-β und GM-CSF (Fiorentino D.F. 1991, Moore K.W. 2001). IL-10 entfaltet biologische Wirkung sowohl gegenüber Monozyten und Makrophagen, auf dendritische Zellen, T-Zellen und B-Zellen. In Monozyten und Makrophagen hemmt IL-10 die Expression von MHC Klasse II Molekülen sowie die Koexpression der Differenzierungsmarker CD54 (ICAM-1), CD86 und CD80 (de Waal M. 1993). IL-10 hemmt in Monozyten und Makrophagen die Ausschüttung von IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-12, IL-18 und TNF-α (De Waal M. 1993, Callard R. 1994). Gleichzeitig wird die Produktion des löslichen TNF Rezeptors (p55 und P75 TNFR) und des natürlichen IL-1 Antagonisten (IL-1ra) stimuliert (Willems F. 1994). Ebenfalls auf Monozyten und Makrophagen zeigten Untersuchungen, dass durch IL-10 die Expression von CD14, CD16, CD 32 und CD64 auf deren Oberfläche verstärkt wird (Te Velde A.A. 1992, Calzada-Wack J.C. 1996). Die Reifung und Generierung dendritischer Zellen wird durch IL-10 gehemmt. Dagegen kommt es unter IL-10 zur Ausdifferenzierung von Makrophagen (Allavena P. 1998); die antigenpräsentierenden Eigenschaften dendritischer Zellen werden herabgesetzt. Reife dendritische Zellen jedoch bleiben davon unbeeinflusst (MacDonald K.P.1999). Die Zytokinproduktion und Aktivierung von T-Zellen durch IL-10 erfolgt über einen indirekten Weg. Auf direkten Weg werden die Transkription des T-Zell Wachstumsfaktors IL-2 und die CD28 Signaltransduktion gehemmt (De Waal M. 1993, Taga K. 1993, Akdis C.A. 2000, Joss C. 2000). Des Weiteren reguliert IL-10 während der T-Zell-Aktivierung, über den regulatorischen T-Zellen, die Reifung weiterer T-Zellen (Groux H. 1996, Read S. 2001). Auf B-Zellen kommt es zu einer Verstärkung der MHC Klasse II Expression und einer verstärkten Antikörperausschüttung. Die Ausdifferenzierung der B-Lymphozyten und deren Proliferation werden durch IL- 10 verbessert(Rousset F. 1992). An Endothelzellen fördert IL-10 die Freisetzung von NO. NO dilatiert glattmuskuläre Gefäße

und verringert die endotheliale Adhäsion von mononukleären und granulozytären Zellen (Stefano G.B. 1997).

6.8 Interferon γ - Grundlagen

Interferone sind immunregulierende Zytokine. Insgesamt werden, anhand der Rezeptorspezifizität und ihrer Sequenzhomologie, drei Typen an Interferonen unterschieden. Die Gruppe der Typ I Interferone binden an einen spezifischen Oberflächenrezeptor, bekannt als IFN-α Rezeptor. Zur Typ I Klasse gehören IFN- α, IFN-β, IFN-ε IFN-κ IFN-τ, IFN-ζ und IFN-ω. Zur Typ II Interferon Gruppe gehört IFN-γ, welches am IFN-γ Rezeptor spezifisch bindet. Dieser heterodimere Rezeptor wird seinerseits aus zwei Ketten gebildet IFNG R1 und IFNG R2, die erst durch Aktivierung mit ihren intrazellulären Domänen interagieren und spezifische Bindungen mit Kinasen der Janus Familie eingehen (Bach E.A. 1997, Pestka S. 1997, Thiel D.J. 2000).
Die dritte Gruppe der Interferon Klasse beinhaltet drei IFN-λ Moleküle (IFN-λ1, IFN-λ2, IFN-λ3). Die Typ III Gruppe vermittelt ihr Signal durch die Zellmembran über einen Rezeptor komplex bestehend aus CRF2-4 sowie CRF2-12 (Vilcek J. 2003, Bartlett N.W. 2005). IFN –γ wird durch aktivierte T-Lymphozyten, NK Zellen, Leukozyten und Fibroblasten ausgeschüttet. IFN –γ ist an einem breiten Spektrum physiologischer Prozesse, immunologischer Reaktionen, Zellproliferation, Zellapoptosis, Stimulation und Repression diverser Genexpressionen, sowie antiviraler Aktivitäten beteiligt. Daneben kommt es zu einer Verstärkung der MHC Klasse I und Klasse II Komplexe auf Zelloberflächen (Boehm U. 1997, Schroder K. 2003). Es handelt sich um ein Homodimer, welches aus zwei 143 langen Aminosäurenketten besteht.
Strukturelle Analysen von IFN-γ ergaben, dass die monomeren Untereinheiten in einer antiparallelen Orientierung interagieren und sechs helikoidale Sequenzen beinhalten. Charakteristisch für die Struktur ist eine C-terminale Sequenz ausgehend von den Aminosäuren 123 bis 143. Die C-terminale Domäne mit seiner D1 und D2 Domäne von Position von 128 bis 131 sowie ab Position 132, ragt in seiner Ausrichtung vom Proteinkern heraus. Diesem Teil des Proteins wird aufgrund seiner Extension eine „Flexibilität“ zugeschrieben, sodass es in der Lage ist, unterschiedliche Ausrichtungen und räumliche Anordnungen anzunehmen (Ealick S.E. 1991, Gresiek S. 1992). Damit ist dieser Teil des Glykoproteins für dessen biologische Funktionen von Bedeutung. Entfernt man die D1 Domäne aus seiner C-terminalen Sequenz, so wird das Zytokin inaktiviert (Döbeli H. 1988, Sadir R. 1998); während die D2 Domäne dagegen die biologische Aktivität von IFN verstärkt. Die C-terminale Sequenz weist eine hohe Bindungsaffinität zu Heparansulfat,

einen Glykosaminoglykan der extrazellulären Matrix auf sowie zu Bestandteilen der Zellmembran (Lortat-Jacob H. 1991).

6.9 Biologische Effekte von IFN-γ

IFN-γ aktiviert antigenpräsentierende Zellen und führt zur Ausdifferenzierung von Th1 Zellen. Darüber hinaus supprimiert IFN–γ die Formation von Osteoklasten durch Degradierung des Adaptorproteins TRAF6, das an der Aktivierung des Transkriptions-faktors NF kB beteiligt ist (Schroder K. 2004). Eine Besonderheit sind die antiviralen Effekte von INF. Kommt es zur viralen Invasion in einem Wirt, so werden Interferone vom Typ I und II gebildet. Obwohl beide Interferontypen für die unmittelbare zelluläre Antwort des Wirtes auf die virale Kontamination von Bedeutung sind, ist die modulierende Eigenschaft von IFN-γ für die Koordination und Etablierung der Immunantwort unabdingbar (Huang S. 1993, Müller U. 1994, Lu B. 1998, Cantin E. 1999). IFN-γ induziert in diesem Zusammen- hang antivirale Schlüsselenzyme aus der Serin/Threoninkinase Familie (Meurs E. 1990, Beretta L. 1996). Des Weiteren reguliert IFN-γ die Expression der MHC Klasse I und Klasse II Antigene auf der Oberfläche und die Transkription von 30 unterschiedlichen Genen.

6.10 Einfluss von IFN–γ auf die Funktion von Makrophagen

Makrophagen werden durch Pathogene unmittelbar nach deren Invasion aktiviert. Dabei kommt es sowohl zur Synthese und Sekretion von antibakteriell wirkenden Peptiden („Defensinen“), neben der Freisetzung proinflammatorischer Zytokinen, die in einer Entzündungsreaktion weitere Abwehrzellen rekrutieren (Schroder K. 2004, Adams D.O. 1989).

6.11 Regulierung der IFN-γ Produktion

Die Produktion von IFN-γ wird durch die Sekretion weiterer Zytokinen aus antigen-präsentierenden Zellen reguliert, zu denen IL-12 und IL-18 gehören. Die Aktivierung von Makrophagen durch Pathogene resultiert u.a. in einer Freisetzung von Cytokinen und Chemokinen, die die Chemotaxis von NK Zellen in das betroffene Gewebe vermitteln, während freigesetztes IL-12 und IL-18 die Produktion von IFN-γ induzieren (Trowsdale J. 1990, Akira S. 2000, Schindler H. 2001, Fukao T. 2001). Dagegen hemmen Zytokine wie

IL-4, TGF-β, IL-10 und Glukokortikoide die IFN –γ Produktion und dessen Freisetzung (Sen G. 2001, Fukao T. 2000, Hochrein H. 2001).

6.12 GM-CSF Grundlagen

GM-CSF ist ein Zytokin aus der Gruppe der hämatopoietischen Wachstumsfaktoren CSF (Colony-Stimulating-Factor). GM-CSF ist in seiner reifer Form ein glykosiliertes Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 23 kD, besteht aus 127 Aminosäuren und beinhaltet vier Cystein-reiche Ausläufer (Metcalf D. 1986). GM-CSF ist von kurzer Halbwertszeit. Es moduliert die Proliferation eosinophiler und neutrophiler Granulozyten als auch die Reifung von Makrophagen (Carr P.D. 2001, Lieschke G.J. 1992, 1992 b.).
Daneben spielt GM-CSF eine Rolle in der Feinregulierung der Immunabwehr (Carr P.D. 2001, Lieschke G.J. 1992). GM-CSF kann durch unterschiedliche Zellen exprimiert werden, darunter in T-Lymphozyten (Sauter C. 1988, Antman K.S. 1988), B-Lymphozyten, Makrophagen (Brandt S.J. 1988), Fibroblasten, Mastzellen und NK Zellen (Vadhan-Raj S. 1987). Während der Reifung von Makrophagen und Monozyten, jedoch auch während der Aktivierung der Monozyten und Makrophagen nach Stimulation durch LPS, kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung des Zytokines (Le Beau M. 1986, Wong G. 1985, Diedrichs K. 1991). GM-CSF wird nach Zellstimulation durch Zytokinen, Antigenkontakt oder Entzündungsmediatoren ausgeschüttet werden (Vadhan-Raj S. 1987).

6.13 Biologische Effekte von GM-CSF auf die Zellreifung

GM-CSF als Wachstumsfaktor hämatopoietischer Vorläuferzellen weist darüber hinaus weitere zellmodulierende Eigenschaften. Es begünstigt *in vitro* das Überleben sowohl von Progenitor-, als auch reifer Zellen (Metcalf D. 1982, Stanley I.R. 1983) und legt bei Granulozyten-Makrophagen Vorläuferzellen fest, ob sie sich zu Granulozyten oder Makrophagen weiter differenzieren (Metcalf D. 1982), und stimuliert funktionelle Wirkmechanismen reifer Granulozyten, eosinophiler Zellen und Makrophagen. Es regelt das Überleben dieser Zellen sowie deren Mobilität, beeinflusst ihre Zellform und ist an deren Phagozytoseeigenschaft und intrazelluläre Synthese biologisch aktiver Moleküle beteiligt. GM-CSF ist ebenfalls für die antikörperabhängige Zytotoxizität, wie auch an der Expression diverser Oberflächenmarker auf der Zelloberfläche mitverantwortlich (Metcalf D. 1984, Stanley I.R. 1983, Crapper R.M. 1985).

6.14 Biologische Effekte von GM-CSF auf die Immunabwehr

GM-CSF ist an der Synthese und Freisetzung weiterer Zytokine direkt beteiligt. Sowohl in *vitro* als auch *in vivo* Analysen mit GM-CSF zeigten eine stimulierte Sekretion proinflammatorischer Zytokine. Es fördert die Freisetzung von TNF-alpha und IL-1ß durch Monozyten (Tiegs G. 1994, Xu J. 2003). Daneben vermittelt GM-CSF die Bildung von IL-1βR Antagonisten und hemmt die IL-2 Produktion (Xu J. 2003). GM-CSF verstärkt die Immunantwort durch LPS induzierte Zellveränderungen und reaktiviert „refraktäre“ humane Monozyten (Tiegs G. 1994, Randow F. 1997). Endotoxin stimuliert *in vivo* die Aktivität von Wachstumsfaktoren (CSF). LPS induzierbare Zytokine führten zur verstärkten GM-CSF Synthese in Makrophagen, endotheliale Zellen und Fibroblasten.

7. Steroidhormonrezeptor-Vitamin D Rezeptor

7.1 Grundlagen

Das endokrine Vitamin D System reguliert die Calcium-Homöostase und den Knochenmetabolismus. Für Vitamin D fanden sich „neue“ pleiotrope Effekte. Hierunter fallen biologische Aktivitäten, wie die Induktion und Kontrolle von Zelldifferenzierungen, Hemmung von Zellwachstum, sowie antiinflammatorische Wirkungen. Immunmodulierende Eigenschaften der verschiedenen Vitamin D Derivate (wie 1-alpha-Calcidol, 1-25-OH-Vit. D3 und Paricalcitol) sind Teil der pleiotropen Wirkungen des Vitamins (Hormone). Scherberich et al. untersuchten die modulierende Eigenschaften von Vitamin D sowohl in aktivierten (durch LPS), als auch an nicht aktivierten (CD16negativen) Blutmonozyten. Nach Inkubation mit 1-alpha-Calcidol erhöhte sich bei aktivierten Monozyten die CD14 Expression. Im Gegensatz nahm die HLA-DR Antigenpräsentation und die TLR 2/TLR4 Expression ab (Scherberich J.E. 2005). Vitamin D selbst ist Vorstufe des eigentlich aktiven Metaboliten 1,25 Dihydroxyvitamin D3. Die endgültige Konversion des 1,25 Dihydroxy-Vitamin D3 findet in den proximalen Tubuli statt, was den zellulären Rezeptor des Vitamin D (VDR) aktiviert, mit Änderung der Transkriptionsrate entsprechende Zielgene (Dusso A. 2005). Die biologischen Aktivitäten des Vitamin D erfordern einen Rezeptor mit hoher Affinität zum VDR. Es handelt sich um einen Rezeptor aus der Familie der nukleären Rezeptoren für steroidale Hormone (Typ II Rezeptor, Nicht-Steroidhormon-Rezeptor). Ähnlich wie die übrigen steroidalen Rezeptoren, agiert der VDR als ein durch Liganden aktivierter nukleärer Transkriptionsfaktor (Brown A.J. 1999).

Die funktionelle Domänen des VDR sind für ihre diversen Funktionen spezifisch, wie die Ligandenbindung, die Heterodimerisierung mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR), die Bindung des Heterodimers an die Promoterregion des entsprechendes Genes, sowie die Rekrutierung mit VDR interagierenden nukleären Proteinen sogenannten Koregulatoren, welche die Expression der entsprechenden Gene verstärken (Dusso A. 2005).

Die Rezeptorbindung der Liganden führt zu dessen dreidimensionaler Konformationsänderung. Diese Strukturänderung ist für die Rekrutierung von Proteinen verantwortlich, die eine rasche Translokation des zytoplasmatischen Anteils des VDR über Mikrotubuli zum Nukleolus fördern (Racz A. 1999, Barsony J. 1992).

7.2 Aufbau des Vitamin D Rezeptors VDR

Der Aufbau des Vitamin D Rezeptors unterscheidet sich von den übrigen Steroidhormonrezeptoren im Wesentlichen durch seine N-terminale Domäne. Diese ist, im

Vergleich zu den anderen Steroidrezeptoren, kürzer. Der übrige Aufbau ist ähnlich den übrigen Steroidhormonrezeptoren konstant. Die N-Terminale Sequenz mit ihrer ligandenunabhängiger Aktivierungsfunktion AF-1 wird durch die DNA-Bindungsdomäne flankiert (DBD), gefolgt durch die Liganden-Bindungs-Domäne (LBD) welche die ligandenabhängige Aktivierungsfunktion AF-2 enthält. Die DNA Bindungs- sowie die Ligandenbindungsdomäne sind in allen Rezeptoren ähnlich. Eine Variabilität besteht im Bereich der N-terminlen Region und der C- terminalen Region (Alberts B.A. 2002).

7.3 Regulierung der 1, 25 $(OH)_2$ D_3 – VDR Interaktion

Die biologische Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor wird durch eine Vielzahl an Faktoren beeinflusst: Die Zugänglichkeit des Hormons an den Rezeptor, die Rezeptordichte sowie genetische und posttranslationale VDR Modifikationen. Beteiligt sind weiterhin koregulatorische Moleküle. Die intrazelluläre Konzentration des VDR wird durch die VDR-Liganden beeinflusst. Dieser Mechanismus der Regulierung wird als „homologe Regulation“ bezeichnet (Costa E.M. 1986). Weitere Hormone, Glukokortikoide und Wachstumsfaktoren sind ebenfalls beteiligt. Es handelt sich hierbei um einen heterologen Regulationsmechanismus (Brown A.J. 1999, Hirst M. 1982). Der Vitamin D Rezeptor wird je nach Organlokalisation unterschiedlich reguliert. Diese Variabilität der Modulation ist abhängig vom Stadium der Proliferation und des Differenzierungsgrades der Zielzelle sowie der Unterschiede des aktivierten intrazellulären Signalweges (Brown A.J. 1995). Hintergrund sind Polymorphismen des VDR-Gen, deren Expression mit verminderter Knochendichte, Tendenz zum Hyperparathyreoidismus, Resistenz gegenüber einer Vitamin D Therapie, einem erhöhten Infektionsrisiko und Karzinomrisiko, sowie mit Autoimmunerkrankungen einhergehen können (Uitterlinden A.G. 2004).
Eine posttranslationale Modifikation des Vitamin D Rezeptors kann ebenfalls die Aktivität beeinflussen. Patienten, die unter einer Niereninsuffizienz leiden, haben eine verminderte Aktivität des Rezeptors. Eine posttranslationale VDR-Modifikation lässt sich durch Substanzen aus dem urämischen Plasma/Ultrafiltrat induzieren (Patel S.R. 1995). Dabei reagieren diese Moleküle kovalent mit der DNA-Bindungsdomäne und interagieren zwischen der Bindung zwischen dem VDR-RXR Heterodimer und der Bindung zur DNA (Patel S.R. 1996). Eine weitere Möglichkeit der Modulation der Rezeptoraktivität besteht durch die erforderlichen nukleären Koregulatoren. Dabei konkurrieren der VDR-Transkriptionsmechanismus mit solchen, die ebenfalls nukleäre Komodulatoren für die Regulierung der Genexpression benötigen (Smith C.L. 1996).

8. Studiendesign

8.1 Klinische Untersuchungen - Patienten & Messgrößen

Wir untersuchten 130 Nierentransplantierte des Kuratorium für Dialyse und Nierentransplantation e.V. des Nierenzentrums München-Süd, Seybothstr. 75. Untersucht wurden Patienten, denen entweder eine Kadaverniere oder ein Transplantat durch Lebendspende übertragen wurde. Alle Patienten stellten sich nach der Transplantation im Kuratorium zur Fortführung der Verlaufskontrolle vor und wurden in einem „Recall“ von zwei (vier) bis sechs Monaten untersucht. Die Posttransplantat Analysen der Patienten bestanden in einer Bestimmung üblicher Blutparameter sowie des Proteinausscheidungsmuster. Einmal, bis zweimal im Jahr wurde, eine sonografische Untersuchung des Transplantates und des Abdomens durchgeführt. In unserer Studie untersuchten wir sowohl klinische als auch immunologische Merkmale der Patienten. Nach ausführlicher Unterrichtung und schriftlichen Einverständnis, begleitend zu den Routine-Entnahmen, erfolgte eine molekularbiologische Analyse für insgesamt fünf Polymorphismen. Diese waren: IL-4 590 C/T, IL-10 1082 G/A, IFN-γ 874 T/A, GM-CSF 677 C/A sowie der VDR-BsmI Polymorphismus (Kooperation Prof. Dr. med. Michael Fischereder, Med. Poliklinik Innenstadt und Prof. Dr. med. Peter Lohse, Institut für klinische Chemie, Klinikum Grosshadern der LMU München). Für alle zellbiologischen (FACS) und andere Analysen lagen die positiven Voten von Ethikkommissionen zweier Landesärztekammern (Hessen, Bayern) vor.

Ein Teil der hier vorgestellten Untersuchungsergebnisse wurde ermöglicht durch Mittel des Bundesministeriums für Forschung und Technologie (BMFT, später BMBF) und Zuwendungen aus der Hanne und Sepp Sturm Stiftung, München.

Ziel der Studie war es, klinische, laborchemische, immunologische und genetische Merkmale synergistisch mit Schwerpunkt einer chronischen Transplantatdysfunktion bei Kurz- und Langzeittransplantierten zu beurteilen. Hierbei galten als „Unterkriterien“ sog. stabile und instabile klinische Verläufe, wie unten näher definiert.

8.2 Patientenkollektiv

Von den insgesamt 130 teilnehmenden Nierentransplantierten waren 82 Patienten männlich und 48 weiblich. Im Mittel betrug das Alter der Patienten 60 Jahre mit einer Standardabweichung von +/- 12,8 Jahren. Das Alter unseres jüngsten untersuchten Patienten lag bei 28 Jahren mit einem Nierentransplantatalter von drei Jahren. Unser

ältester untersuchter Nierentransplantierter war 85 Jahre mit einem Transplantatalter von 8 Jahren. Das Durchschnittsalter aller Nierentransplantate (Kadaverniere und Lebendspende) betrug 11 Jahre mit einer Standardabweichung von +/- 5,6 Jahren. Das in dieser Studie jüngste Transplantat war 1 Jahr alt, das älteste untersuchte Transplantat 28 Jahre alt.

Das gesamte Patientenkollektiv wurde von uns, anhand des Transplantatalters, in insgesamt vier Gruppen unterteilt.

- **Die erste Gruppe hatte ein Transplantatalter von 1- 4 Jahren (insgesamt 36 Patienten)**
- **Die zweite Gruppe hatte ein Transplantatalter von 5- 8 Jahren (insgesamt 35 Patienten)**
- **Die dritte Gruppe hatte ein Transplantatalter von 9- 13 Jahren (mit insgesamt 32 Patienten)**
- **Die vierte Gruppe hatte ein Transplantatalter von mehr als 14 Jahren (27 Patienten).**

Aufgrund der zusätzlich weiter unten beschriebenen erhobenen klinischen Daten (Blutbild, quant. Proteinausscheidungsmuster), wurde jede der vier Gruppen weiter in zwei zusätzliche Untergruppen unterteilt. Jede Gruppe wurde hierbei anhand des Verlaufs der klinisch erfassten Daten innerhalb eines Jahres, in zwei Untergruppen unterteilt. Die Unterteilung erfolgte aufgrund der drei Verlaufsparameter Kreatinin (S), Albumin (U), alpha1-Mikroglobulin (U), aber auch anhand des Allgemeinbildes in einen guten (stabiler Verlauf) oder einen schlechten (instabiler) Verlauf der Transplantatfunktion.

Alle von uns untersuchten Patienten wurden mündlich und/oder schriftlich über die Ziele unserer Studie aufgeklärt (Prognosebeurteilung, Risikostratifizierung nach NTX). Entsprechende Voten der bayerischen und hessischen Landesärztekammern lagen vor. Blutentnahmen erfolgten nur als Ergänzung mit ohnehin erforderlichen Routinekontrollen.

8.3 Datenerfassung

Der klinische Verlauf aller untersuchter Nierentransplatierter, erfolgte über die Datenerfassung aus den Krankenakten. Aus den Krankenberichten wurden, anhand eines hierfür ausgearbeiteten Evaluationsbogens, folgende Befunde aufgenommen (S=Serum, U=Urinprobe):

- Alter, Geschlecht, Grunderkrankung
- NTX-Transplantat: Kadaverniere, Lebendspende

- Standardblutparameter über einen Untersuchungszeitraum von drei Jahren: Calcium (S), Harnstoff (S), Krea (S), Harnsäure (S), Alkalische Phosphatase (S), Phosphat (S), CRP (S), HbA1c (S)
- Proteinausscheidungsmuster über einen Untersuchungszeitraum von drei Jahren: Gesamteiweiß (U), Albumin (U), alpha1-Mikroglobulin (U)
- Art der Immunsuppression: Einfachimmunsuppression, Einfachimmunsuppression mit Glucocorticoid, Zweifachimmunsuppression, Zweifachimmunsuppression mit Glucocorticoid.
- Begleiterkrankungen (Komorbidität) nach Transplantation.
- Klinische Ereignisse nach Nierentransplantation.

8.4 Klinische Endpunkte (Transplantatdysfunktion) nach Nierentransplantation

Als **Endpunkt** einer chronischen Transplantatdysfunktion wurden folgende Kriterien während der Verlaufsbeobachtung definiert:

- Vollständige Rückkehr in die chronische Hämodialyse
- Versterben des Patienten

8.5 Definition einer Funktionsverschlechterung des NT (instabile NTX-Funktion)

Zur Einteilung der Untergruppen wurden als Verlaufsparameter aus den Standard-Blutwerten und Proteinausscheidungsmuster folgende Parameter ausgesucht:

- Kreatinin (S)
- Albumin (U)
- Alpha-1- Mikroglobulin (U) (a1MG)

Als <u>Verschlechterung des klinischen Verlaufs</u> wurden folgende Kriterien festgesetzt:

- **Erhöhung des Kreatinin Mittelwertes im Serum um > 0,3 mg innerhalb eines Beobachtungsjahres**
- **Verdoppelung des Albumin Wertes (Protein/Kreatinin Index, gr/gr.Kreatinin) im Harn innerhalb eines Jahres**
- **Verdoppelung des alpha1-MG Wertes (Protein/Kreatinin Index) im Harn innerhalb eines Jahres**

8.6 Auswahl der Untergruppen zu zellimmunologischen Analysen

Aus dem gesamten Patientenkollektiv wurden für die weitere immunologische Bestimmung von CD14, CD16, HLA-DR, TLR 2, TLR 4 auf den Blutmonozyten anhand der festgesetzten Parameter die Patienten ausgesucht. Aus den Subgruppen NTX 1-4 (n=36), NTX 5-8 (n=35), NTX 9-13 (n=32) wurden die Patienten ausgesucht (insgesamt 24 Patienten, n= 24), die eine Erhöhung der Krea (S) („creaping creatinine“) Werte, sowie eine Verdoppelung der Alb (U) und a1MG (U) Werte im Verlauf eines Jahres aufwiesen. Als Vergleichskollektiv wurden alle langzeittransplantierte Patienten mit einem Transplantatüberleben von über 14 Jahren herangezogen (n=27). Als zusätzliche Vergleichskollektive zur NTX-Gruppe untersuchten wir 49 Hämodialysepatienten und 90 Niereninsuffiziente, die noch keine Hämodialyse bekommen hatten. Als Kontrollgruppe zu allen Gruppen diente eine Gruppe 16 gesunder Probanden.

8.7 Auswahl der Untergruppen zu molekularbiologischen Bestimmungen

Aus dem Patientenkollektiv der vorausgegangenen zellimmunologischen Bestimmung wurden für die molekularbiologische Analyse des IL-4 590 C/T, IL-10 1082 G/A, IFN-γ 874 T/A, GM-CSF 677 A/C sowie des VDR-BsmI Polymorphismus, die Kurzzeit-transplantierte (instabiler NT Verlauf, n= 21, NTX 1-10 Jahre) gegen langzeittransplantierte Patienten (NTX ≥ 14 Jahre, n=27) miteinander verglichen. Das mittlere Alter des Transplantates in der Gruppe de Kurzzeittransplantierten lag bei 5 (+/- 2,7) Jahren, in der Gruppe der Langzeittransplantierten bei 17 (+/- 3,2) Jahren.

9. Material und Methodik

Klinische Standardroutineparameter

Die verschiedensten laborchemischen Standardparameter erfolgten über ein zertifiziertes Kliniklabor mit entsprechenden laufenden Qualitätskontrollen. Die Bestimmung des Proteinausscheidungsmusters beinhaltete die Surrogatmarker Gesamteiweiß, Albumin, a1-Mikroglobulin, jeweils bezogen auf gr/Krea im Harn (Mittelstrahlurin, Protein-Kreatinin-Index).

9.1 Materialien für die Bestimmung von CD14, CD16, HLA-DR, TLR 2, TLR 4

Antikörper: Anti CD 14-FITC*, Anti CD 16-PE-Cy5*, Anti HLA-DR-PE*, Anti TLR 4-PE#, Anti TLR 2-PE#. Caltag Fixation/Permeabilization Kit.

* von Becton Dickinson (Heidelberg)

von Natutec Chemikalien: Cellfix (10- fach konzentriert) (Fixierlösung)*, CellWash (Waschpulver)*, FACS flow, Trägerflüssigkeit*, FACS Lysing Solution*

von Becton Dickinson (Heidelberg) Geräte: FACScan, Durchflusszytometer

*von Becton Dickinson (Heidelberg)

9.2 Durchflusszytometrie (FACS)

Mittels des Prinzips der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung (FACS, fluorescence activated cell sorting) war es möglich Zellen, anhand ihrer Lichtstreueigenschaft und der emittierten Fluoreszenz, zu analysieren. Monoklonale Antikörper gekoppelt an einem Fluoreszenzfarbstoff (FITC –Fluoresceinisothiocyanat, PE-Phycoerythrin, PerPC-Peridin-Chlorophyll-a-Protein, CY5-Cyanin 5), wurden, durch spezifische Bindung auf den Proteinen (intrazellulär oder extrazellulär), die zu untersuchenden Zellen markiert. Mithilfe des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes war es möglich, sowohl Größe als auch Granularität der markierter Zellen zu untersuchen. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, forward angle light scatter) war in einem Winkelbereich zwischen 0^0 und 10^0 sensitiv für den Querschnitt der Zellen und gab über deren Größe Auskunft. Ein geringer Teil des Lichtes wurde in einem Bereich von 90^0 seitwärts gestreut (SSC, side scatter), und erfasste die Granularität und äußere Form der markierten Zellen. Die Darstellung der Messergebnisse erfolgte über ein Punkthistogramm (Dotplot). In diesem wurden Vorwärts- und Seitwärts-streulicht auf Abszisse und Ordinate des Punkthistogramms (Zweifarbenfluoreszenz) gegenübergestellt. Im Dotplot ließen sich die Zelluntergruppen wie Lymphozyten, Mono-zyten und neutrophile Granulozyten differenzieren. Die zu untersuchende Subpopulation der Monozytenphänotypen CD14++, CD14+CD16+, CD14+CD16++, waren durch Setzen von „Fenstern“ (Gates) von den übrigen Populationen abgrenzbar. Einzelheiten der Analysenmethoden wurden ausführlich zuvor von uns beschrieben (Nockher et al. 1994, 1995, Nockher et al. 1997, 1998; Scherberich et al. 1999, 2000 etc.). Für die Fluoreszenz wurde ein Argonlaser mit einer Emissionslinie von 488 nm verwendet. Je nach Fluoreszenzfarbstoff wurden diese durch den Laser angeregt. Sie hatten unterschiedliche Emissionsspektren. Die Fluoreszenzfarbstoffe FITC, PE und PerPC weisen die Eigenschaft auf, bei 488nm einen unterschiedlichen Abstand zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge (auch als Stockes´scher Shift bekannt) zu haben. Dadurch war es

möglich, bei der Zweifarben-Fluoreszenz auf unterschiedliche Farbstoffe zu verzichten. Durch hydrodynamische Fokussierung des Zellstroms in einer laminar fließenden Trägerflüssigkeit wurde jede Zelle der Probe am Lichtstrahl des Lasers vorbeigeführt.
Die jeweils untersuchten Proben aus EDTA-Vollblut wurden entsprechend für die extrazelluläre und intrazelluläre Bestimmung vorbereitet (TLR 4). Für den extrazellulären Antigennachweis wurde EDTA-Vollblut mit den entsprechenden Antikörper inkubiert, die Erythrozyten lysiert, und anschließend die ungebundenen Antikörper weggewaschen und fixiert. Die anschließende Isotypbestimmung diente zur Kontrolle unspezifischer Bindungen der Detektionsantikörper.
Für den intrazellulären Antigennachweis (TLR 4 und ausschließlich TLR2), wurde EDTA-Vollblut verwendet, welches erst nach Fixation und Permeabilisation mit den entsprechenden Antikörper inkubiert wurde. Die Auswertungen erfolgten mithilfe des statistischen Moduls B&D, Heidelberg.

Subpopulationen peripherer Blutmonozyten

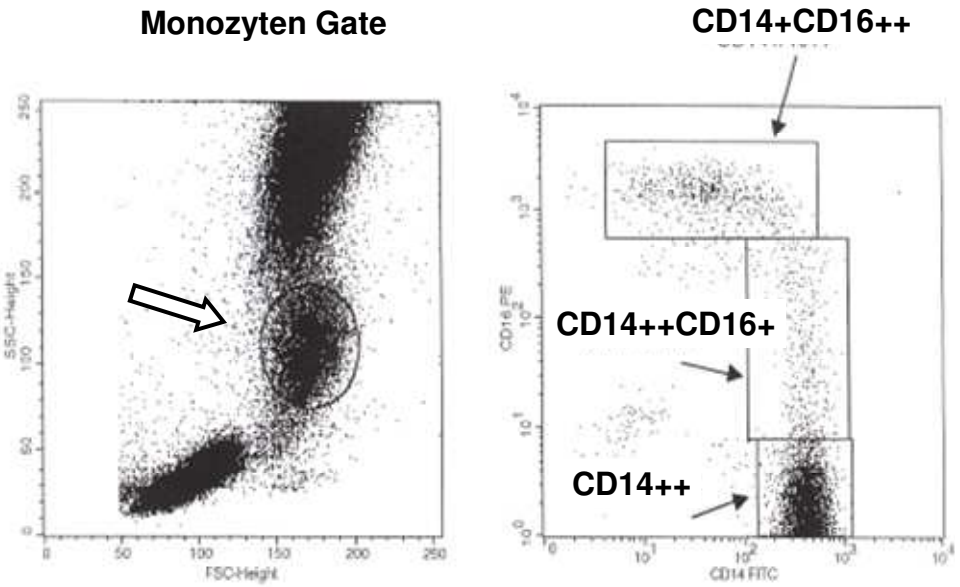


Abbildung 5: Darstellung peripherer Blutmonozyten im Gate R1 in der linken Abbildung. Auf der rechten Abbildung sind in einer logarithmischen Kurve die Expressionen für Epitope CD 14 und CD 16 dargestellt.
Rechte Abbildungshälfte Histogramm der selektierten und näher analysierten drei monozytären Subpopulationen diskriminiert nach den Oberflächenmarkern CD14 (pleiotroper Endotoxinrezeptor) und CD16 (niedrig affiner Fc-γIII Rezeptor). Die Epitope für den Nachweis der Toll-Like Rezeptoren TLR 2 und TLR 4 sowie HLA-DR wurde einzeln für die jeweilige Monozytenuntergruppe bestimmt.

9.3 Materialien und Methoden für die molekulargenetische Untersuchungen

DNS-Extraktion: EDTA-Röhrchen (Boehringer Werke), Lysis-Puffer, NaCl-EDTA, 10 % SDS, PK (Proteinkinase), 6 M NaCl, Ethanol-Absolut, TE-Puffer.

9.4 DNS-Extraktion

Die DNS-Extraktion erfolgte aus 1,5 ml Vollblut entsprechend dem folgendem Protokoll:
1,5 ml Vollblut wurden mit 10 ml Lysis-Puffer zugesetzt und über 45 min stehen gelassen. Bei 3000 Upm wurde 20 min lang zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pallet mit 4 ml NaCl-EDTA aufgelöst. Anschließend 10 min bei 3000 Upm zentrifugiert und der

Überstand erneut verworfen. Das verbliebene Pallet wurde mit 2,5 ml NaCl-EDTA, 125 µl 10% SDS und 50 µl PK aufgelöst. Das Röhrchen wurde über Nacht (min. 12 Std.) bei 37 ^{0} C inkubiert. Die Resuspension mit 1 ml 6M NaCl zugesetzt und 15 sek vermischt. Anschließend bei 7000 Upm 10 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein neues Röhrchen umpipetiert. 10 ml Ethanol-Absolut wurden zugegeben und 10 min bei 7000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Röhrchen zum Trocknen gelassen. Die isolierte DNS wurde mit 300 µl TE-Puffer aufgelöst.

9.5 Material zur Bestimmung genetischer Polymorphismen

Materialien: Primer (Invitrogen), dNTP, PCR-Puffer, DMSO, Taq Polymerase, Agarose Pulver, TAE-Puffer, Ethidiumbromid, Loading Buffer, Restriktionsenzyme (NEB).

9.6 Methode der PCR (Polymerase Chain Reaction)

Das Verfahren der PCR basiert auf dem Prinzip der Vervielfältigung einer definierten Sequenz aus dem DNS-Strang. Das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion findet in einem Thermocycler statt, welcher die Temperaturen der für die Durchführung der PCR notwendigen Komponenten, exakt steuert. Die für eine PCR grundlegenden Komponenten sind folgende:

- DNS
- Primer, komplementäre Nukleotidsequenzen, die den Startpunkt auf den DNS-Einzellsträngen festlegen. Durch Veränderung eines Basenpaares ist es möglich einen sogenannten Mismatch in die Sequenz einzubeziehen. Dadurch kann die Selektivität der Restriktionsenzyme gesteuert und bestimmt werden.
- Polymerase, Enzym zur Vervielfältigung
- dNTP´s, Desoxynukleotidtriphosphate, die als Bausteine der DNS-Sequenz verwendet werden. In Zellen besitzen sie zusätzlich auch regulatorische Funktionen.
- Mg^{2+}-Ionen, für die Funktion der Polymerase
- Pufferlösung, für die Funktion der Polymerase

Die **Amplifikation der DNS-Sequenz** im Thermocycler durchläuft verschiedene Schritte:

- Anfangsdenaturierung, die DNS wird anfangs auf eine Temperatur von 94^{0}-95^{0} C erhitzt um eine Auftrennung der Dopellstrang-DNS zu erzielen.
- Denaturierung auf eine Temperatur von 94^{0}-95^{0} C während der Zyklen, um die Doppelstrang-DNS aufgetrennt zu halten.
- Primer-Annealing, um die spezifische Anlagerung der Primer auf die Einzelstränge zu ermöglichen. Die hierbei nötige Temperatur wird von den Primer bestimmt und liegt typischerweise zwischen 55^{C} und 65° C. Die genaue Annealing-Temperatur der Primer ist primär von ihrer Länge abhängig, aber auch von ihrer Sequenz. Kleinere Temperaturen führen zu einer unspezifischen Bindung der Primer.
- Extension, die Polymerase fühlt die fehlenden Stränge mit den komplementären Nukleotiden. Die Temperatur liegt in einem Bereich zwischen 68° -72° C. Die dazu notwendige Zeit ist von der Größe des Amplifikates abhängig.
- Endextension, bei einer Temperatur von 72° C für 4 min und anschließender Abkühlung des Gemisches auf 4° C.

9.7 Gelelektrophorese

Das durch die PCR entstandene Amplifikat der DNS-Sequenz wird durch Auftrennung in einer Gelelektrophorese anhand seiner Größe identifiziert. Ein elektrisches Feld wird verwendet um die negativ geladen Nukleinsäure-Moleküle durch ein Agarosegel zu ziehen. Die verwendete Agaroselösung dient als Sieb, dass die durchlaufenden Moleküle entsprechend ihrer Größe zurückhält. Dadurch kommt es zu einer Auftrennung des DNS-Gemisches. Sichtbar gemacht werden die DNS-Sequenzen erst durch Belichtung mit UV-Licht. Dazu ist es notwendig, das für die Auftrennung verwendete Agarosegel mit Ethidiumbromid zu versetzen. Ethidiumbromid ist ein roter Phenanthridin-Farbstoff, der zum Nachweis von DNS und RNS in der Molekularbiologie verwendet wird.

9.8 Bestimmung des IL-4 590 C/T Polymorphismus

Die Bestimmung des IL- 4 590 C/T Polymorphismus erfolgte entsprechend vier unterschiedlicher Protokolle. Dies war notwendig, da die in der Literatur angegebenen Häufigkeiten der Verteilung des Polymorphismus nicht mit unseren Häufigkeiten übereinstimmten, und eine starke Divergenz aufwiesen. Dazu stellte sich während der Etablierung der Verfahren fest, dass nicht alle ausgesuchten Primer und Restriktionsenzyme in gleicher Qualität arbeiteten.

9.8.1 1. Protokoll IL-4 590 C/T

PCR Zusammensetzung (pro Ansatz):

PCR-Puffer (10x)	3µl	
dNTP-Mix	5µl	
5` Primer	3µl	IL4-590 F: gtccttctcaaaacacctaaacttgggagaccattg*
3´ Primer	3µl	IL4-590 R: tacaggtggcatcttggaaactgtcctgtc
DNA-Polymerase	0,1µl	
Destilliertes Wasser	14,4µl	
DNS	1,5µl	
Endvolumen:	30,0µl	

*Austausch eines Basenpaares, sogenannter Mismatch an Position c

PCR Bedingungen

Zyklus:	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Anfangsdenaturierung	95^0	15min	1
• Denaturierung	94^0	30sek	
• Primer-Annealing	59^0	30sek	35
• Extension	72^0	30sek	
Endextension	72^0	10min	1

Restriktionsverdau (pro Ansatz):

Restriktionsenzym: PshA I (gacnn-nngtC)	0,2µl
Enzympuffer	1,2µl
Wasser	0,6µl
PCR-Produkt	12µl

C-Allel : 112 bp + 33 bp
T-Allel : 145 bp

Agarose-Gel: 2% Agarose mit Ethidiumbromid

Loading Buffer 2µl
Produkt 10µl

Spannung 120V
Laufzeit 2Std
DNA-Leiter 100 bp

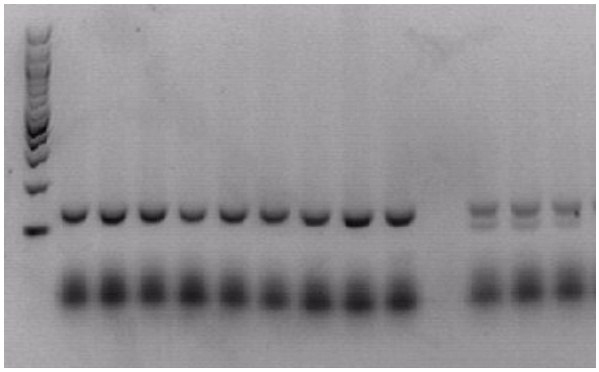


Abbildung 6: IL 4 entsprechend Protokoll 1. Sowohl die von uns bestimmten Primer mithilfe des Programms FastPCR, als auch das verwendete Restriktionsenzym PshAI, erwiesen sich als nicht optimal. Der Versuch der Veränderung der PCR-Bedingungen verbesserte in keiner Weise das Ergebnis.

9.8.2 2. Protokoll IL-4 590 C/T

PCR Zusammensetzung (pro Ansatz)

PCR-Puffer (10x)	3µl
dNTP-Mix	5µl
5` Primer	3µl IL4-590 F: gtccttctcaaaacacctaaacttgggagaacatgg*
3´ Primer	3µl IL4-590 R: tacaggtggcatcttggaaactgtcctgtc
DNA-Polymerase	0,1µl
Destilliertes Wasser	14,4µl
DNS	1,5µl
Endvolumen:	30,0µl

*Austausch eines Basenpaares, sogenannter Mismatch an Position g

PCR Bedingungen

Zyklus:	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Anfangsdenaturierung	95^0	15min	1
• Denaturierung	94^0	30sek	
• Primer-Annealing	60^0	30sek	35
• Extension	72^0	30sek	
Endextension	72^0	10min	1

Restriktionsverdau (pro Ansatz)

Restriktionsenzym: AVA II (g-gwCc)	0,2µl
Enzympuffer	1,2µl
Wasser	0,6µl
PCR-Produkt	12µl

C-Allel : 110 bp + 35 bp
T-Allel : 145 bp

Agarose-Gel: 2% Agarose mit Ethidiumbromid
Loading Buffer 2µl
Produkt 10µl
Spannung 120V
Laufzeit c.a. 2Std
DNA-Leiter 100 bp

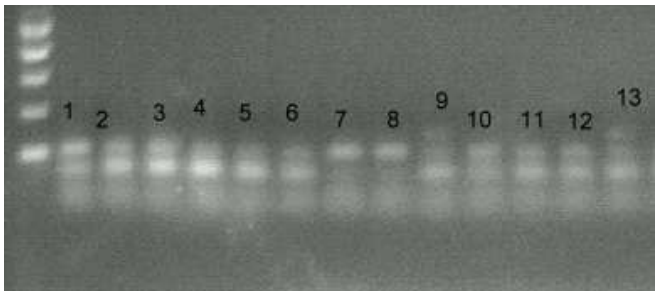


Abbildung 7: IL 4 entsprechend Protokoll 2. Die mit Hilfe des Programmes FastPCR bestimmten Primer, erwiesen sich bei dem zweiten Versuch der Etablierung des Verfahrens zur IL 4 -590 C/T Bestimmung, als nicht optimal. Versuche die PCR Bedingungen zu verändern, verbesserten das Ergebnis nicht.

9.8.3 3. Protokoll IL-4 590 C/T entsprechend Publikation (Hijazi Z., Haider M.Z. 2000)

PCR Zusammensetzung (pro Ansatz)

PCR-Puffer (10x)	3µl	
dNTP-Mix	5µl	
5` Primer	3µl	IL4-590 F: taaacttgggagaccatggt*
3´ Primer	3µl	IL4-590 R: tggggaaagatagagtaata
DNA-Polymerase	0,1µl	
Destilliertes Wasser	14,4µl	
DNS	1,5µl	
Endvolumen:	30,0µl	

*Austausch eines Basenpaares, sogenannter Mismatch an Position g

PCR Bedingungen

Zyklus:	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Anfangsdenaturierung	95^0	15min	1
• Denaturierung	94^0	30sek	
• Primer-Annealing	48^0	30sek	40
• Extension	72^0	30sek	
Endextension	72^0	10min	1

Restriktionsverdau (pro Ansatz):

Restriktionsenzym: AVA II (g-gwCc)	0,2µl
Enzympuffer	1,2µl
Wasser	0,6µl
PCR-Produkt	12µl

C-Allel : 177 bp + 18 bp
T-Allel : 195 b

Agarose-Gel: 2% Agarose mit Ethidiumbromid
Loading Buffer 2µl
Produkt 10µl
Spannung 120V
Laufzeit c.a. 2Std
DNA-Leiter 100 bp

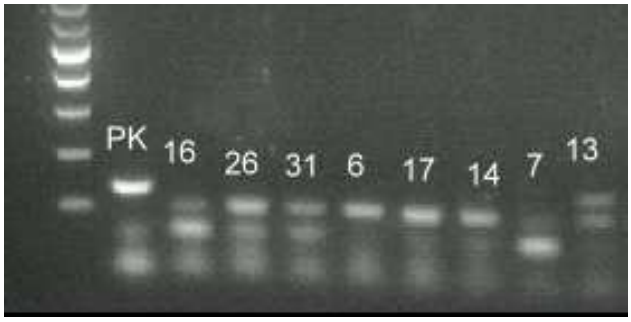


Abbildung 8: IL 4 entsprechend Protokoll 3. Die im dritten Protokoll ausgesuchten Primer entsprachen der in der Literatur beschriebenen Primer (Hijazi Z., Haider M.Z. : Interleukin- 4 Gene Promoter Polymorphism [C590T] and Asthma in Kuwait Arabs. Int Arch Allergy Immunol 2000; 122: 1890-194). Die ausgesuchten Primer haben auch hier nicht optimal gearbeitet. Dies liegt an den leicht veränderten Bedingungen in unserem Versuchsaufbau. In erster Linie sind wahrscheinlich die unterschiedlich verwendeten Puffer zu erwähnen.

9.8.4 4. Protokoll IL-4 590 C/T

PCR Zusammensetzung (pro Ansatz)

PCR-Puffer (10x)	3µl	
dNTP-Mix	3µl	
5` Primer	1µl	IL4-590 F: gtccttctcaaaacacctaaacttgggagaacatggt*
3´ Primer	1µl	IL4-590 R: acaccggagagggaagatacg
DNA-Polymerase	0,15µl	
$MgCl_2$	1,8µl	
Destilliertes Wasser	18,5µl	
DNS	1,5µl	
Endvolumen:	(30µl) 29,95µl	

*Austausch eines Basenpaares, sogenannter Mismatch an Position g

PCR Bedingungen:

Zyklus:	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Anfangsdenaturierung	94^0	10min	1
• Denaturierung	94^0	20sek	
• Primer-Annealing	64^0	20sek	35
• Extension	72^0	20sek	
Endextension	72^0	7min	1

Restriktionsverdau (pro Ansatz)

Restriktionsenzym: AVA II (g-gwCc)	0,2µl
Enzympuffer	1,0µl
Wasser	5,8µl
PCR-Produkt	7µl

C-Allel : 229 bp + 35 bp
T-Allel : 264 bp
Agarose-Gel: 2% Low melting Agarose mit Ethidiumbromid

Loading Buffer 2µl
Produkt 10µl
Spannung 110V
Laufzeit c.a. 1,5Std
DNA-Leiter 100 bp

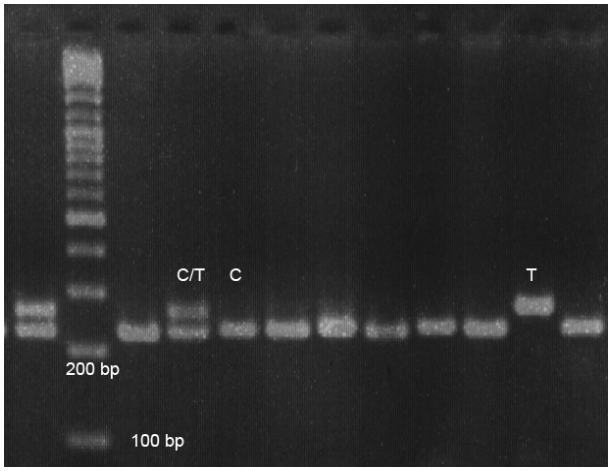


Abbildung 9: IL 4 entsprechend Protokoll 4. Gelelektrophorese IL 4 -590 C /T. Die Primer wurden für unsere Versuchsbedingungen optimal ausgewählt. Dadurch konnte die PCR ein Produkt amplifizieren, welches durch den anschliessenden Restriktionsverdau optimal geschnitten werden konnte.

9.9 Bestimmung des IL-10 1082 G/A Polymorphismus

Die Bestimmung des IL 10 G/A Polymorphismus erfolgte entsprechend folgendem Protokoll:

PCR Zusammensetzung (pro Ansatz)

PCR-Puffer (10x)	3µl	
dNTP-Mix	5µl	
5` Primer	3µl	IL10 -1082 G/A F: ccaagacaacactactaaggcttccttggga*
3´ Primer	3µl	IL10 -1082 G/A R: gatggggtggaagaagttgaaataacaagg
DNA-Polymerase	0,1µl	
Destilliertes Wasser	14,4µl	
DNS	1,5µl	
Endvolumen:	30,0µl	

*Austausch eines Basenpaares, sogenannter Mismatch an Position c

PCR Bedingungen:

Zyklus:	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Anfangsdenaturierung	95^0	15min	1
• Denaturierung	94^0	30sek	
• Primer-Annealing	60^0	30sek	35
• Extension	72^0	30sek	
Endextension	72^0	10min	1

Restriktionsverdau (pro Ansatz):

Restriktionsenzym: EcoN I (cctnn-nnnagg)		0,2µl
Enzympuffer		1,2µl
Wasser	0,6µl	
PCR-Produkt		12µl

G-Allel : 106 bp + 28 bp
A-Allel : 134 bp

Agarose-Gel: 2,5% Agarose mit Ethidiumbromid
Loading Buffer 2µl
Produkt 10µl
Spannung 120V
Laufzeit c.a. 2Std
DNA-Leiter 100 bp

Abbildung 10: Restriktionsverdau des PCR Produktes mit EconI

9.10 Bestimmung des IFN-γ 874 T/A Polymorphismus

Protokoll IFN-γ 874 T/A

PCR Zusammensetzung (pro Ansatz)

PCR-Puffer (10x)	3µl	
dNTP-Mix	3µl	
5` Primer	1µl	IFN-γ 874 F: cacaattgattttattcttacaacacaaaatcaagtc*
3´ Primer	1µl	IFN-γ 874 R: ctcgagttgtttcgactatgaggtttcc
DNA-Polymerase	0,15µl	
Destilliertes Wasser	18,5µl	
DNS	1,5µl	
Endvolumen: (30,0µl)	29,95µl	

*Austausch eines Basenpaares, sogenannter Mismatch an Position g

PCR Bedingungen:

Zyklus:	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Anfangsdenaturierung	94^0	10min	1
• Denaturierung	94^0	20sek	
• Primer-Annealing	60^0	20sek	40
• Extension	72^0	20sek	
Endextension	72^0	7min	1

Restriktionsverdau (pro Ansatz):

Restriktionsenzym: BsmA I (gtctcn-)	0,2µl	
Enzympuffer		1,0µl
Wasser	5,8µl	
PCR-Produkt		7,0µl

T-Allel : 269 bp + 40 bp
A-Allel : 309 bp

Agarose-Gel: 2% Low melting Agarose mit Ethidiumbromid
Loading Buffer 2µl
Produkt 10µl
Spannung 110V
Laufzeit c.a. 1,5Std
DNA-Leiter 100 bp

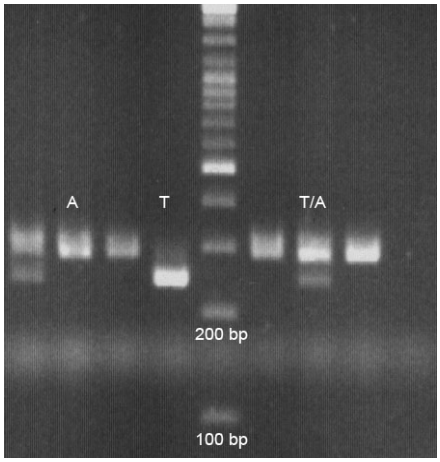


Abbildung 11: IFN γ: Restriktionsverdau des PCR Produktes mit Bsm AI.

9.11 Bestimmung des GM-CSF 677 C/A Polymorphismus

Die Bestimmung des GM-CSF 677 C/A Polymorphismus erfolgte nach dem folgenden Protokoll
Protokoll GM-CSF 677 C/A

PCR Zusammensetzung (pro Ansatz)

PCR-Puffer (10x)	3µl	
dNTP-Mix	5µl	
5` Primer	3µl	GM-CSF 677 F:agagggaatcaaggttcacataaccagagagg
3´ Primer	3µl	GM-CSF 677 R: gcagccactctcagcaagctccagag*
DNA-Polymerase	0,1µl	
Destilliertes Wasser	14,4µl	
DNS	1,5µl	
Endvolumen:	30,0µl	

*Austausch eines Basenpaares, sogenannter Mismatch an Position c

PCR Bedingungen:

Zyklus:	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Anfangsdenaturierung	95^0	15min	1
• Denaturierung	94^0	30sek	
• Primer-Annealing	62^0	30sek	35
• Extension	72^0	30sek	
Endextension	72^0	10min	1

Restriktionsverdau (pro Ansatz):

Restriktionsenzym: XcmI (ccaNNNNN-NNNNtgg)	0,2µl
Enzympuffer	1,2µl
Wasser	0,6µl
PCR-Produkt	12µl

C-Allel : 130 bp
A-Allel : 102 bp+ 28 bp

Agarose-Gel: 2% Agarose mit Ethidiumbromid
Loading Buffer 2µl
Produkt 10µl
Spannung 120V
Laufzeit c.a. 2Std
DNA-Leiter 100 bp

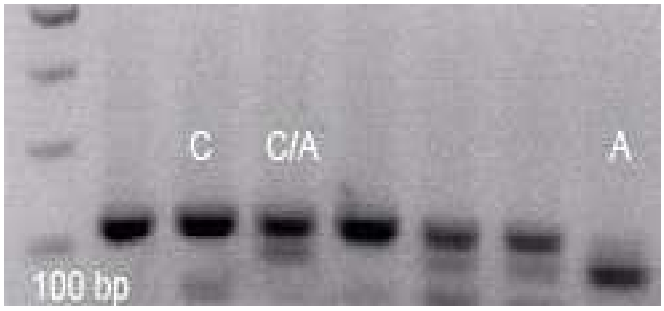


Abbildung 12: GM-CSF: Restriktionsverdau des PCR Produktes mit Xcml.

9.12 Bestimmung des VDR Bsm I Polymorphismus

Die Bestimmung des VDR Bsm I Polymorphismus erfolgte entsprechend der in der Literatur angegebenen Primer. Wir verwendeten zur Bestimmung des Genpolymorphismus folgendes Protokoll:

PCR Zusammensetzung (pro Ansatz)

PCR-Puffer (10x)	3µl	
dNTP-Mix	5µl	
5` Primer	3µl	VDR Bsm I F: caacaagactacaagtaccgcgtcagtga
3´ Primer	3µl	VDR Bsm I R: gcaactcctcatggctgaggttct
DNA-Polymerase	0,1µl	
Destilliertes Wasser	14,4µl	
DNS	1,5µl	
Endvolumen:	30,0µl	

PCR Bedingungen

Zyklus:	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Anfangsdenaturierung	95^0	15min	1
• Denaturierung	94^0	30sek	
• Primer-Annealing	57^0	30sek	30
• Extension	72^0	30sek	
Endextension	72^0	5min	1

Restriktionsverdau (pro Ansatz):

Restriktionsenzym: Bsm I (caatgcn-)	0,2µl	
Enzympuffer		1,2µl
Wasser	0,6µl	
PCR-Produkt		12µl

BB-Allel : 825 bp
bb-Allel : 650 bp+ 175 bp

Agarose-Gel: 2% Agarose mit Ethidiumbromid
Loading Buffer 2µl
Produkt 10µl
Spannung 100V
Laufzeit c.a. 1Std
DNA-Leiter 100 bp

Abbildung 13: Restriktionsverdau des PCR Produktes mit Bsm

10. Sequenzierung

10.1 Sequenzierung der PCR Produkte

Um die Validität unserer Methodik zu überprüfen, wurden alle Produkte der Polymerase-kettenreaktion (PCR) sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe der Primer (F-Primer, R-Primer, Prof. Dr. Peter Lohse, Klinikung Grosshadern, Institut f. klinische Chemie).

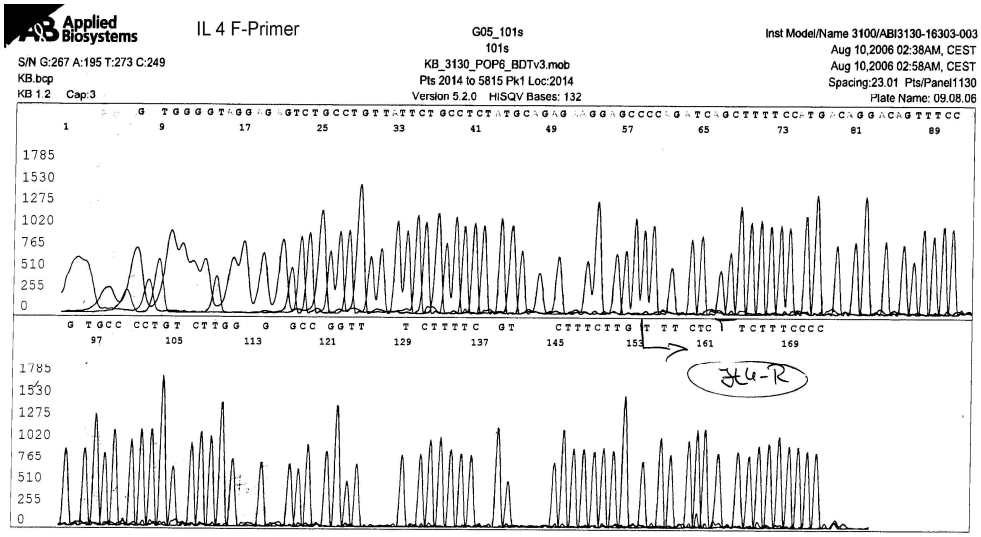


Abbildung 14: Sequenzierung des PCR Produktes für IL 4 -590 C/T unter Verwendung des F-Primes

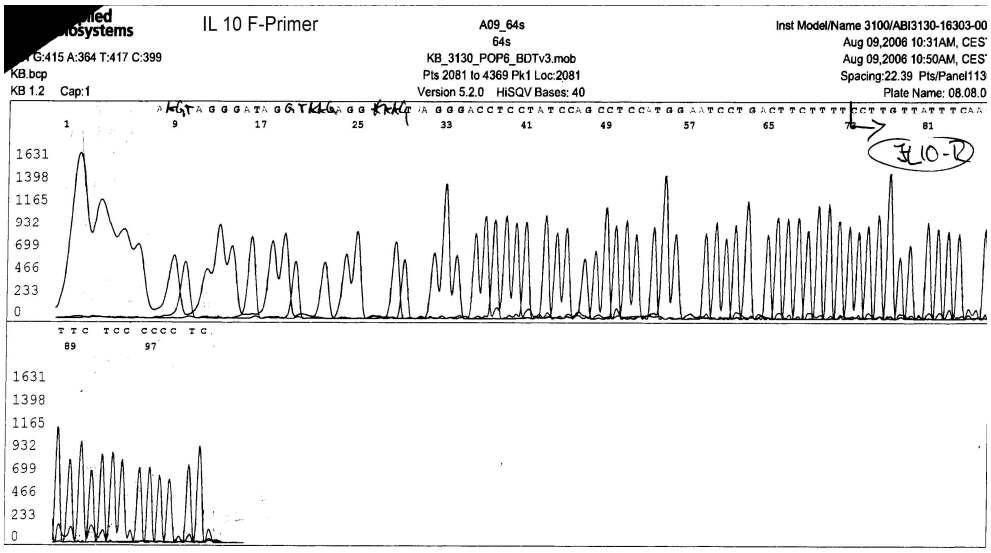


Abbildung 15: Sequenzierung des PCR Produktes für IL10 G/A unter Verwendung des F-Primes

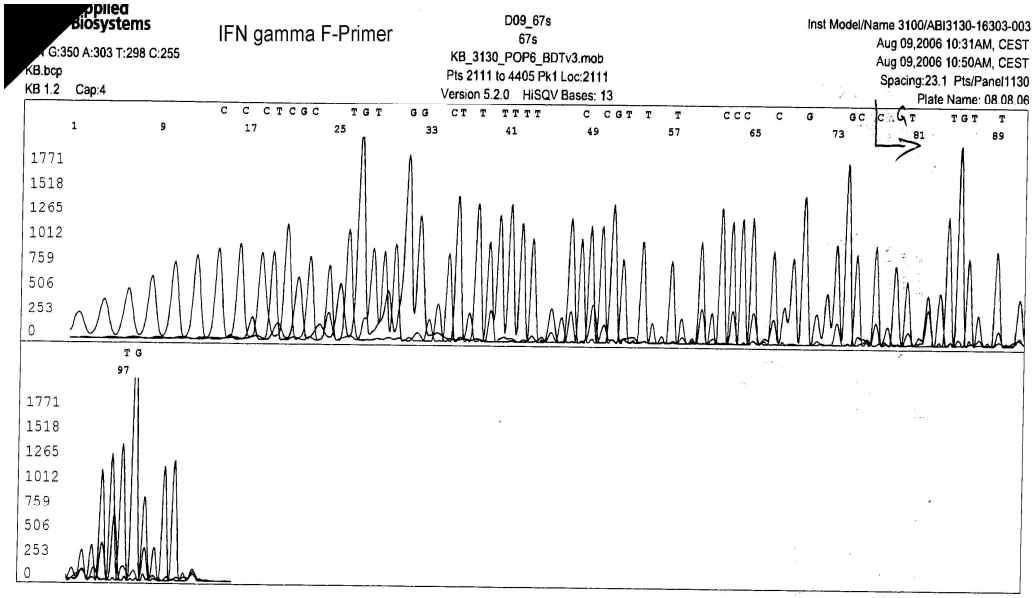


Abbildung 16: Sequenzierung des PCR Produktes für IFN γ 874 T/A unter Verwendung des F-Primes

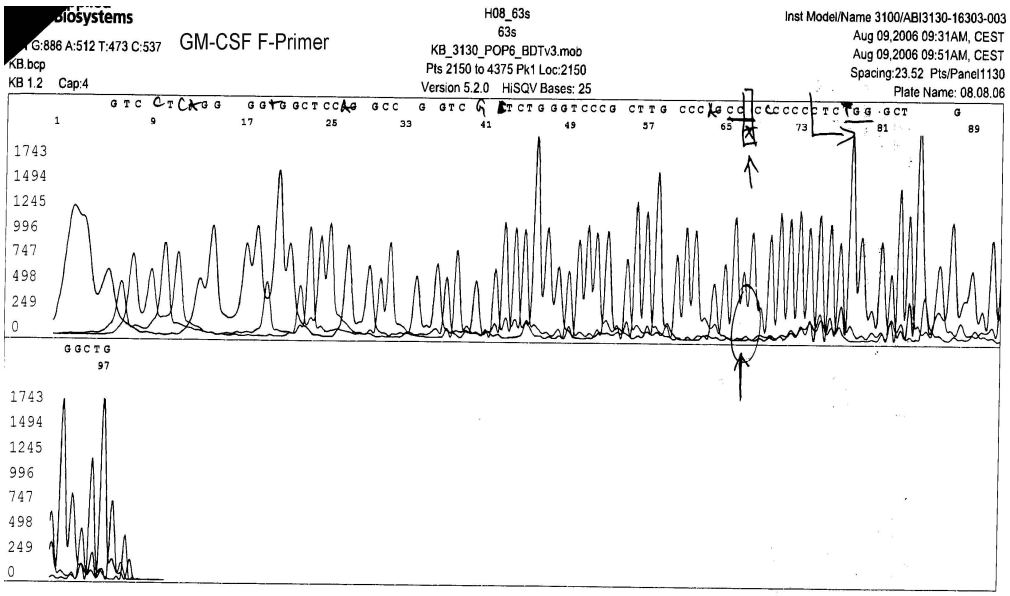
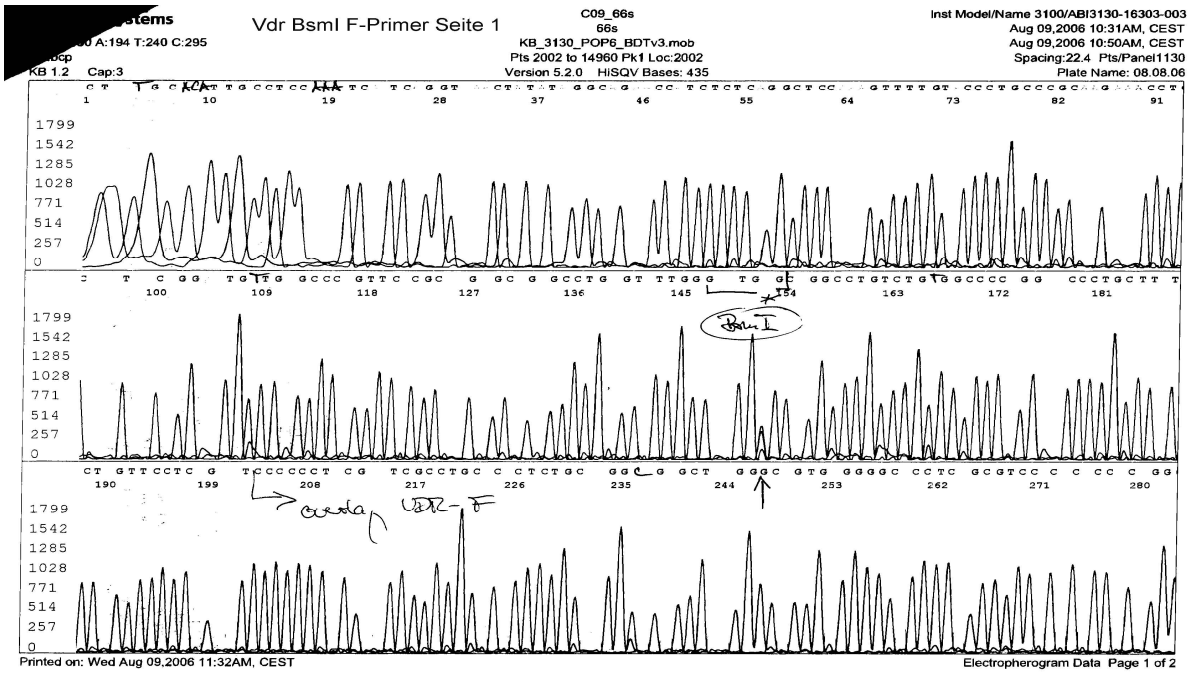


Abbildung 17: Sequenzierung des PCR Produktes für GM-CSF C/A unter Verwendung des F-Primes



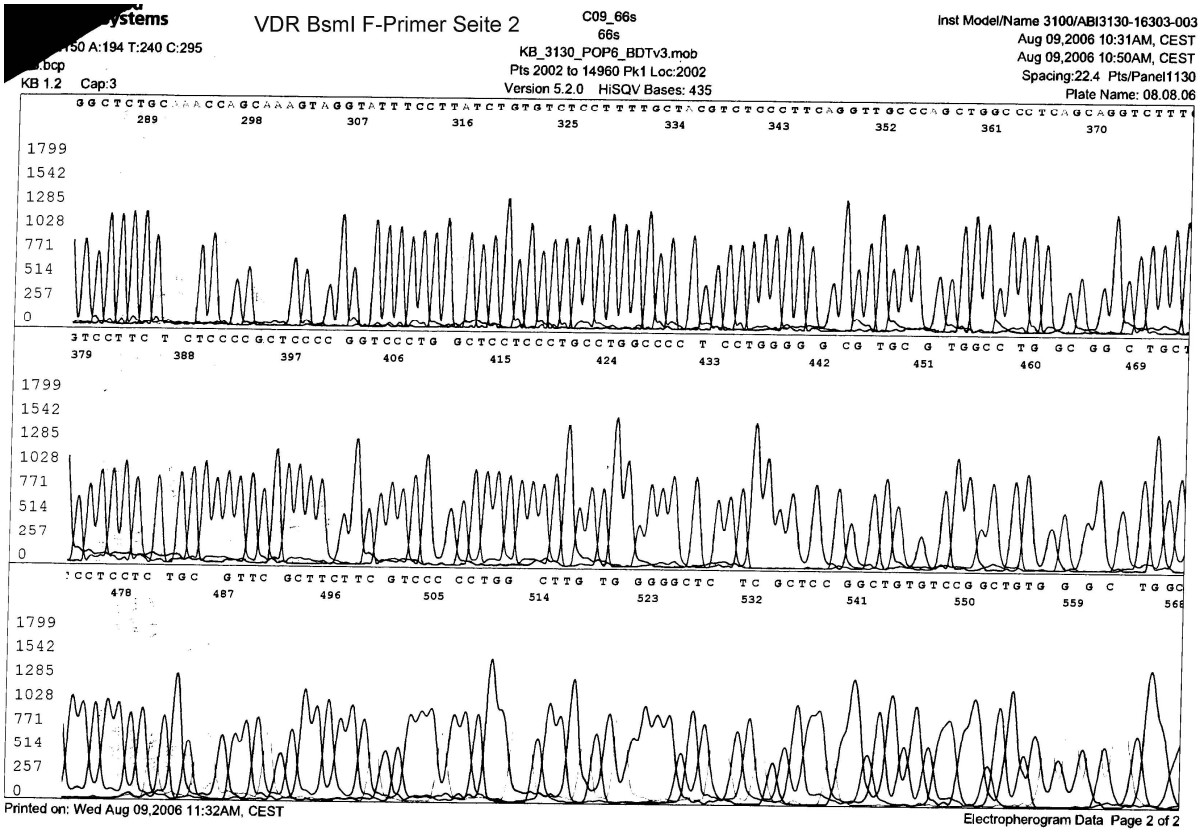


Abbildung 18: Sequenzierung des PCR Produktes für VDR-BsmI unter Verwendung des F-Primes. Aufgrund der Grösse des Produktes erfolgte die Sequenzierung sowohl vorwärts als auch rückwärts (F-Primer, R-Primer).

11. Statistische Berechnungen

Die statistischen Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Programms „SPSS Version Nr. 14.0“. Zur Anwendung kamen deskriptive Statistiken (Median, Mittelwert, Standardabweichung), Korrelationen (Korrelationskoeffizient nach Pearson), Regressionen, Kreuztabellen (Chi-Quadrat-Test) sowie nicht-parametrische Tests (Kruskal Wallis – H, Mann-Whitney-U, Wilcoxon). Der Kruskal Wallis – H Test, als „Vortest“ zur Überprüfung der Vorausetzungen für den Mann-Whitney Test, berücksichtigte den gleichzeitigen Vergleich mehrerer Gruppen (Normal- personen, Hämodialysepatienten, Niereninsuffiziente, Nierentransplantierte). Zum Vegleich zweier unabhängiger Proben wurde der Mann-Whitney – U Test angewendet. Unterschiede zwischen den vergleichenden Gruppen wurden anhand von Signifikanzen ermittelt. Als Signifikanzgrenze wurde $p \leq 0{,}05$ festgelegt.

12. Patientencharakteristika

12.1 Patienten nach Nierentransplantation

Von den analysierten 130 Nierentransplantierten waren 82 Männer und 48 Frauen. Die Grunderkrankungen, die zum Verlust der eigenen Nierenfunktion geführt haben, sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

Grunderkrankung	Anzahl		
Chronische GN	40	Pyelonephritis	5
Perimembranöse GN	1	Analgetikanephropathie	3
Mesangio prolif. GN	6	Schrumpfnieren unklarer Genese	12
Fokal sklerosierende GN	6	Nephrosklerose	10
Glomeruläre Angiosklerose	1	Alport Syndrom	3
IgA - Nephritis	9	Goodpasture Syndrom	1
Zystennieren (ADPKD)	14	Diabetische Nephropathie	4
Lupus Erythematodes	2	Nierenzell-Ca	2
Schönlein Henoch Nephritis	4	Tuberkulose	2
Interstitielle Nephritis	3	Agenesie	5
Refluxnephropathie	4	Maligne Hypertonie	1
		Unbek. Genese	7

Tabelle 3: Grunderkrankungen rekrutierten Nierentransplantierten u.U. Mehrfachnennungen.

12.2 Art des Transplantats (Kadaverniere, Lebendspende)

Von 130 untersuchten NTX Patienten erhielten 99 eine Kadaverniere (KN, postmortale NTX), wohingegen 31 Patienten eine Lebendspende (LN) eines unmittelbaren Angehörigen erhielten. In unserer Analyse wurden alle NTX-Patienten erfasst, unabhängig der Anzahl vorangegangener Transplantationen oder kombinierter Pankreas-Nierentransplantationen.

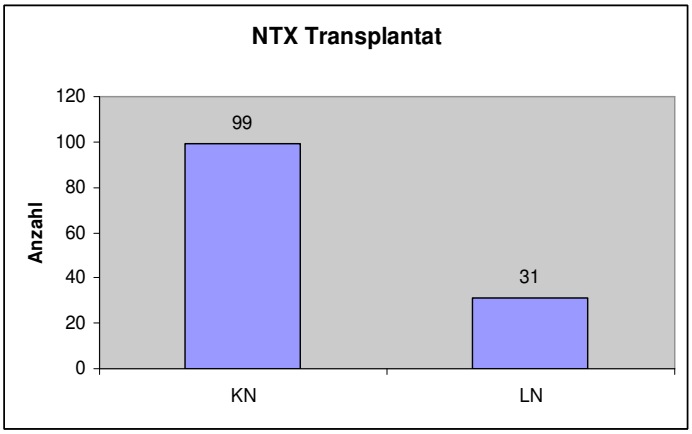


Tabelle 4: Verteilung der Organtransplantate (Herkunft = Kadaverniere KN 76%, Lebendspende LN 24%)

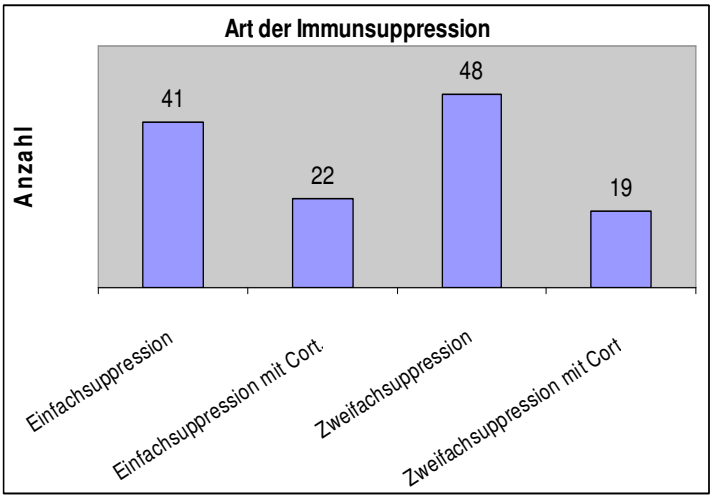
12.3 Art der Immunsuppression

Die zur Immunmodulation (Suppression) verwendeten immunsuppressiven Wirkstoffe umfassten Cyclosporin A (Cyclosporin), Mycophenolatmofetil (MMF), Tacrolimus (FK 506) und Azathioprin; Glukokortikoide kamen ebenso zur Anwendung.

Die Einteilung der Patienten erfolgte aufgrund der Anzahl verwendeter Immunsuppressiva. Vier Gruppen wurden unterschieden:

1.) Einfachimmunsuppression, 2.) Einfachimmunsuppression mit Glukokortikoiden, 3.) Zweifach Immunsuppression, 4.) Zweifachimmunsuppression mit Glukokortikoiden.

Insgesamt 41 NTX Patienten erhielten eine immunsuppressive Monotherapie MMF oder FK 506), 22 NTX Patienten zusammen mit einem Glukokortikoid. Daneben erhielten 48 NTX Patienten eine Zweifachimmunsuppression, 19 Patienten eine Mehrfachkombination aus zwei Immunsuppressiva und einem Glukokortikoid (Abb. in Tab. 5).



Art der Immunsuppression	Anzahl /Anteil
Einfachimmunsuppression	41 (32%)
Einfachimmunsuppression mit Cortison	22 (17%)
Zweifachimmunsuppression	48 (37%)
Zweifachimmunsuppression mit Cortison	19 (14%)

Tabelle 5: Verteilung der Immunsuppressiva

12.4 Klinische Ereignisse nach Nierentransplantation

Bei allen NTX-Patienten wurden verschiedenste klinische Ereignisse nach Transplantation erfasst. Die dokumentierten Ereignisse wurden in Gruppen geordnet zusammengefasst. Zur Auswertung wurden nicht nur klinische Ereignisse, die das Transplantat oder das Transplantatlager betrafen, aufgenommen, sondern auch allgemein schwere bzw. rezidivierende Infektionen und andere Komplikationen. Infektionen der Harnwege traten im Beobachtungszeitraum bei fast allen Patienten auf. Erfasst wurden hierbei schwere rezidivierende und therapieresistente Infektionen der ableitenden Harnwege und des Transplantates (Transplantatpyelonephritis). Analog wurden mehrfache Abstoßungsreaktionen des Transplantates protokolliert (Tabelle 6).

Klinische Ereignisse	**Anzahl**
Schwere rezidivierende Infekte der Harnwege	22
Schwere Infekte der Atemwege	7
Rezidivierende Infekte des Transplantatlagers / Lymphozelen	11
Infektionen des Transplantates	16
Mehrfache Abstoßungsreaktionen	8
CMV Erkrankung	8
Infarkte, Thrombosen	9
Nebenwirkungen durch Cortisontherapie	5

Tabelle 6: Ereignisse nach Transplantation

12.5 Begleiterkrankungen nach Nierentransplantation

Getrennt zu klinischen Ereignissen (d.h. Komplikationen), wurden die nach Transplantation aufgetretenen Begleiterkrankungen erfasst. Die arterielle Hypertonie war hierbei die häufigste Diagnose. Die antihypertensive Therapie erfolgte abhängig von bestehenden Nebendiagnosen.

Begleiterkrankung	Anzahl
Arterielle Hypertonie	76
Schilddrüsenerkrankungen	17
Hypercholesterinämie	16
Renale Anämie	12
Diabetes mellitus (Glukoseintoleranz)	9
Hepatitis C	4
Hepatitis B + D	2

Tabelle 7: Begleiterkrankungen nach NTX

12.6 Auswahlkriterien der NTX Patienten zur zellimmunologische Analyse

1) Stabile NT Funktion

In die Bestimmung der zellulären Expression CD14, CD16, HLA-DR, TLR 2 und TLR 4 aus Blutmonozyten wurden alle NTX-Patienten mit einem Transplantatüberleben von NTX > 14 Jahren einbezogen. Die monozytäre TLR 4 Expression wurde sowohl extrazellulär als auch intrazellulär (nach Inkubation mit membranperforierendem Medium) ermittelt.

2) Patienten mit chronischer Transplantatdysfunktion

Verglichen wurde obiges Kollektiv (stabile NTX Funktion) mit einer Untergruppe aller 130 NTX Patienten und eines Transplantatalters zwischen ein und 13 Jahren, die folgende Kriterien erfüllten:

- **Erhöhung** Serum-Kreatininkonzentration Medianwertes innerhalb eines Jahres von mehr als 0,3 mg/dl.
- Eine **Verdoppelung der Proteinurie**, d.h. der Albuminkonzentration (zwischen ersten und zweiten Halbjahr) innerhalb eines Jahres
- Eine **Verdoppelung der alpha-1-Mikroglobulin** Konzentration im Harn (zwischen ersten und zweiten Halbjahr) innerhalb eines Jahres.

Aufgrund dieser drei Parameter - unter Kenntnis weiterer Routinelaborparameter und des klinischen Allgemeinbildes- der Patienten (Gesamtblutbild, Urineiweißmuster), wurde eine Subpopulation im Stadium einer **Progredienz der chronischen Transplantadysfunktion** definiert (NTX< 14-instabil = NTX< 14 i). Die ermittelten klinischen Parameter des

Blutbildes und des Proteinausscheidungsmuster wurden bei allen NTX-Patienten, soweit möglich, über einen Zeitraum **von drei Jahren** aufgenommen. Insgesamt beobachteten wir die teilnehmenden Patienten über einen Zeitraum von insgesamt **vier** Jahren. Die zellimmunologischen Merkmale der NTX-Patienten wurden wie im Studiendesign beschrieben (s. Kap. 8.6, Seite 79) mit Hämodialysepatienten, Nierenisuffizienten und einer Kontrollgruppe gesunder Probanden verglichen.

12.7 Auswahlkriterien der NTX-Patienten zur molekular-genetischen Bestimmung

Die folgenden genetischen Polymorphismen in der langzeittransplantierten Gruppe (NTX > 14 J) und in der Gruppe mit instabiler Transplantatdysfunktion (NTX < 14 J) wurden untersucht: IL-4, IL-10, IFN γ, GM-CSF und des Vitamin D Rezeptors (VDR Bsm I Polymorphismus). Allen Patienten mit einem NTX > 14 Jahre wurde hierzu ein EDTA-Röhrchen Vollblut entnommen. Zum Vergleich wurde eine entsprechende Anzahl kurzzeittransplantierter Patienten mit einem Transplantat (Transplantatzeit) zwischen ein und neun Jahren und instabilen Transplantatverlauf aus der vorangegangenen immunologischen Untersuchung ausgesucht (Patienten mit chronischer Transplantatdysfunktion, Auswahlkriterien s. Kapitel 12.6).
Als ergänzende Vergleichsgruppe zur Validierung der Daten zu den IL-4 und IFN-γ-Polymorphismen diente ein Kontrollkollektiv aus 96 gesunden Probanden.
Die Häufigkeitsverteilung in unserer NTX-Studiengruppe entsprach der der IL- 4 und IFN-γ Polymorphismen unseres gesunden Probandenkollektivs. Durch Überprüfung der von uns etablierten PCR Methodik für die IL-4 und IFN-γ Polymorphismen mit gesunden Probanden, sowie durch Sequenzierung der PCR aller Produkte mit unter Zuhilfenahme der entsprechenden Primer, ließ sich u.a. die Methodik validieren. Diese Maßnahmen waren notwendig, da die Häufigkeit der beiden molekularbiologischen Polymorphismen (IL-4, IFN-γ) in unseren untersuchten Kollektiven mit der in der Literatur ermittelten Frequenz diskrepant war. Alle unsere Ergebnisse, erhoben im FACS Labor des Kuratoriums für Hämodialyse, im Labor der Poliklinik München in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. M. Fischereder und im Labor für klinische Chemie Klinikum Grosshadern in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. P. Lohse, wurden sorgfältig durch mehrfach wiederholte Anwendung unterschiedlicher Primer, Restriktionsenzyme und durch Sequenzierung der PCR-Produkte reproduziert und bestätigt.

13. Ergebnisse

13.1 Vergleich klinischer Merkmale und Labor-Routine Parametern innerhalb der NTX Patientenkollektive

Um eine mögliche Verschlechterung klinisch-chemischer Parameter im Zusammenhang mit zunehmenden Transplantatalter zu untersuchen, wurden u.a. CRP (S) mg/dl, Calcium (S) mg/dl, Krea (S) mg/dl, Harnstoff (S) mg/dl, Harnsäure (S) mg/dl, Alkalische-Phosphatase (S) U/L, Phosphat (S) mmol/l, Gesamteiweiß mg (U) / g Krea, Albumin mg (U) / g Krea und alpha1-Mikroglobulin mg (U) / g Krea Werte innerhalb der gleichen NTX-Gruppe untersucht und in Excel Tabellen dokumentiert. Entsprechend der vordefinierten klinisch-chemischen Kriterien in der Einstufung der Transplantate (stabiler, instabiler Status), aber auch aufgrund der Routine Blutparameter und des Eiweißausscheidungmusters, wurden die NTX-Patienten in zwei Subgruppen (guter Verlauf, schlechter Verlauf= instabile) unterteilt.

Klinisch-chemische Parameter für NTX Patienten mit stabiler Funktion (NTX > 14 Jahre) n=27
S= Serum, U= Urin
Tabelle 8

	CRP (S) mg/dl	Calcium (S) mM/l	Harnstoff (S) mg/dl	Krea (S) mg/dl	Harnsäure (S) mg/dl	Alk Phosphat (S) U/L	Phosphat (S) mM/l	Gesamteiweiß mg / g Krea (U)	Albumin mg/ g Krea(U)	a1 MG mg / g Krea(U)
Mittelwert	,434	2,30	86,90	1,97	6,59	82,36	1,13	407,05	322,60	48,65
Median	,30	2,33	77,00	1,54	6,55	74,00	1,10	185,50	74,00	16,00
Standardabw.	,186	,150	45,16	,891	1,07	29,03	,310	535,86	582,88	72,51

Klinisch-chemische Parameter für die Gesamtgruppe NTX 1- 4 Jahren Patienten n= 36
S= Serum, U=Urin
Tabelle 9

	CRP (S) mg/dl	Calcium (S) mM/l	Harnstoff (S) mg/dl	Krea (S) mg/dl	Harnsäure (S) mg/dl	Alk Phosphat (S) U/L	Phosphat (S) mM/l	Gesamteiweiß mg / g Krea (U)	Albumin mg/ g Krea(U)	a1 MG mg / g Krea(U)
Mittelwert	,50	2,27	57,69	1,48	6,70	83,22	1,06	125,68	42,27	19,17
Median	,35	2,28	58,50	1,46	6,87	76,00	1,10	92,00	20,70	18,50
Standardabw.	,296	,065	10,20	,425	1,56	43,40	,106	108,95	77,70	10,99

Klinisch-chemische Parameter für die Subgruppe NTX 1- 4 Jahren Patienten mit einer guten (stabile) NT Funktion n= 30
S= Serum, U=Urin
Tabelle 10

	CRP (S) mg/dl	Calcium (S) mM/l	Harnstoff (S) mg/dl	Krea (S) mg/dl	Harnsäure (S) mg/dl	Alk Phosphat (S) U/L	Phosphat (S) mM/l	Gesamteiweiß mg / g Krea (U)	Albumin mg/ g Krea(U)	a1 MG mg / g Krea(U)
Mittelwert	,447	2,32	57,78	1,46	6,71	65,11	1,04	149,97	50,98	25,02
Median	,30	2,31	58,50	1,43	6,87	66,00	1,05	95,80	20,70	14,00
Standardabw.	,245	,100	17,08	,388	1,25	45,31	,164	124,58	78,03	26,46

Klinisch-chemische Parameter für die Subgruppe NTX 1- 4 Jahren Patienten mit einer instabilen NT Funktion n= 6
S= Serum, U=Urin
Tabelle 11

	CRP (S) mg/dl	Calcium (S) mM/l	Harnstoff (S) mg/dl	Krea (S) mg/dl	Harnsäure (S) mg/dl	Alk Phosphat (S) U/L	Phosphat (S) mM/l	Gesamteiweiß mg / g Krea (U)	Albumin mg/ g Krea(U)	a1 MG mg / g Krea(U)
Mittelwert	,36	2,39	57,93	1,44	6,73	75,33	1,01	189,43	65,13	34,52
Median	,30	2,40	57,00	1,32	6,68	71,50	1,02	131,50	24,30	12,35
Standardabw.	,091	,103	25,59	,347	,545	14,34	,236	145,32	81,71	40,34

Klinisch-chemische Parameter für die Gesamtgruppe NTX 5- 8 Jahren Patienten n= 35
S= Serum, U=Urin
Tabelle 12

	CRP (S) mg/dl	Calcium (S) mM/l	Harnstoff (S) mg/dl	Krea (S) mg/dl	Harnsäure (S) mg/dl	Alk Phosphat (S) U/L	Phosphat (S) mM/l	Gesamteiweiß mg / g Krea (U)	Albumin mg/ g Krea(U)	a1 MG mg / g Krea(U)
Mittelwert	,359	2,32	70,56	1,74	6,32	74,13	,979	200,06	114,44	27,21
Median	,30	2,30	69,25	1,71	6,68	65,00	,975	111,25	21,25	16,50
Standardabw.	,150	,147	21,89	,581	2,02	48,33	,315	214,92	198,22	23,22

Klinisch-chemische Parameter für die Subgruppe NTX 5 - 8 Jahren Patienten mit einer guten (stabile) NT Funktion n= 27
S= Serum, U=Urin
Tabelle 13

	CRP (S) mg/dl	Calcium (S) mM/l	Harnstoff (S) mg/dl	Krea (S) mg/dl	Harnsäure (S) mg/dl	Alk Phosphat (S) U/L	Phosphat (S) mM/l	Gesamteiweiß mg / g Krea (U)	Albumin mg/ g Krea(U)	a1 MG mg / g Krea(U)
Mittelwert	,35	2,36	67,11	1,61	5,87	72,55	,908	99,70	26,69	20,62
Median	,30	2,32	65,50	1,58	6,39	67,00	,950	85,00	20,00	14,60
Standardabw.	,147	,141	20,04	,336	2,01	53,42	,302	51,05	21,35	18,51

Klinisch-chemische Parameter für die Subgruppe NTX 5 - 8 Jahren Patienten mit einer instabilen NT Funktion n= 8
S= Serum, U=Urin
Tabelle 14

	CRP (S) mg/dl	Calcium (S) mM/l	Harnstoff (S) mg/dl	Krea (S) mg/dl	Harnsäure (S) mg/dl	Alk Phosphat (S) U/L	Phosphat (S) mM/l	Gesamteiweiß mg / g Krea (U)	Albumin mg/ g Krea(U)	a1 MG mg / g Krea(U)
Mittelwert	,38	2,20	82,30	2,19	7,85	79,50	1,22	541,30	412,80	49,60
Median	,30	2,19	92,00	1,87	7,77	61,00	1,20	591,00	492,00	43,00
Standardabw.	,178	,093	26,23	,996	1,24	28,31	,249	209,14	245,92	25,49

Klinisch-chemische Parameter für die Gesamtgruppe NTX 9 - 13 Jahren Patienten n= 32
S= Serum, U=Urin
Tabelle 15

	CRP (S) mg/dl	Calcium (S) mM/l	Harnstoff (S) mg/dl	Krea (S) mg/dl	Harnsäure (S) mg/dl	Alk Phosphat (S) U/L	Phosphat (S) mM/l	Gesamteiweiß mg / g Krea (U)	Albumin mg/ g Krea(U)	a1 MG mg / g Krea(U)
Mittelwert	,53	2,24	74,80	1,94	6,60	59,80	1,07	331,25	234,50	24,62
Median	,30	2,28	62,00	1,51	6,65	67,50	1,00	107,00	25,00	13,00
Standardabw.	,634	,161	45,81	1,24	1,31	45,99	,386	641,65	578,97	32,29

Klinisch-chemische Parameter für die Subgruppe NTX 9 - 13 Jahren Patienten mit einer guten (stabile) NT Funktion n= 22
S= Serum, U=Urin
Tabelle 16

	CRP (S) mg/dl	Calcium (S) mM/l	Harnstoff (S) mg/dl	Krea (S) mg/dl	Harnsäure (S) mg/dl	Alk Phosphat (S) U/L	Phosphat (S) mM/l	Gesamteiweiß mg / g Krea (U)	Albumin mg/ g Krea(U)	a1 MG mg / g Krea(U)
Mittelwert	,42	2,28	55,31	1,44	6,27	57,75	1,06	130,53	47,78	15,52
Median	,30	2,28	51,50	1,38	6,51	67,25	1,00	91,30	17,75	12,87
Standardabw.	,217	,118	23,89	,408	1,24	32,34	,284	102,63	73,37	12,74

Klinisch-chemische Parameter für die Subgruppe NTX 9 - 13 Jahren Patienten mit einer instabilen NT Funktion n= 10
S= Serum, U=Urin
Tabelle 17

	CRP (S) mg/dl	Calcium (S) mM/l	Harnstoff (S) mg/dl	Krea (S) mg/dl	Harnsäure (S) mg/dl	Alk Phosphat (S) U/L	Phosphat (S) mM/l	Gesamteiweiß mg / g Krea (U)	Albumin mg/ g Krea(U)	a1 MG mg / g Krea(U)
Mittelwert	,77	2,17	119,35	3,10	7,38	64,50	1,10	790,10	661,3	45,42
Median	,30	2,14	103,	2,61	8,08	68,00	1,10	375,00	188,50	30,00
Standardabw.	1,11	,22	54,23	1,74	1,21	71,45	,58	1063,10	954,03	51,88

Serumkreatinin (S) mg / dl in verschiedenen Subgruppen der untersuchten Transplantierten.

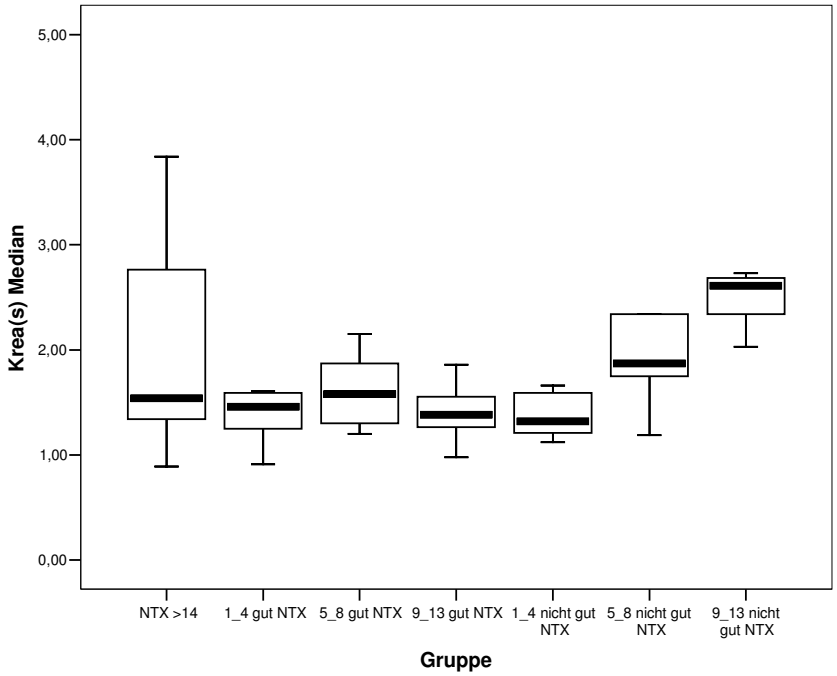


Abbildung 19a: Gegenüberstellung aller NTX-Patienten mit einer guten Organfunktion nach Transplantation. Erwartungsgemäß kommt es mit zunehmenden Transplantatalter zu einer Erhöhung des Kreatinin-Wertes im Serum („Creaping Creatinine“).

Serumkreatinin (S) mg / dl in verschiedenen Subgruppen der untersuchten Transplantierten. Gegenüberstellung NTX guter und instabiler Verlauf.

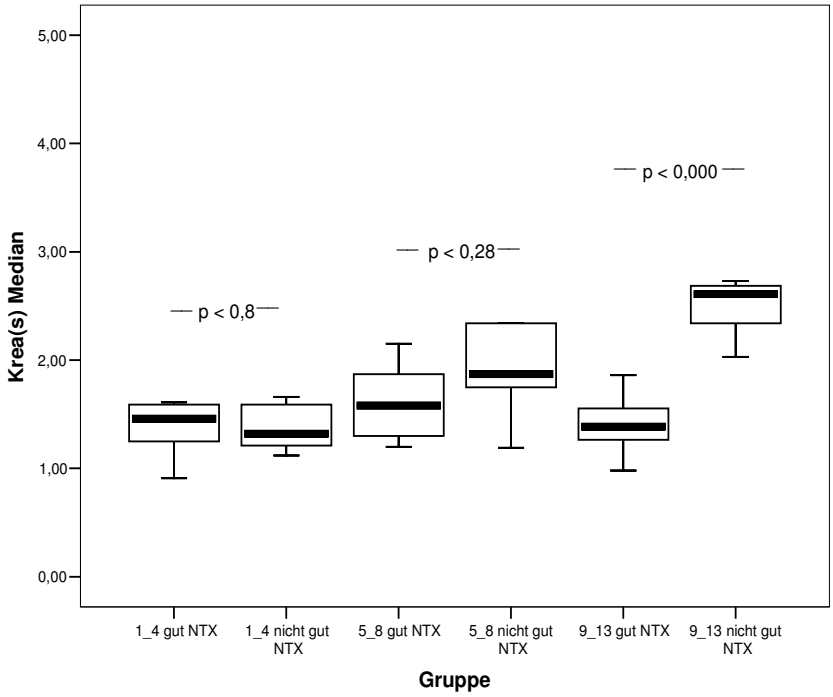


Abbildung 19b: Gegenüberstellung zwischen den NTX-Subpopulationen mit einem Transplantatalter zwischen ein und dreizehn Jahren (1-13 Jahre NTX) nach Organtransplantation, entsprechend der weiter oben aufgeführten Unterscheidungskriterien. In dieser Abbildung wurden die Langzeittransplantierten bewusst ausgelassen, da diese Gruppe insgesamt als eine sehr gute Subgruppe aufgrund des außerordentlichen Transplantatalters gilt. In den ersten Jahren nach Transplantation ist mit einer guten Organfunktion zu rechnen. Die chronische Transplantatdysfunktion scheint nach dem fünften Jahr nach NTX einzusetzen. Die Einteilung der NTX Patienten entsprechend der von uns festgelegten Kriterien macht den signifikanten Unterschied zwischen den Patienten mit einer guten Organfunktion und Patienten mit einer entwickelnden Transplantatdysfunktion deutlich.

Albumin-Ausscheidung im Urin (U) der verschiedenen Subgruppen untersuchter Transplantierter, getrennt nach stabilen und instabilen klinischen Verläufen.

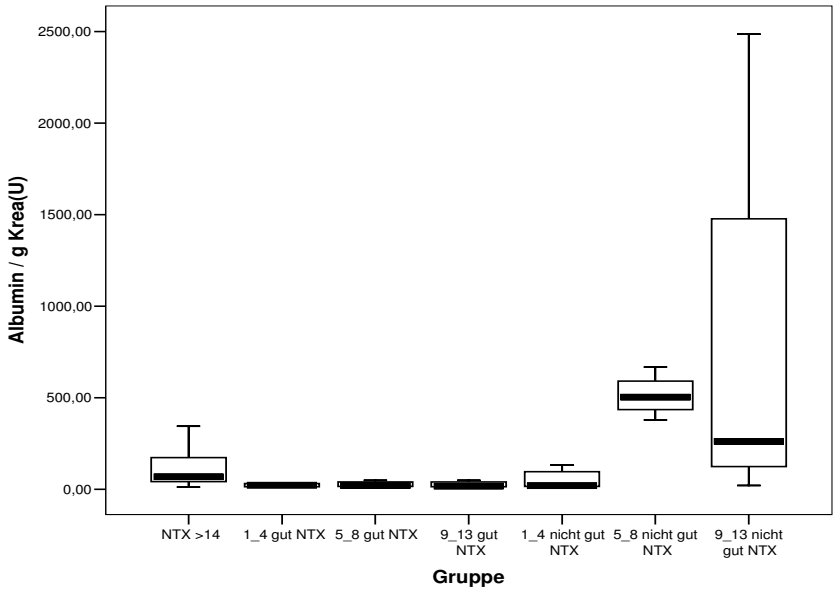


Abbildung 20a: Die Albuminausscheidung im Urin ist ein weiteres Einteilungskriterium zur Bestimmung der Organfunktion nach NTX. Ein niedriger Albumin-Wert im Urin ist bei Patienten mit einer guten Organfunktion zu erwarten. Die hohen Albuminwerte in den von definierten instabilen NTX Patienten reflektiert das hohe Risiko der Transplantatdysfunktion.

Albumin-Ausscheidung im Urin (U) der verschiedenen Subgruppen untersuchter Transplantierten, getrennt nach stabilen und instabilen klinischen Verläufen.

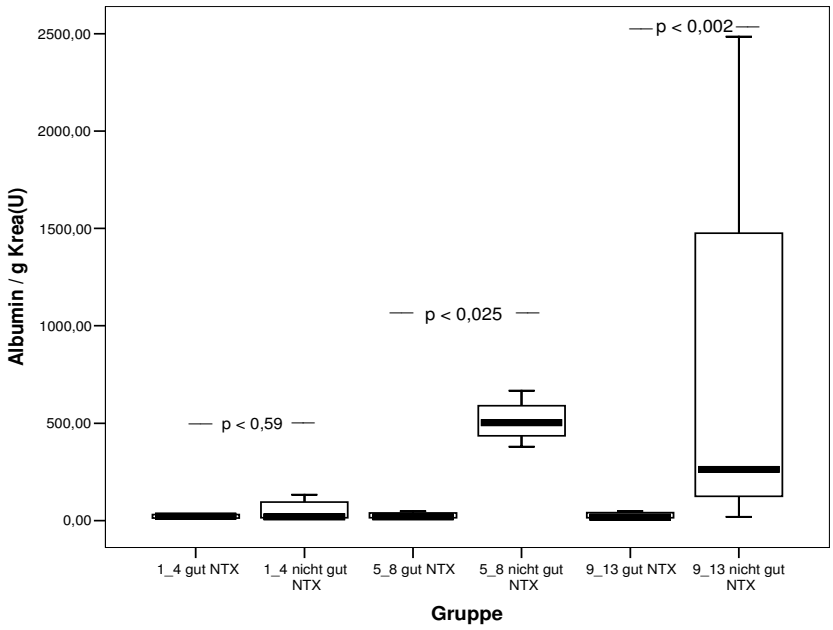


Abbildung 20b: Erst die differenzierte Betrachtung der Subgruppen macht die Progredienz der Albuminurie sichtbar. In der Patientengruppe mit einem TX-Alter von mehr als fünf Jahren kommt es zu einer beginnenden Dysfunktion.

alpha-1 Mikroglobulin im Urin (U) der verschiedenen Subgruppen untersuchter Transplantierter, getrennt nach stabilen und instabilen klinischen Verläufen.

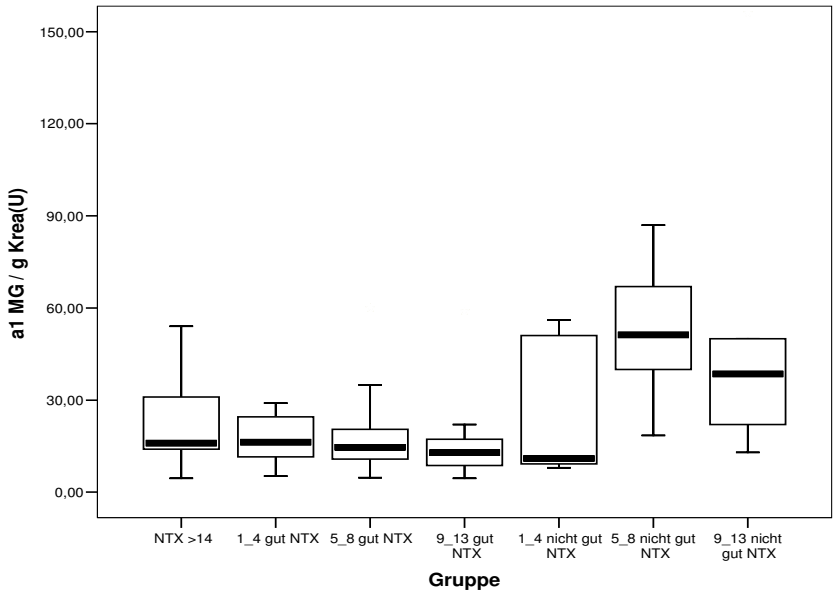


Abbildung 21a: Die alpha-1 Mikroglobulin Ausscheidung dient als ein Parameter für die Resorptionsleistung der Tubuli. Mit zunehmenden Transplantatalter lässt die tubuläre Proteinresorption zunehmend nach. Es lassen sich indirekt Rückschlüsse auf eine tubuläre Dysfunktion im Nierentransplantat ableiten.

alpha-1 Mikroglobulin im Urin (U) der verschiedenen Subgruppen untersuchter Transplantierter, getrennt nach stabilen und instabilen klinischen Verläufen.

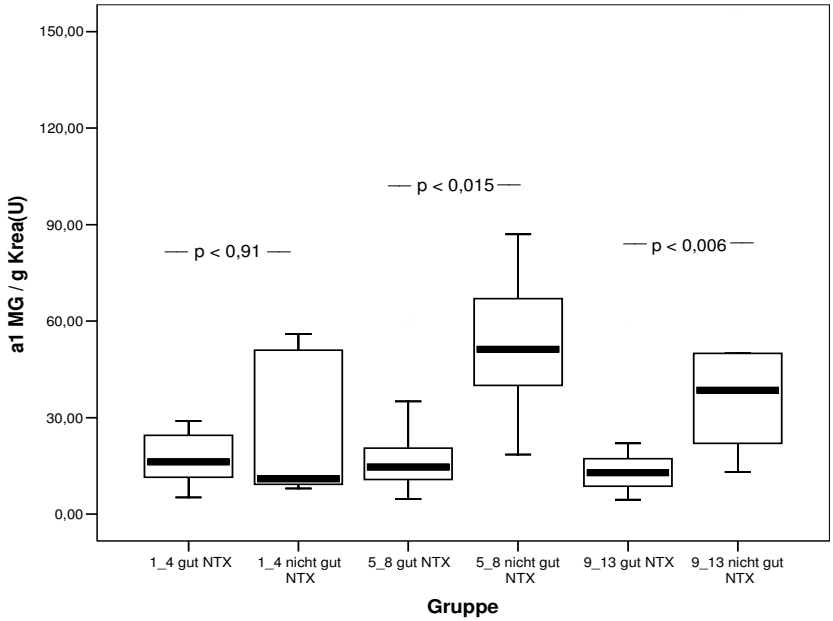


Abbildung 21b: Die genaue Betrachtung der Subgruppen lässt auf einen signifikanten Anstieg der alpha-1 Mikroglobulin im Urin (U) zwischen den NTX-Subgruppen schlussfolgern.

Serum-Calcium mMol / l in verschiedenen Subgruppen der untersuchten Transplantierten.

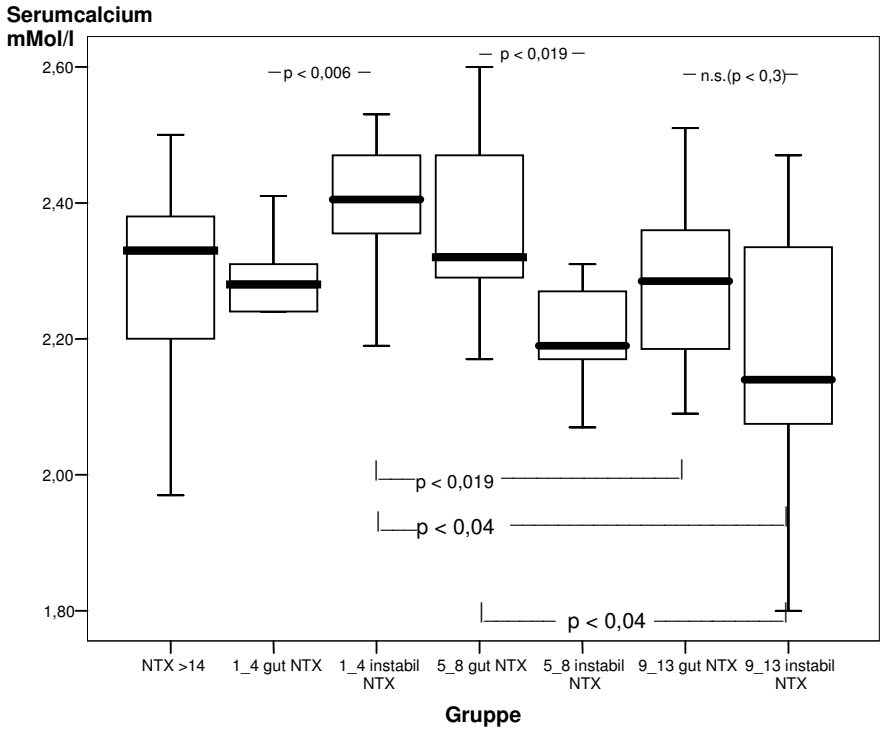


Abbildung 22a: Mit zunehmendem Transplantatalter nimmt das Serumcalcium ab. Von Interesse ist die ansteigende Konzentration in der Gruppe der kurzzeitig Transplantierten, die schon unmittelbar nach Transplantation an einer TX-Dysfunktion erkranken. Die Verschlechterung der Organfunktion mit ansteigendem Transplantatalter korreliert mit einer Abnahme der Calciumkonzentration im Serum.

Verlauf des Serum-Calcium mit zunehmendem Transplantatalter und Verschlechterung der NTX-Funktion.

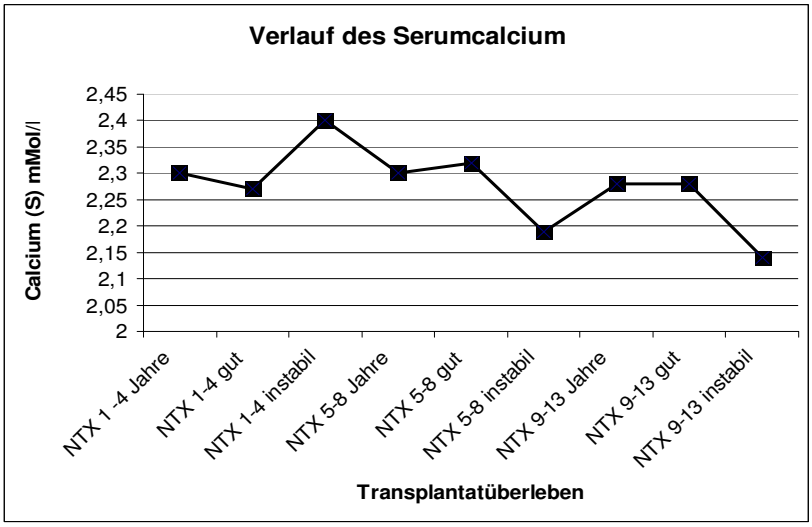


Abbildung 22b

13.2 Routine-Laborparameter (Serum) & Proteinurie Nierentransplantierter

Mann-Whitney Test für NTX > 14 Jahre guter Verlauf im Vergleich zur Untergruppe der NTX > 14 Jahre mit einem schlechten (instabilen) Verlauf

Tabelle 18:

	Krea (S)	Harnstoff (S)	Phosphat	Calcium (S)	CRP (S)	Ges-Eiweiß / g Krea (U)	Albumin (U) / g Krea	a1 MG (U) / g Krea
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,004	,004	,022	,515	,179	,271	,194	,031
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,001	,001	,018	,530	,221	,307	,221	,027

Auf Niveau p ≤ 0,05 signifikant

Vergleich klinischer-chemischer Parameter innerhalb des NTX > 14 Jahre Gruppe. Die Unterteilung erfolgte in NTX > 14 Jahre Patienten mit guten und NTX > 14 Jahre Patienten mit einem schlechten (instabilen) Verlauf. NTX Patienten mit instabilen Transplantatverlauf haben in der NTX > 14 Jahre Gruppe signifikant höhere Krea (S) (p ≤ 0,001), Harnstoff (S) (p ≤ 0,001), Phosphat (S) (p ≤ 0,018) und alpha1 Mikroglobulin (U) (p ≤ 0,027) Werte. Insgesamt wurde in unserer Studie die Gruppe aller NTX > 14 Jahre Patienten als eine Gesamtgruppe mit einem (sehr) guten Verlauf definiert.

Mann - Whitney Test für NTX 1-4 Jahre: Guter NT Verlauf im Vergleich zur Untergruppe der NTX 1-4 Jahre mit einem schlechten (instabilen) Verlauf

Tabelle 19:

	CRP (S)	Calcium (S)	Harnstoff (S)	Krea(s)	Harnsäure	Alk Phosphat	Phosphat	Ges-Eiweiß / g Krea (U)	Albumin / g Krea(U)	a1 MG / g Krea(U)
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,410	,008	,885	,772	,885	,725	,533	,294	,562	,885
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,456	,006	,916	,804	,916	,733	,547	,301	,595	,916

Auf Niveau p ≤ 0,05 signifikant

Vergleich zwischen den Subgruppen innerhalb des NTX 1-4 Jahre Kollektives. Unterteilt wurden die Patienten in NTX guter Verlauf und NTX schlechter (instabiler) Verlauf. Die statistische Auswertung nach Mann-Whitney zeigt in dieser Gruppe kaum Assoziationen auf. Dies liegt in der relativ guten Transplantatfunktion in den ersten Jahren nach Transplantation (Abb. 19a, Abb. 19b, Abb.20a, Abb.20b, Abb.21a, Abb. 21b).

Mann - Whitney Test für NTX 5-8 Jahre: Guter NT Verlauf im Vergleich zur Untergruppe der NTX 5-8 Jahre mit einem schlechten (instabilen) Verlauf

Tabelle 20:

	CRP (S)	Calcium (S)	Harnstoff (S)	Krea(s)	Harnsäure	Alk Phosphat	Phosphat	Ges-Eiweiß / g Krea (U)	Albumin / g Krea(U)	a1 MG / g Krea(U)
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,694	,021	,196	,272	,039	,349	,080	,001	,029	,017
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,780	,019	,218	,283	,040	,387	,091	,000	,025	,015

Auf Niveau p ≤ 0,05 signifikant

Vergleich innerhalb der NTX 5-8 Jahre Gruppe. In diesem Vergleich wird deutlich, dass die Anzahl der Blutparameter und der Eiweißausscheidung, die einen signifikanten Unterschied aufweisen, zugenommen hat. Es kommt deutlich zu einer Veränderung der Proteinurie in Bezug auf Gesamteiweiß, das Albumin und das alpha1 Mikroglobulin im Urin($p \leq 0{,}000$, $p \leq 0{,}025$, $p \leq 0{,}015$) innerhalb der Gruppe und zur Erhöhung des Anteils der NTX Patienten, die Merkmale einer chronischen Dysfunktion aufweisen (Abb. 20a, Abb.20b, Abb. 21a, Abb. 21b).

Mann - Whitney Test für NTX 9-13 Jahre: Guter NT Verlauf im Vergleich zur Untergruppe der NTX 9-13 Jahre mit einem schlechten (instabilen) Verlauf

Tabelle 21:

	CRP (S)	Calcium (S)	Harnstoff (S)	Krea(s)	Harnsäure	Alk Phosphat	Phosphat	Ges-Eiweiß / g Krea (U)	Albumin / g Krea(U)	a1 MG / g Krea(U)
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,790	,300	,001	,001	,053	,089	,119	,010	,004	,008
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,820	,308	,000	,000	,055	,102	,134	,008	,002	,006

Auf Niveau $p \leq 0{,}05$ signifikant

Auswertung nach Mann-Whitney innerhalb der NTX 9-13 Jahre Gruppe, Vergleich zwischen der Untergruppe der NTX 9-13 Jahre Patienten mit guter NT Funktion und der Untergruppe der NTX 9-13 Jahre Patienten mit instabiler NT Funktion. Der Anteil an signifikanten Unterschieden der Blutparameter und in der Proteinurie haben weiter zugenommen. Sowohl das Krea(S) ($p \leq 0{,}000$) als auch das Ges.Eiw. (U) ($p \leq 0{,}008$), Alb(U) ($p \leq 0{,}002$) und alpha1 Mikroglobulin(U) ($p \leq 0{,}006$) sind in der Untergruppe der NTX 9-13 Jahre Patienten deutlich angestiegen. Der Anteil der NTX-Patienten mit einer chronischen Dysfunktion ist angestiegen (Abb. 19b, Abb.20b, Abb.21b).

13.3 Vergleich klinischer Merkmale (Blutparameter, Proteinurie) NTX > 14 versus NTX 1- 4, 5-8, 9-13 J. Patientenkollektiven

Mann - Whitney Test für NTX > 14 Jahre im Vergleich zur Untergruppe der NTX 1-4 (Gesamtgruppe) Jahre

Tabelle 22:

	CRP (S)	Calcium (S)	Harnstoff (S)	Krea(s)	Harnsäure	Alk Phosphat	Phosphat	Ges-Eiweiß / g Krea (U)	Albumin / g Krea(U)	a1 MG / g Krea(U)
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,971	,834	,042	,131	,651	,547	,505	,007	,000	,225
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]						,551				

Auf dem Niveau $p \leq 0{,}05$ signifikant

Vergleich zwischen Patienten NTX > 14 Jahre mit NTX 1-4 Jahre. Unterschiede zwischen diesen beiden Kollektiven betreffen vorwiegend die Proteinausscheidung, u.a. Gesamteiweiß (U) ($p \leq 0{,}007$), Albumin (U) ($p \leq 0{,}000$) im Urin. Die Eiweißausscheidung und die Albuminausscheidung im Urin bei NTX > 14 Jahre Patienten ist höher im Vergleich zur Ausscheidung bei NTX 1-4 Jahre Patienten. Die fehlende Assoziation zwischen alpha1 Mikroglobulin der NTX > 14 Patienten und der Kurzzeittransplantierten deutet auf die noch nicht eingetretene interstitielle Fibrosierung des NT in der Gruppe der NTX > 14 Jahre hin. Eine chronische Dysfunktion hat sich in der NTX 1-4 Gruppe noch nicht etabliert.

Mann - Whitney Test für NTX > 14 im Vergleich zur Untergruppe der NTX 5-8 (Gesamtgruppe) Jahre

Tabelle 23:

	CRP (S)	Calcium (S)	Harnstoff (S)	Krea(s)	Harnsäure	Alk Phosphat	Phosphat	Ges-Eiweiß / g Krea (U)	Albumin / g Krea(U)	a1 MG / g Krea(U)
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,354	,991	,462	,654	,732	,537	,352	,059	,009	,869

Auf Niveau p ≤ 0,05 signifikant

Vergleich zwischen NTX > 14 und der NTX 5-8 Gruppe. Es zeigen sich relevante Unterschiede in der Proteinausscheidung. Die Eiweißausscheidung (p ≤ 0,059) der NTX > 14 Gruppe und des Albumins (U) (p ≤ 0,009) ist signifikant höher als in der NTX 5-8 Gruppe. Es ergeben sich aber noch keine Rückschlüsse auf die Transplantatfunktion aufgrund des undifferenzierten Vergleiches der Subgruppen (NTX> 14 Jahre – Gesamte NTX 5-8 Jahren).

Mann - Whitney Test für NTX > 14 im Vergleich zur Untergruppe der NTX 9-13 (Gesamtgruppe) Jahre

Tabelle 24:

	CRP (S)	Calcium (S)	Harnstoff (S)	Krea(s)	Harnsäure	Alk Phosphat	Phosphat	Ges-Eiweiß / g Krea (U)	Albumin / g Krea(U)	a1 MG / g Krea(U)
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,756	,200	,307	,726	,820	,795	,830	,150	,056	,224
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]						,808				

Auf Niveau p ≤ 0,05 signifikant

Mann-Whitney Test zwischen den NTX > 14 Jahre Patienten und NTX 9-13 Jahre Patienten. Es zeigen sich nur geringe Unterschiede zwischen beiden NTX-Gruppen. Die Werteverteilung zwischen beiden Kollektiven ähnelt sich. Der Grund dafür liegt im undifferenzierten Vergleich beider Gruppen. In der Gruppe der NTX 9-13 Jahre werden alle Patienten sowohl mit einer guten NT Funktion als auch NTX Patienten mit einer instabilen NT Funktion einbezogen.

Die Betrachtung der fünf NTX Gruppen miteinander, ohne jede weitere Unterteilung (stabil – instabil), lässt keine oder kaum Unterschiede erkennen. Ursache dafür ist die große Streubreite der Daten. Erst aus dem direkten Vergleichen zwischen der NTX > 14 Gruppe und den übrigen NTX-Gruppen (NTX stabil-instabil, 1-4, 5-8, 9-13), wird eine differenziertere Aussage über die Progression klinisch-chemischer Parameter möglich.

13.4 Vergleich klinisch-chemische Parameter : NTX 1- 4 „guter Verlauf“ versus NTX 5- 8 „schlechter“ Verlauf bei TX Patienten

Mann-Whitney-Test NTX 1-4 Jahre mit gutem Transplantatverlauf, im Vergleich zur Untergruppe der NTX 5-8 Jahre mit instabilen Transplantatverlauf

Tabelle 25:

	CRP (S)	Calcium (S)	Harnstoff (S)	Krea(s)	Harnsäure	Alk Phosphat	Phosphat	Ges-Eiweiß / g Krea (U)	Albumin / g Krea(U)	a1 MG / g Krea(U)
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,336	,143	,173	,095	,208	,827	,117	,000	,026	,014

Auf Niveau p ≤ 0,05 signifikant

Vergleich zwischen den NTX-Untergruppen. Der Mann-Whitney Test beider Gruppen NTX 1-4 guter (stabiler) Verlauf und NTX 5-8 schlechter (instabiler) Verlauf, der NT Funktion zeigt, eine signifikante Assoziation zwischen den Werten der Eiweißausscheidung im Urin. Die NTX-Patienten haben in der Gruppe 5-8 mit einem schlechten Verlauf signifikant höhere Albumin (U) ($p \leq 0{,}026$) und alpha1 Mikroglobulin (U) ($p \leq 0{,}014$) Konzentrationen und insgesamt höhere Werte in der Proteinausscheidung ($p \leq 0{,}000$). Deutlich wird die tendenzielle Verschlechterung des Krea(S) Wertes in der Patientengruppe von NTX 5-8 Jahren mit einem schlechten klinischen Verlauf ($p \leq 0{,}095$) erkennbar (Abb. 19b, Abb. 20b, Abb.21b).

Mann-Whitney-Test NTX 1-4 Jahre mit gutem Transplantatverlauf, im Vergleich zur Untergruppe der NTX 9-13 Jahre mit instabilen Transplantatverlauf

Tabelle 26:

	CRP (S)	Calcium (S)	Harnstoff (S)	Krea(s)	Harnsäure	Alk Phosphat	Phosphat	Ges-Eiweiß / g Krea (U)	Albumin / g Krea(U)	a1 MG / g Krea(U)
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,588	,351	,000	,000	,393	,343	,282	,022	,007	,036

Auf Niveau p ≤ 0,05 signifikant

Vergleich zwischen Patienten NTX 1-4 Jahre mit einem guten Verlauf und NTX 9-13 Patienten mit einem schlechten Verlauf der NT-Funktion. Der Anteil an Unterschieden, sowohl in klinisch-chemischen Parameter als auch in der Proteinausscheidung haben deutlich zugenommen. Die klinisch-chemischen Blutparameter der NTX 9-13 NTX Patienten mit schlechten Verlauf, weisen höhere Krea (S) ($p \leq 0{,}000$) und Hst (S) ($p \leq 0{,}000$) Werte auf. Bezüglich der Proteinurie zeigt das Gesamteiweiß (U), Albumin (U) und alpha1-Mikroglobulin(U) nach Mann-Whitney, eine signifikante Erhöhung dieser Werte in der Gruppe der NTX 9- 13 Jahre Patienten und einer instabilen NT Funktion auf ($p \leq 0{,}022$ $p \leq 0{,}007$, $p \leq 0{,}036$). Der Anteil an Patienten mit chronischer Dysfunktion innerhalb der NTX 9-13 Gruppe hat zugenommen (Abb. 19b, Abb. 20b, Abb. 21b).

13.5 Vergleich klinisch-chemischer Parameter: NTX 5-8 „guter Verlauf“ versus NTX 9-13 „schlechter“ Verlauf bei TX Patienten

Mann-Whitney-Test NTX 5-8 Jahre mit gutem Transplantatverlauf, im Vergleich zur Untergruppe der NTX 9-13 Jahre mit instabilen Transplantatverlauf

Tabelle 27:

	CRP (S)	Calcium (S)	Harnstoff (S)	Krea(s)	Harnsäure	Alk Phosphat	Phosphat	Ges-Eiweiß / g Krea (U)	Albumin / g Krea(U)	a1 MG / g Krea(U)
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,974	,040	,004	,000	,103	,412	,040	,006	,002	,083

Auf Niveau p ≤ 0,05 signifikant

Vergleicht man beide Subgruppen NTX 5-8 guter NT Funktion und NTX 9-13 Jahre instabiler NT Funktion (NTX 9-13 Jahre, schlechter Verlauf) lässt sich die Verschlechterung des Transplantates mit zunehmendem Transplantatalter erkennen. Auffällig ist die Veränderung des alpha1-Mikroglobulins (U) welche nicht signifikant ist. Die Funktion der Glomeruli ist in beiden Gruppen ähnlich vermindert. Die NTX 9-13 Patienten mit einer instabilen NT Funktion haben höhere Hst (S) (p ≤ 0,004), Phosphat (S) (p ≤ 0,04) und Krea (S) (p ≤ 0,000) Serumkonzentrationen. Ein ähnliches Bild zeigt sich im Eiweißausscheidungsmuster. Die Subgruppe instabiler NTX 9-13 Jahre (schlechter Verlauf) hat eine signifikant höhere Gesamteiweißausscheidung (p ≤ 0,006) und eine größere Albuminurie (p ≤ 0,002). Das Serumcalcium der NTX 5-8 Jahren Patienten ist gegenüber der NTX 9 -13 Jahre Patienten mit einer instabilen NT Funktion erhöht (p ≤ 0,040); instabile NT Funktion mit zunehmendem Transplantatalter und niedriges Serumcalcium korrelieren miteinander (Abb. 19a, Abb.19b, Abb. 20a, Abb. 20b, Abb.21a, Abb. 21b, Abb. 22a, Abb. 22b).

13.6 Klinische Progredienz Krea (S), Albumin (U) und alpha1-Mikroglobulin (U) bei Nierentransplantierten

Der **Wilcoxon Test**, als ein nichtparametrischer Test zweier abhängiger Proben, wurde bei den NTX < 14 Patienten mit einer instabilen NT Funktion durchgeführt, um die klinisch festgestellte Verschlechterung der von uns als Einteilungskriterium ausgesuchten Surrogatparameter Krea (S), Alb (U), alpha-1-Mikroglobulin (U)) darzustellen. Dadurch war es uns möglich die Validität der drei Einteilungskriterien, Krea (S) / Albumin (U) / alpha-1 Mikroglobulin (U) für die Untergruppeneinteilung (NT Patienten mit instabiler Transplantatfunktion) zu bestätigen. Ebenfalls wurde dieser Test für die NTX > 14 Jahre durchgeführt. Auch hier zeigte sich eine Veränderung der Krea (S), Alb (U) und alpha-1- Mikro-Globulin (U) Werte. Die in der Literatur bekannte tendenzielle Verschlechterung der Krea (S), Alb (U) und alpha-1-Mikroglobulin (U) Werte mit zunehmenden Transplantatalter ließ sich auch bei unseren Langzeittransplantierten belegen.

Wilcoxon-Test in der Gruppe der NTX > 14 Jahre für Krea (S), Alb (U), alpha 1Mikroglobuliun (U).

Tabelle 28:

	Krea(s) Median 2.Jahr - Krea(s) Median 1.Jahr	Albumin / g Krea(U) im 2.Jahr - Albumin / g Krea(U) im 1.Jahr	a1 MG / g Krea(U) im 2.Jahr - a1 MG / g Krea(U) im 1.Jahr
Z	-3,163	-3,276	-2,974
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,002	,001	,003

Auf Niveau p ≤ 0,05 signifikant

Signifikante Verschlechterung zwischen den von uns definierten Parametern Krea(S), Alb(U) und alpha1-Mikroglobulin (U). Im zeitlichen Verlauf eines Zeitraumes von zwei Jahren verschlechterte sich die Gruppe der NTX > 14 Jahre, darstellbar anhand der Krea (S), Alb (U) und a1MG (U) Werte. Der Wilcoxon Test zeigte die Progression der von uns definierten Parameter zur Feststellung einer Dysfunktion des Transplantates. Die Verschlechterung der Parameter in dieser Untergruppe lässt keine Rückschlüsse auf die Gesamtfunktion des Transplantates. Die klinische Beobachtung über die Jahre lässt in dieser NTX-Gruppe Langzeittransplantierter auf eine sehr gute Nierenfunktion schließen. Entsprechend liegt auch ein langes Transplantatüberleben vor (im Vergleich zu einem durchschnittlichen NT-Überleben von acht bis neun Jahre).

Wilcoxon-Test in der Gruppe der NTX < 14 Jahre instabil für Krea (S), Alb (U), alpha 1Mikroglobuliun (U).

Tabelle 29:

	Krea(s) Median 2.Jahr - Krea(s) Median 1.Jahr	Albumin / g Krea(U) im 2.Jahr - Albumin / g Krea(U) im 1.Jahr	a1 MG / g Krea(U) im 2.Jahr - a1 MG / g Krea(U) im 1.Jahr
Z	-2,272	-3,472	-2,086
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,023	,001	,037

Auf Niveau p ≤ 0,05 signifikant

Wilcoxon Test in der Gruppe der NTX < 14 Jahre Patienten mit instabiler NT Funktion. Der Wilcoxon Test bestätigt erwartungsgemäß die Progression der Krea (S), Alb(U) und alpha-1-Mikroglobulin(U) Werte innerhalb dieser Gruppe. Mithilfe des Wilcoxon Test untersuchten wir ausschließlich, ob die beobachtete Verschlechterung der Parameter mit den von uns gewählten klinischen Kriterien zur Einteilung in eine Untergruppe mit einer guten oder schlechten (instabilen) Transplantatfunktion übereinstimmte.

13.7 Analyse der Proteinurie

Der Zusammenhang zwischen den in dieser Studie als Kriterium festgesetzten Variablen Krea (S), Alb (U) und alpha1-Mikroglobulin (U) wurde über die Rangkorrelationsberechnung nach Spearman untersucht. Während die Rangkorrelationsberechnung (R_k) die Stärke des Zusammenhangs zwischen den untersuchenden Variablen feststellt, ermöglicht die Regressionsanalyse die Art des Zusammenhanges zwischen den Variablen zu erkennen (Zöffel P., Bühl A. 2005). Aus der Betrachtung der Korrelationen nach Spearman und der Regressionsanalyse wird eine lineare Beziehung zwischen den drei Variablen deutlich. Steigt die Kreatininkonzentration im Serum Nierentransplantierter an, ist ebenfalls ein Anstieg der beiden Parameter Albumin (U), alpha-1-Mikroglobulin (U) wahrscheinlich. In der Gruppe der Langzeittransplantierten (NTX > 14 Jahre) ist die Beziehung zwischen der Kreatininkonzentration im Serum und der alpha1-Mikroglobulin Ausscheidung im Urin (R_k 0,607, p ≤ 0,000, R_s 0,557) stärker als die Beziehung zwischen Kreatininkonzentration im Serum und Albuminurie (R_k 0,538, p ≤0,032, Rs 0,192) s.Tab.30, 30a, 30c Abb. 23a, 23b. In der Gruppe der NTX < 14 Jahre Patienten mit instabiler NT Funktion ist dagegen eine stärkere Beziehung zwischen dem Serumkreatinin und der Albuminurie zu erwarten (R_k 0,608, p ≤ 0,002, Rs 0,381) (s. Tab. 31, 31a, 31b Abb. 24a, 24b).

Rangkorrelationen nach Spearman: NTX > 14 Jahre Patienten für Kreatinin (S), Albumin (U) und alpha1-Mikroglobulin (U)

Tabelle 30: Tabellarische Übersicht der Rangkorrelation nach Spearman

			Krea(s) Median	Albumin / g Krea(U)	a1 MG / g Krea(U)
Spearman-Rho	Krea(s) Median	Korrelationskoeffizient	1,000	**,538**	**,607**
		Sig. (2-seitig)	.	**,007**	**,002**
	Albumin / g Krea(U)	Korrelationskoeffizient	**,538**	1,000	**,499**
		Sig. (2-seitig)	**,007**	.	**,011**
	a1 MG / g Krea(U)	Korrelationskoeffizient	**,607**	**,499**	1,000
		Sig. (2-seitig)	**,002**	**,011**	.

** Die Korrelation ist auf p ≤ 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).
* Die Korrelation ist auf p ≤ 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

Regressionsanalyse der Parameter Kreatinin (S) und Albumin (U) in der Gruppe der NTX > 14 Jahre Patienten

Tabelle 30a

	Signifikanz
Regression	**0,032**
Total N	24

Tabelle 30b

	Signifikanz
(Konstante)	0,401
Krea(s) Median	**0,032**

a Abhängige Variable: Albumin / g Krea(U)

Regressionsanalyse der Parameter Kreatinin (S) und alpha1- Mikroglobulin (U) in der Gruppe der NTX > 14 Jahre Patienten

Tabelle 30c

	Signifikanz
Regression	**0,000**
Total N	24

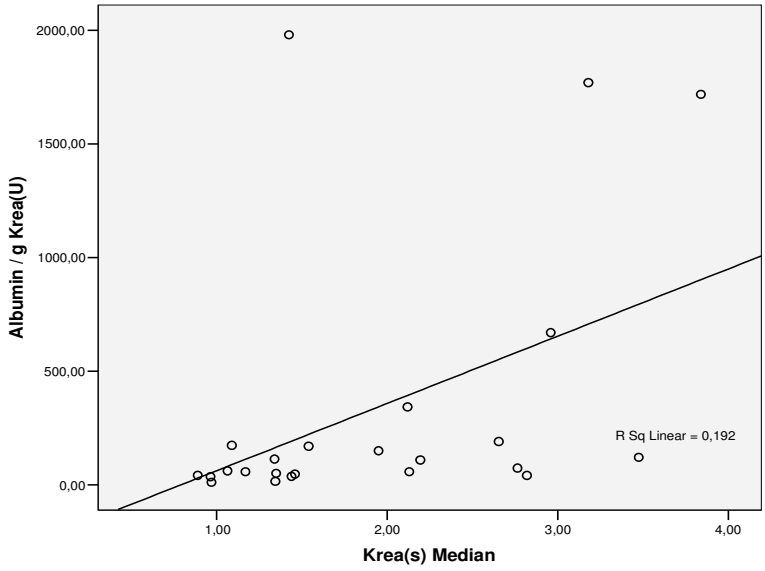
a Einflussvariablen : (Konstante), Krea(s) Median
b Abhängige Variable: a1 MG / g Krea(U)

Tabelle 30d

	Signifikanz
(Konstante)	0,011
Krea(s) Median	**0,000**

a Abhängige Variable: a1 MG / g Krea(U)

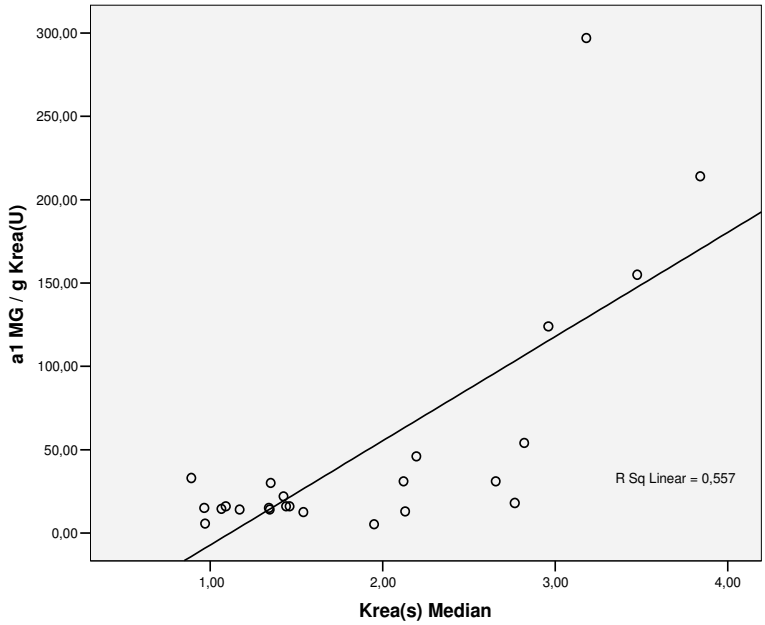
Diagramm der Regressionsanalyse der Parameter Kreatinin (S) und Albumin (U) in der Gruppe der NTX > 14 Jahre Patienten



Rs: 0,192, p ≤ 0,03

Abbildung 23a: Diagramm der Regressionsanalyse

Diagramm der Regressionsanalyse der Parameter Kreatinin (S) und alpha-1- Mikroglobulin (U) in der Gruppe der NTX > 14 Jahre Patienten



Rs: 0,557, p ≤ 0,000

Abbildung 23b: Diagramm der Regressionsanalyse

Rangkorrelationen nach Spearman NTX < 14 Jahre instabile (i) Patienten für Kreatinin (S), Albumin (U) und alpha-1-Mikroglobulin (U)

Tabelle 31: Tabellarische Übersicht der Rangkorrelation nach Spearman

			Krea(s) Median	Albumin / g Krea(U)	a1 MG / g Krea(U)
Spearman-Rho	Krea(s) Median	Korrelationskoeffizient	1,000	**,668**	**,514**
		Sig. (2-seitig)	.	**,001**	**,014**
	Albumin / g Krea(U)	Korrelationskoeffizient	**,668**	1,000	**,770**
		Sig. (2-seitig)	**,001**	**.**	**,000**
	a1 MG / g Krea(U)	Korrelationskoeffizient	**,514**	**,770**	1,000
		Sig. (2-seitig)	**,014**	**,000**	.

* Die Korrelation ist auf dem p ≤ 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).
** Die Korrelation ist auf dem p ≤ 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

Regressionsanalyse der Parameter Kreatinin (S) und Albumin (U) in der Gruppe der NTX < 14 Jahre Patienten mit instabiler NT Funktion

Tabelle 31a

	Signifikanz
Regression	**0,002**
Total N	21

a Einflussvariablen: (Konstante), Krea(s) Median
b Abhängige Variable: Alb (U) / g Krea(U)

Tabelle 31b

	Signifikanz
(Konstante)	0,667
Krea(s) Median	**0,002**

a Abhängige Variable: Alb (U) / g Krea(U)

Regressionsanalyse der Parameter Kreatinin (S) und alpha1-Mikroglobulin (U) in der Gruppe der NTX < 14 Jahre Patienten mit instabiler NT Funktion

Tabelle 31c

	Signifikanz
Regression	**0,111**
Gesamt	21

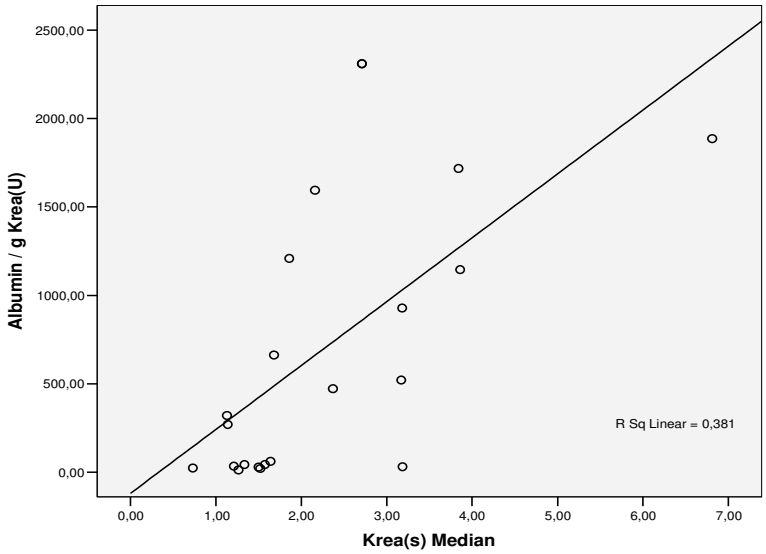
a Einflußvariablen: (Konstante), Krea(s) Median
b Abhängige Variable: a1MG (U) / g Krea(U)

Tabelle 31d

	Signifikanz
(Konstante)	0,289
Krea(s) Median	**0,111**

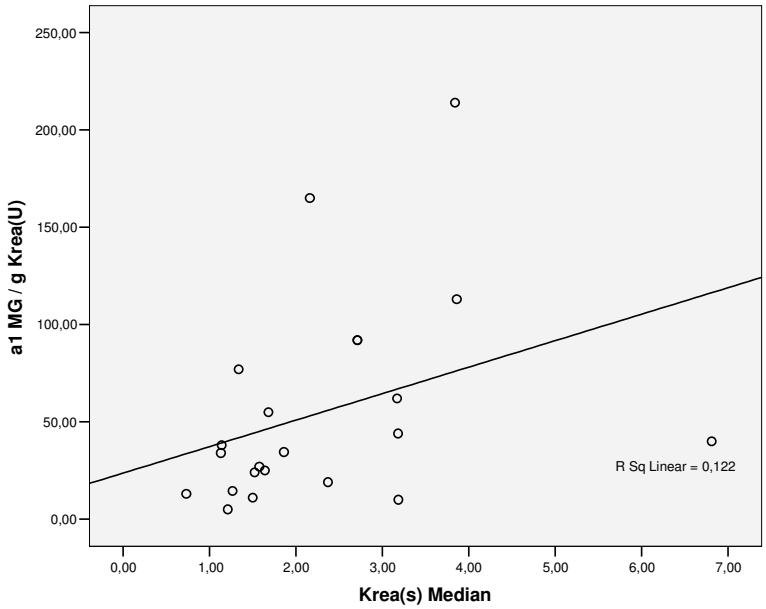
a Abhängige Variable: a1MG (U)/ g Krea(U)

Diagramm der Regressionsanalyse der Parameter Kreatinin (S) und Albumin (U) in der Gruppe der NTX < 14 Jahre Patienten mit instabiler NT Funktion



Rs: 0,381 p ≤ 0,002
Abbildung 24a: Diagramm der Regressionsanalyse

Diagramm der Regressionsanalyse der Parameter Kreatinin (S) und alpha-1- Mikroglobulin (U) in der Gruppe der NTX < 14 Jahre Patienten mit instabiler NT Funktion



Rs: 0,122, p ≤ 0,1

Abbildung 24b: Diagramm der Regressionsanalyse

13.8 Evaluierung des Transplantatüberlebens

Zur Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeiten innerhalb des Beobachtungszeitraumes, wurde die Überlebenszeit nach Kaplan-Meier kalkuliert. Als Ereignis wurde der komplette Funktionsverlust des Transplantates oder der Tod des Patienten innerhalb des Beobachtungszeitraumes festgesetzt. Innerhalb des beobachteten Zeitraumes von drei Jahren, traten insgesamt 14 Transplantatverluste Funktionsverluste im Gesamtkollektiv von 130 NTX Patienten auf. Von den insgesamt 14 Transplantatverlusten ereigneten sich 1 Fall in der NTX > 14 Jahren Population, 8 Fälle in der von uns immunologisch untersuchten NTX < 14 instabilen Population. Die übrigen 5 Fälle mit Funktionsverlust ereigneten sich in allen übrigen Gesamtpopulationen NTX< 14 Jahren (die NTX < 14 instabil ausgeschlossen aus dieser Berechnung, Details siehe Tab. 32 und Abb. 25 in Tab. 32). Durch die kleine Fallzahl an NTX Patienten ist jedoch die Aussagekraft der Evaluierung des Transplantatüberlebens im Zusammenhang zur immunsuppressiven Therapie sehr eingeschränkt, da diese vom aktuellen Zeitpunkt des klinischen Verlaufes des Patienten abhängig ist. Eine immunsupressive Therapie (Einfachtherapie oder Kombination) kann innerhalb eines kurzen Zeitraumes, je nach Patientenzustand mehrfach wechseln. Die Evaluierung des Transplantates in Zusammenhang zur immunsupressiven Therapie ist jedoch nicht Hauptpunkt der aktuellen Studie der Risikostratifizierung nach durchgeführter TX, sondern dient der Präsentation des aktuellen klinischen Bild der TX Patienten zum Zeitpunkt der Probenentnahme.

Tabelle 32: Anzahl der Transplantatverluste

	Anzahl der Transplantatverluste:
Population:	
NTX > 14 Jahren	1
NTX < 14 Jahren instabil	8
Restliche NTX 1-14 Jahre Patienten	5

Zusammenfassung der Fallverarbeitung

Total N	N of Events	Zensiert	
		N	Prozent
130	14	116	89,2%

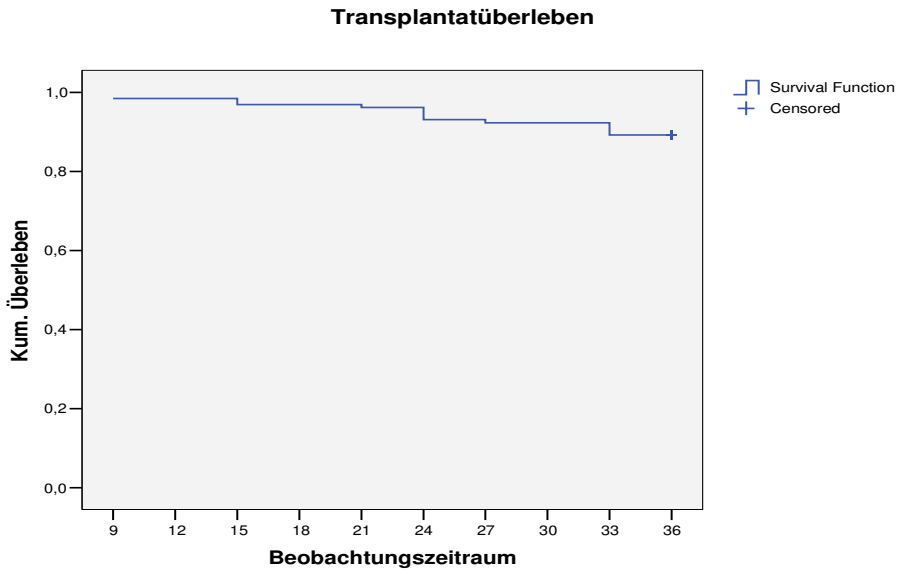


Abbildung 25 Transplantatüberleben nach Kaplan-Meier

13.9 Transplantatüberleben (Kaplan-Meier) NTX > 14 Jahre im Vergleich zur Untergruppe der NTX < 14 Jahre instabil

Tabelle 33

NTX	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert	
			N	Prozent
>14	26	1	25	88,0%
<14 i	24	8	16	70,8%
Gesamt	50	9	41	79,6%

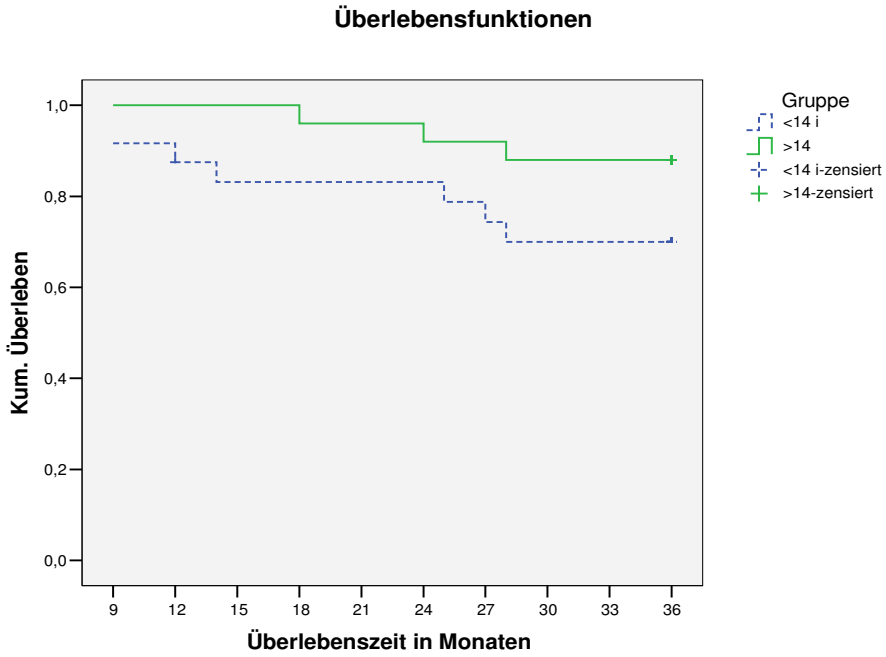


Abbildung 26: Abb. in Tab 33 In der Gruppe der NTX-Patienten mit einem instabilen Verlauf, ereigneten sich die meisten Transplantatverluste. Die Einteilung in diese Gruppe erfolgte über die weiter oben beschrieben Parameter (Krea (S), Alb (U), a1-MG (U)). Die Rückkehr in die Dialyse aufgrund der Einstellung der Organfunktion ereignete sich erst während des Beobachtungszeitraumes.

13.10 Transplantatüberleben im Zusammenhang mit der immunsuppressiven Medikation der NTX Patienten

Tabelle 34:

Medikation	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert	
			N	Prozent
Einfachtherapie	41	6	35	85,4%
Zweifachtherapie	48	4	44	91,7%
Einfachtherapie plus Cortison	22	1	21	95,5%
Zweifachtherapie plus Cortison	19	3	16	84,2%
Gesamt	130	14	116	89,2%

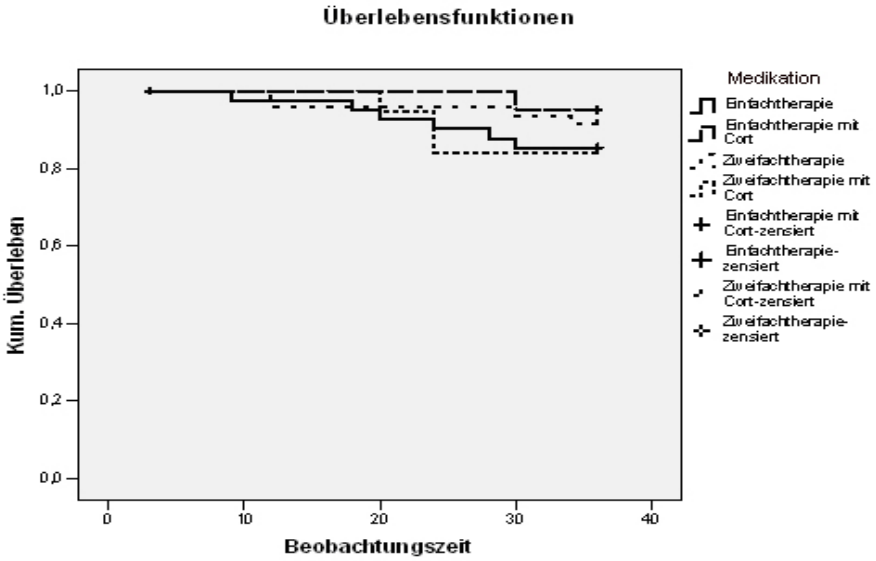


Abbildung 27: Abb in Tab 34 Das beste Transplantatüberleben zeigten während unserer Beobachtungszeit die Patienten die eine Kombination aus einem Immunsuppressivum und einem Glucocortikoid erhielten. Dagegen zeigten NTX Patienten mit einer Zweifachtherapie in Kombination mit einem Glucocortikoid ein geringeres Transplantatüberleben.

13.11 Transplantatüberleben (nach Kaplan-Meier) im Zusammenhang mit der immunsuppressiven Medikation NTX > 14 und NTX < 14 instabil Untergruppen, aufgrund der Häufigkeit von Transplantatverlusten in diesen beiden Gruppen.

Tabelle 35:

Medikation	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert	
			N	Prozent
Monotherapie	14	1	13	92,9%
Zweifachtherapie	13	3	10	76,9%
Monother.plus Cortison	10	3	7	70,0%
Zweifachter.plus Cortison	9	2	7	77,8%
Gesamt	46	9	37	80,4%

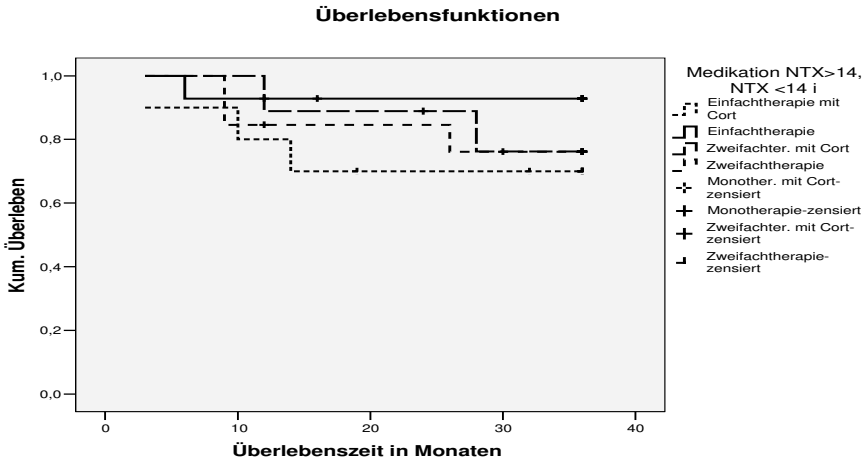


Abbildung28

13.12 CD14, HLA-DR, TLR 2, TLR 4 Expression Gesunde Probanden

Totale CD14 Expression und HLA DR Expression auf den Monozytensubsets CD14++, CD14++CD16+, CD14+CD16++ bei gesunden Probanden s. Abb. 29 S. 127, Abb. 30 S. 127, Abb. 31 S. 128, Abb. 32 S. 128

Tabelle 36

		Total CD14	HLA DR CD14++	HLA DR CD14++ 16+	HLA DR CD14+ 16++
N	Gültig	16	16	16	16
	Fehlend	0	0	0	0
Mittelwert **(RFC)**		486,28	829,93	5753,70	2605,71
Median **(RFC)**		453,16	798,92	5437,25	2414,51
Standardabweichung		99,41	287,55	1273,98	850,29

Intrazelluläre TLR 2 Expression auf den Monozytensubsets CD14++, CD14++CD16+, CD14+CD16++ bei gesunden Probanden s. Abb. 33 S. 129, Abb. 34 S. 129, Abb. 35 S. 130

Tabelle 37

		TLR2-CD14++	TLR2-CD14++ 16+	TLR2-CD 14+ 16++
N	Gültig	16	16	16
	Fehlend	0	0	0
Mittelwert **(RFC)**		47,39	106,16	68,03
Median **(RFC)**		44,13	100,06	64,36
Standardabweichung		20,15	21,32	16,14

Intrazelluläre TLR4 Expression auf den Monozytensubsets CD14++, CD14++CD16+, CD14+CD16++ bei gesunden Probanden s. Abb. 36 S. 130, Abb. 37 S.131, Abb. 38 S. 131

Tabelle 38

		TLR4-CD14++ iz	TLR4-CD14++ 16+	TLR4-CD 14+ 16++ iz
N	Gültig	16	16	16
	Fehlend	0	0	0
Mittelwert **(RFC)**		23,18	21,71	18,09
Median **(RFC)**		20,72	15,26	11,40
Standardabweichung		10,62	16,28	17,90

13.13 CD14, HLA-DR, TLR 2, TLR 4 Expression Niereninsuffiziente (NI) Patienten

Totale CD14 und HLA DR Expression auf den Monozytensubsets CD14++, HLA DR auf CD14++CD16+, HLA DR auf CD14+CD16++ bei Patienten mit Niereninsuffizienz s. Abb. 29 S. 127, Abb. 30 S. 127, Abb. 31 S. 128, Abb 32. S. 128

Tabelle 39

		Total CD14 expr	HLA DR CD14++	HLA DR CD14++ 16+	HLA DR CD 14+ 16++
N	Gültig	90	89	89	89
	Fehlend	0	1	1	1
Mittelwert **(RFC)**		418,57	541,51	4375,49	2238,00
Median **(RFC)**		404,97	482,61	4216,97	2297,88
Standardabweichung		128,12	315,80	2030,34	1308,59

Intrazelluläre TLR 2 Expression auf den Monozytensubsets CD14++, CD14++/16+, CD14+/CD16++ bei NI Patienten s. Abb. 33 S. 129, Abb. 34 S. 129, Abb. 35 S. 130

Tabelle 40

		TLR2-CD14++	TLR2-CD14++ 16+	TLR2-CD 14+ 16++
N	Gültig	89	89	89
	Fehlend	1	1	1
Mittelwert **(RFC)**		37,43	98,48	66,53
Median **(RFC)**		31,62	88,17	58,82
Standardabweichung		20,93	52,11	42,31

IntrazelluläreTLR 4 auf den Subsets CD 14++, CD 14++CD16+, CDCD14+16++ bei NI Patienten Abb. 36 S. 130, Abb. 37 S. 131, Abb. 38 S. 131

Tabelle 41

		TLR4-CD14++ iz	TLR4-CD14++ 16+	TLR4-CD 14+ 16++ iz
N	Gültig	89	89	89
	Fehlend	1	1	1
Mittelwert **(RFC)**		25,95	21,19	13,96
Median **(RFC)**		20,17	16,40	12,08
Standardabweichung		19,66	19,42	11,79

13.14 CD 14, HLA-DR, TLR 2, TLR 4 Expression Hämodialyse (HD) Patienten

Totale CD14 und HLA DR Expression auf den Monozytensubsets CD14++, CD14++CD16+, CD14+CD16++ bei Hämodialysepatienten s. Abb. 29 S. 127, Abb. 30 S. 127, Abb. 31 S. 128, Abb. 32 S. 128

Tabelle 42

		Total CD14	HLA DR CD14++	HLA DR CD14++ 16+	HLA DR CD14+ 16++
N	Gültig	49	49	49	49
	Fehlend	0	0	0	0
Mittelwert **(RFC)**		449,30	635,04	4888,14	2244,46
Median **(RFC)**		437,14	667,14	5186,13	2246,79
Standardabweichung		93,67	281,37	1774,85	781,11

Intrazelluläre TLR 2 Expression auf den Monozytensubsets CD14++, CD14++CD16+, CD14+CD16++ bei Hämodialysepatienten s. Abb. 33 S. 129, Abb. 34 S. 129, Abb. 35 S. 130

Tabelle 43

		TLR2-CD14++	TLR2-CD14/16+	TLR2-CD16++
N	Gültig	41	41	41
	Fehlend	8	8	8
Mittelwert **(RFC)**		34,75	95,97	76,51
Median **(RFC)**		34,29	91,40	71,69
Standardabweichung		10,33	24,70	23,06

Intrazelluläre TLR 4 auf den Monozytensubsets CD 14++, CD 14++CD16+, CD14+CD16++ bei Hämodialysepatienten s. Abb. 36 S. 130, Abb. 37 S. 131, Abb. 38 S. 131

Tabelle 44

		TLR4-CD14++ iz	TLR4-CD14/16+	TLR4-CD16++ iz
N	Gültig	49	49	49
	Fehlend	0	0	0
Mittelwert **(RFC)**		30,29	32,94	32,01
Median **(RFC)**		24,58	23,29	20,91
Standardabweichung		18,76	25,86	28,00

13.15 CD14, HLA-DR, TLR 2, TLR 4 iz/ez Expression NTX > 14 Jahre

Totale CD14 und HLA DR Expression auf den Monozytensubsets CD14++, CD14++CD16+, CD14+CD16++ bei NTX >14 Jahre Patienten s. Abb. 29 S. 127, Abb. 30 S. 127, Abb. 31 S. 128

Tabelle 45

		Total CD14	HLA DR CD14++	HLA DR CD14++ 16	HLA DR CD 14+ 16++
N	Gültig	26	26	26	26
	Fehlend	0	0	0	0
Mittelwert **(RFC)**		378,23	503,73	4247,25	2328,02
Median **(RFC)**		368,47	480,45	4132,74	2167,39
Standardabweichung		103,20	242,16	1552,43	1184,83

Intrazelluläre TLR 2 Expression auf den Monozytensubsets CD14++, CD14++CD16+, CD14+CD16++ bei NTX >14 Jahre Patienten s. Abb. 33 S. 129, Abb. 34 S. 129, Abb. 35 S. 130

Tabelle 46

		TLR2-CD14++	TLR2-CD14++/16+	TLR2-CD 14+/16++
N	Gültig	26	26	26
	Fehlend	0	0	0
Mittelwert **(RFC)**		39,83	94,11	64,61
Median **(RFC)**		32,50	86,9	63,06
Standardabweichung		23,99	36,23	25,40

Extrazelluläre TLR 4 auf den Subsets CD14++, CD14++CD16+, CD16++ bei NTX>14 Jahre Patienten s. Abb. 39 S. 132, Abb. 40 S. 132, Abb. 41 S. 133

Tabelle 47

		TLR4-CD14++ ez	TLR4-CD14++ 16+ ez	TLR4-CD 14+/16++ ez
N	Gültig	18	18	18
	Fehlend	8	8	8
Mittelwert **(RFC)**		17,97	27,52	9,82
Median **(RFC)**		11,25	25,60	9,76
Standardabweichung		14,51	16,94	8,32

Intrazelluläre TLR 4 auf den Monozytensubsets CD14++, CD14++CD16+, CD14+CD16++ bei NTX>14 Jahre Patienten s. Abb. 36 S. 130, Abb. 37 S. 131, Abb. 38 S. 131

Tabelle 48

		TLR4-CD14++ iz	TLR4-CD14/16+	TLR4-CD16++ iz
N	Gültig	26	26	26
	Fehlend	0	0	0
Mittelwert **(RFC)**		24,30	19,95	14,37
Median **(RFC)**		19,72	14,80	9,89
Standardabweichung		11,21	11,51	11,93

13.16 CD 14, HLA-DR, TLR 2, TLR 4 iz/ez Expression NTX < 14 instabil (i) Jahre

Totale CD14 und HLA DR Expression auf den Monozytensubsets CD14++, CD14++16+, CD14+16++ bei NTX <14 i (instabil) Jahre Patienten s. Abb 29 S. 127, Abb. 30 S 127, Abb. 31 Seite 128, Abb. 32 S. 128

Tabelle 49

		Total CD14	HLA DR CD14++	HLA DR CD14++ 16	HLA DR CD 14+ 16++
N	Gültig	24	24	24	24
	Fehlend	0	0	0	0
Mittelwert **(RFC)**		377,84	620,54	4305,50	2654,50
Median **(RFC)**		357,05	594,86	3962,21	2044,49
Standardabweichung		72,87	237,32	1887,53	1703,73

Intrazelluläre TLR 2 Expression auf den Monozytensubsets CD14++, CD14++CD16+, CD14+/CD16++ bei NTX <14 i (instabil) Jahre Patienten s. Abb. 33 S. 129, Abb. 34 S. 129, Abb. 35 S. 130

Tabelle 50

		TLR2-CD14++	TLR2-CD14++ 16+	TLR2-CD 14+ 16++
N	Gültig	24	24	24
	Fehlend	0	0	0
Mittelwert **(RFC)**		43,40	99,58	67,22
Median **(RFC)**		38,89	97,82	66,26
Standardabweichung		18,20	21,62	23,76

Extrazelluläre TLR 4 auf den Monozytensubsets CD14++, CD14++CD16+, CD14+CD16++ bei NTX <14 i (instabil) Jahre Patienten s. Abb. 39 S. 132, Abb. 40 S. 132, Abb. 41 S. 133

Tabelle 51

		TLR4-CD14++ ez	TLR4-CD14++ 16+ ez	TLR4-CD 14+ 16++ ez
N	Gültig	16	16	16
	Fehlend	8	8	8
Mittelwert **(RFC)**		18,16	27,98	14,85
Median **(RFC)**		13,83	27,63	14,55
Standardabweichung		11,94	12,65	7,83

IntrazelluläreTLR 4 auf den Monozytensubsets CD14++, CD14++CD16+, CD14+CD16++ bei NTX<14 i (instabil) Jahre Patienten s. Abb. 36 S. 130, Abb. 37 S.131, Abb. 38 S. 131

Tabelle 52

		TLR4-CD14++ iz	TLR4-CD14++ 16+	TLR4-CD 14+ 16++
N	Gültig	23	23	23
	Fehlend	1	1	1
Mittelwert **(RFC)**		29,13	28,67	24,06
Median **(RFC)**		26,90	23,50	23,71
Standardabweichung		15,04	17,26	15,99

13.17 Abbildungen

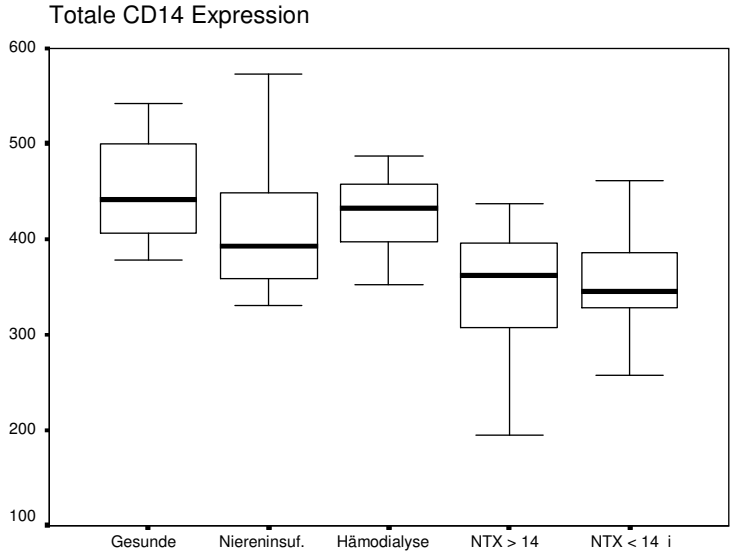


Abbildung 29: Totale CD 14 Expression (RFC) auf Monozyten der verschiedenen Patientengruppen.

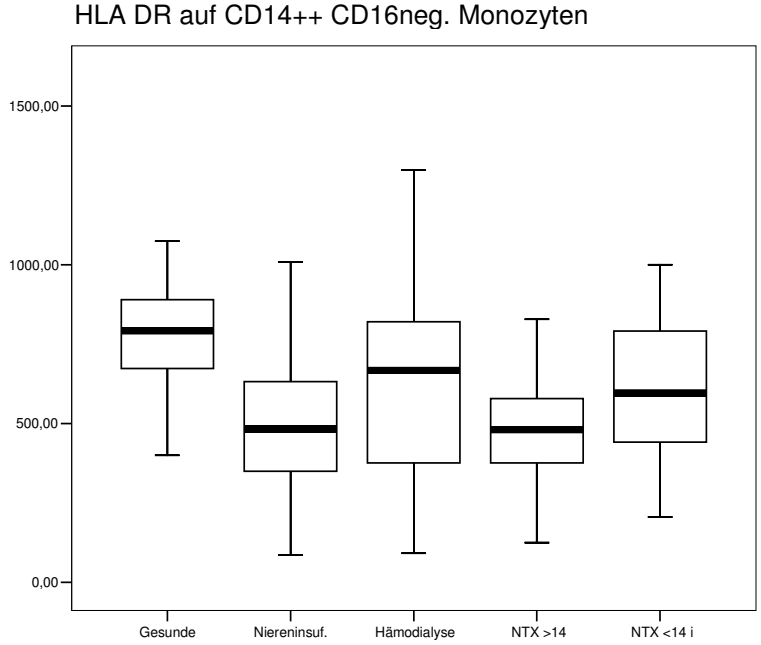


Abbildung 30: Monozytäre Expression des HLA DR auf CD 14++ Monozytensubsets (RFC). Unterschied: die höhere HLA-DR Expression bei NTX < 14 i (instabil) gegenüber stabilen Langzeit-transplantierten ($p \leq 0.05$).

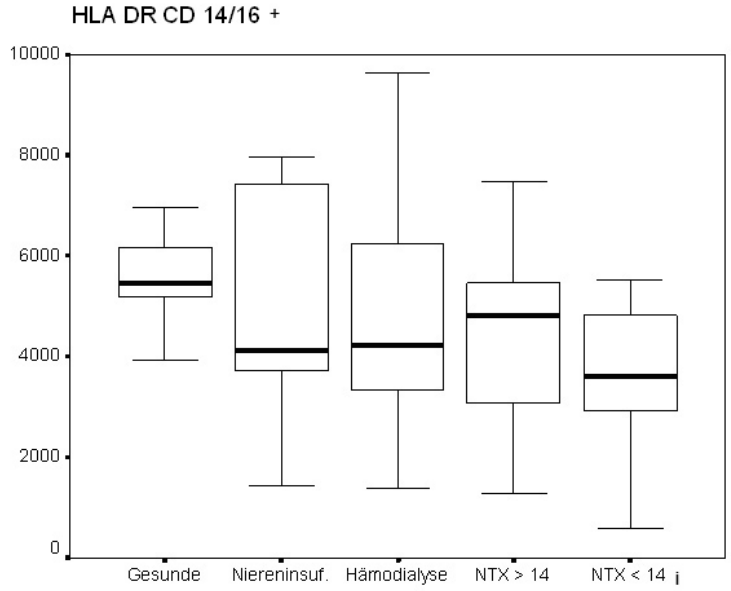


Abbildung 31: Monozytäre Expression des HLA DR auf CD14++CD16+ Monozytensubsets (RFC).

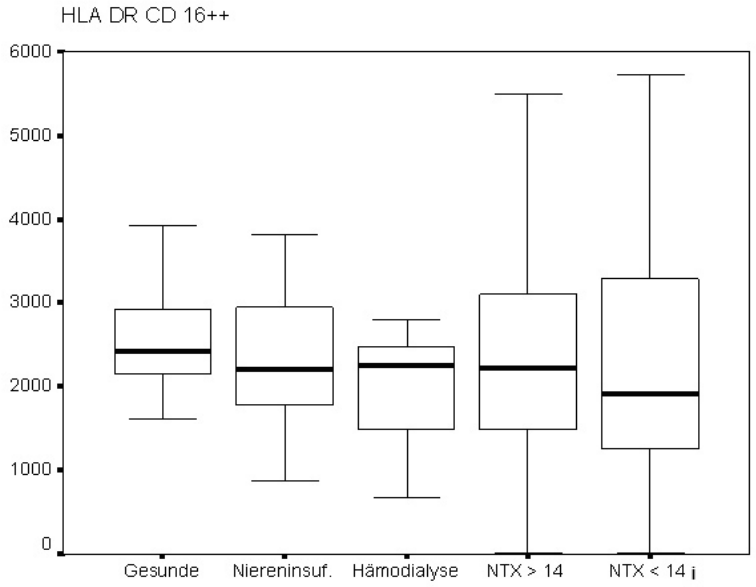


Abbildung 32: Monozytäre Expression HLA DR auf CD14+CD16++ Monozytensubsets (RFC).

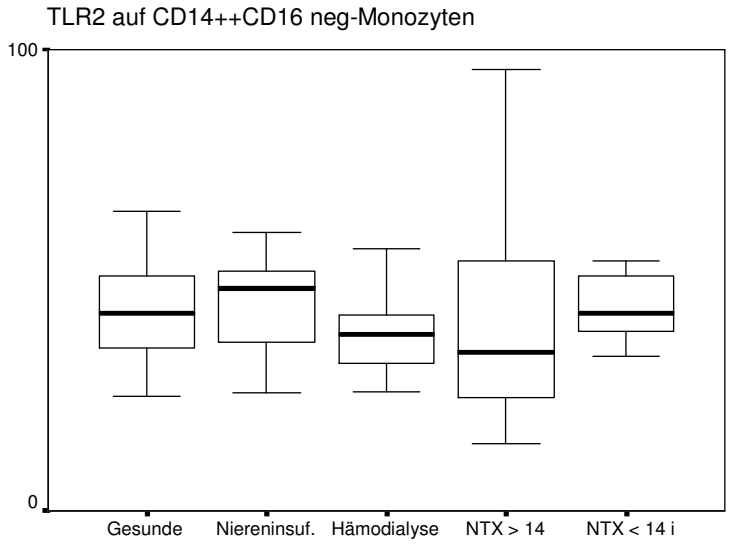


Abbildung 33: TLR 2 Expression auf CD 14++ Monozytensubsets (RFC).

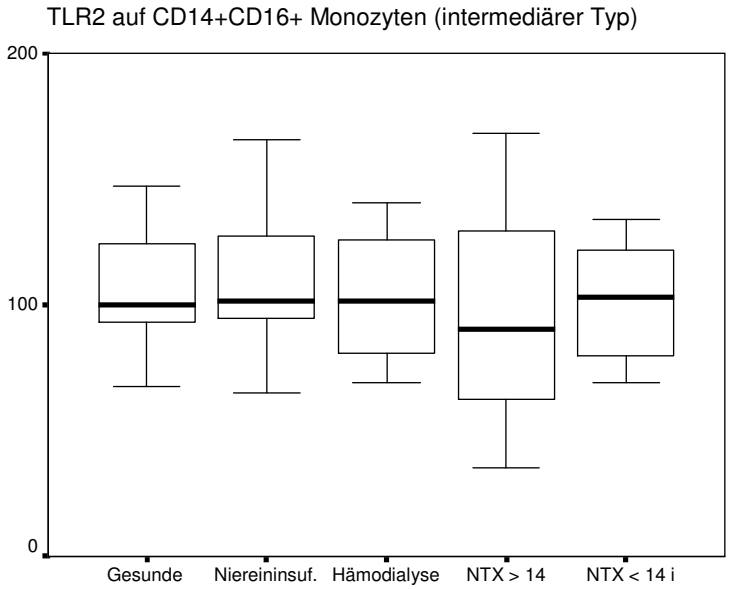


Abbildung 34: TLR 2 Expression auf CD 14+CD16+ Monozytensubsets (RFC).

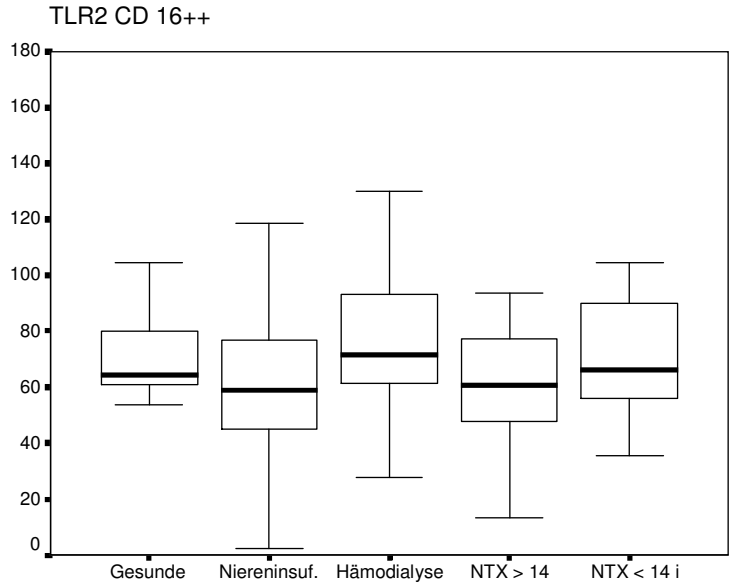


Abbildung 35: TLR 2 Expression auf CD14+CD16++ Monozytensubsets (RFC).

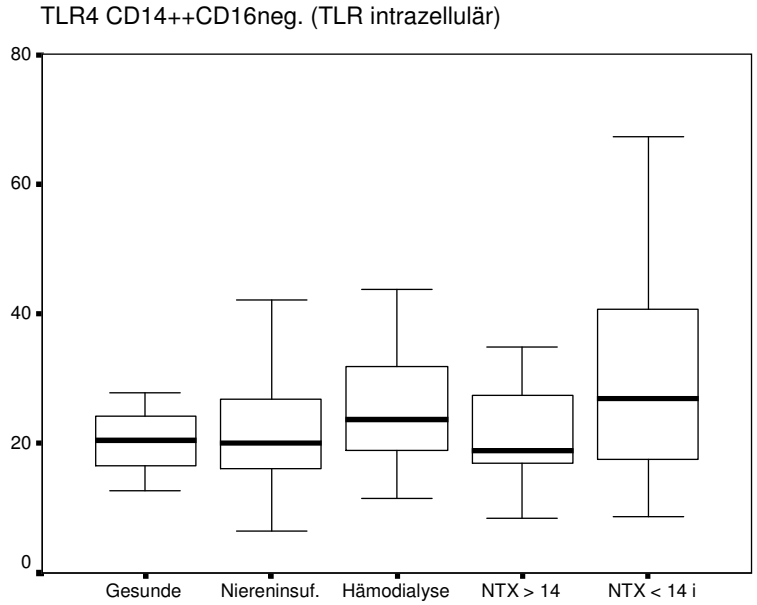


Abbildung 36: Intrazelluläre TLR 4 Expression auf CD14++ Monozytensubsets (RFC).

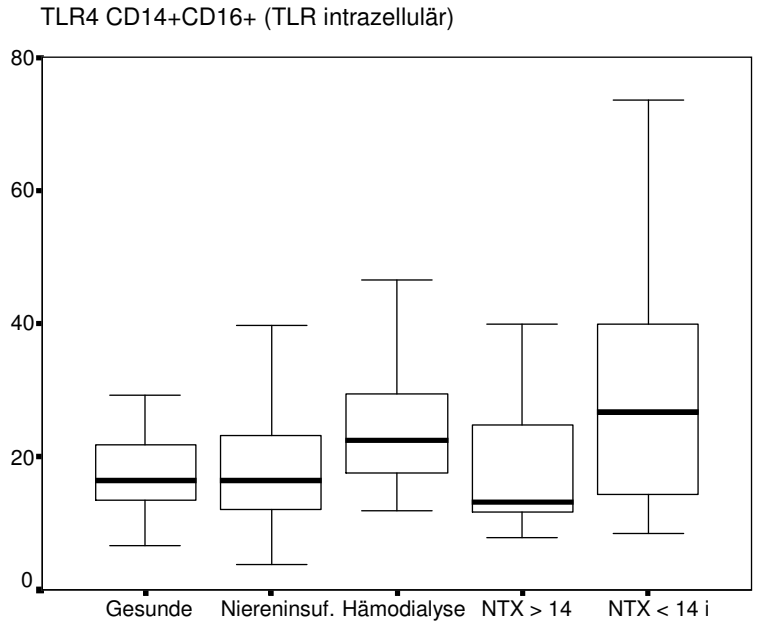


Abbildung 37: Intrazelluläre TLR 4 Expression auf CD14+CD16+ Monozytensubsets (RFC).

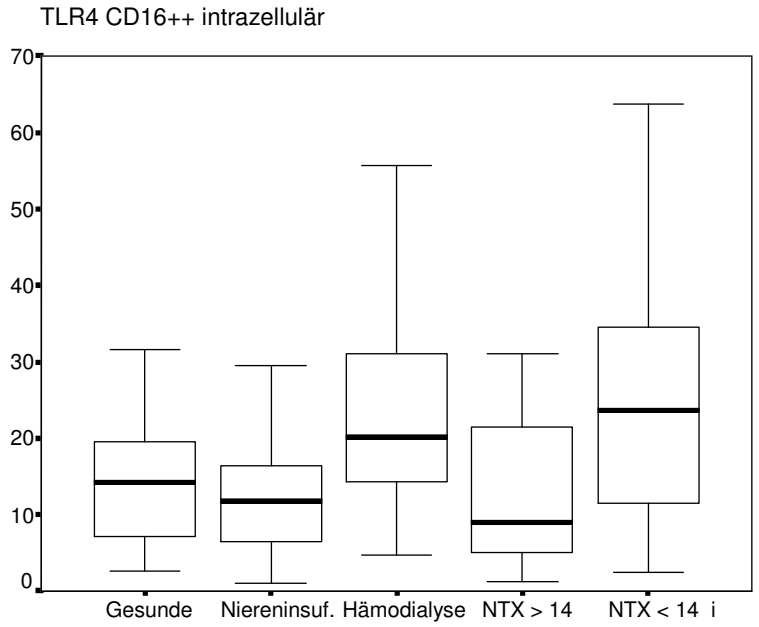


Abbildung 38: Intrazelluläre TLR 4 Expression auf CD16++ Monozyten (RFC).

TLR4 (extrazellulär)- CD14++CD16neg. bei NTX > 14 und der NTX < 14 i (instabil)

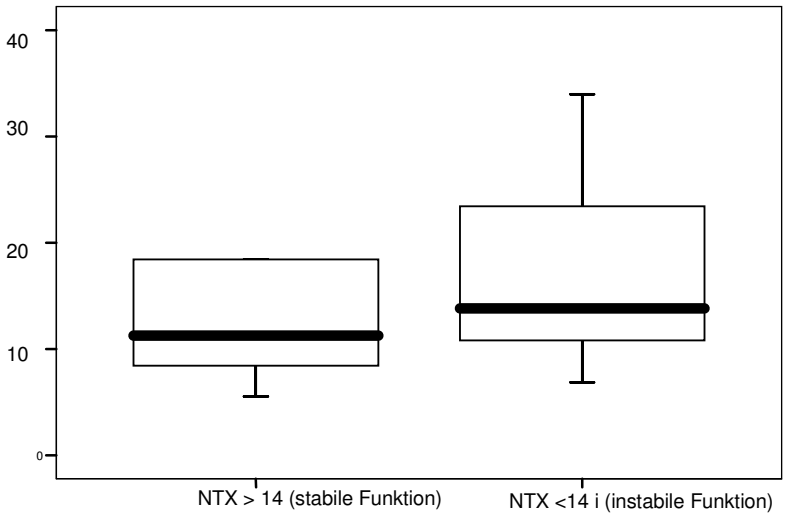


Abbildung 39: Extrazelluläre TLR 4-Expression auf CD14++CD16neg. Monozytensubset der NTX > 14 Jahre Patienten und der NTX < 14 Jahre Patienten mit einer instabilen NT Funktion (RFC).

TLR4(extrazellulär) auf CD14++CD16+ bei NTX > 14 und der NTX < 14 i (instabil)

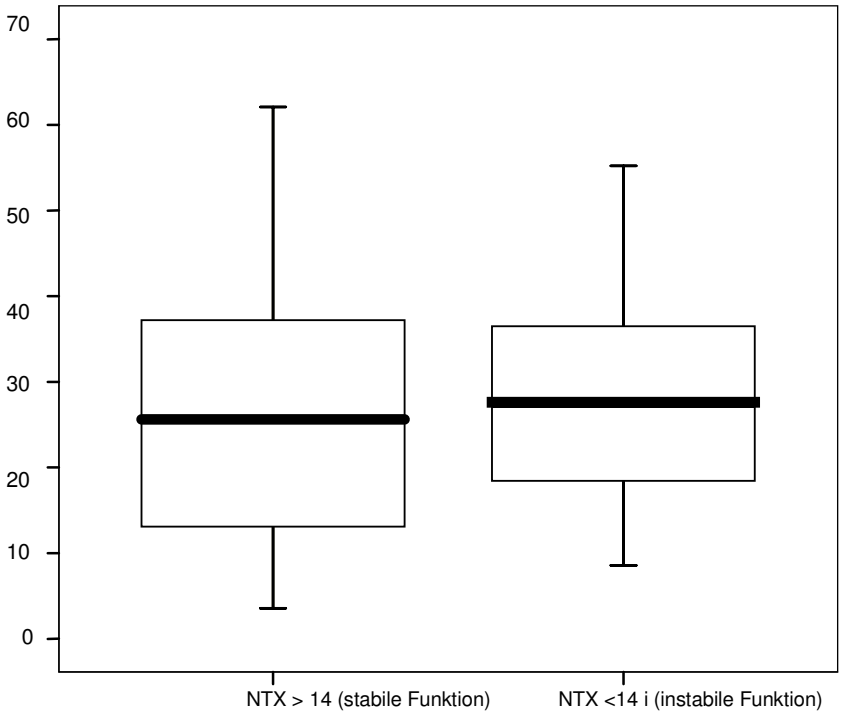


Abbildung 40: TLR 4 extrazellulär auf CD14++CD16+ Monozytensubsets der NTX > 14 Jahre Patienten und der NTX < 14 Jahre Patienten mit instabiler NT Funktion (RFC).

TLR4 (extrazellulär)- CD14+16++ Phänotyp bei NTX > 14 und der NTX < 14 i (instabil)

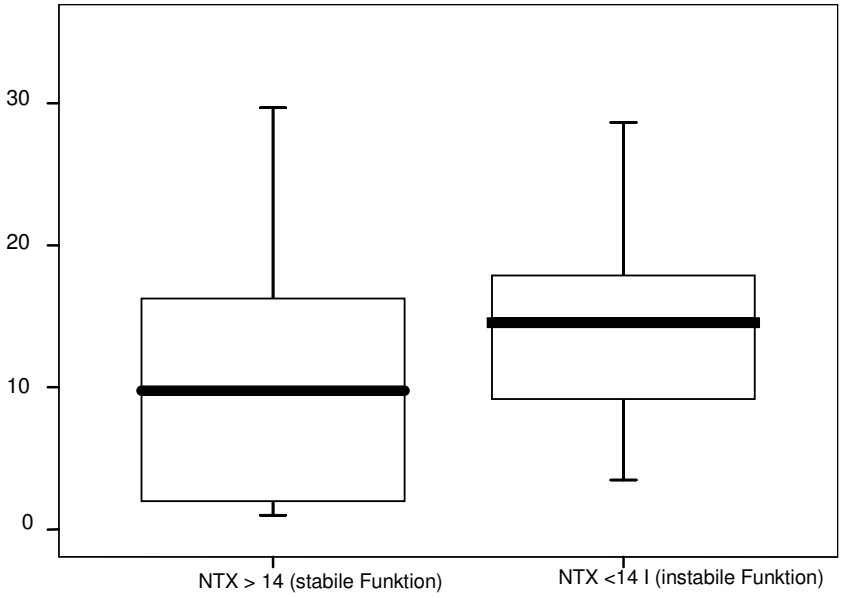


Abbildung 41: Extrazelluläre TLR 4 Expression auf CD14+CD16++ Monozytensubset der NTX > 14 Jahre Patienten und der NTX < 14 Jahre Patienten mit einer instabilen NT Funktion (RFC).

13.18 Zellimmunologische Merkmale antigen-präsentierender Zellen (APC, Monozyten)

Die statistische Auswertung zur Feststellung der relevanten Unterschiede der zellimmunologischen Merkmalen auf Blutmonozyten, erfolgte mit Hilfe des Kruskal-Wallis Test´s als einen Vortest, und im Anschluss daran mit Hilfe des Mann-Whitney-U Test. Verglichen wurden beide NTX-Gruppen (NTX > 14 Jahre und NTX < 14 Jahre Patienten mit instabiler NT Funktion „NTX < 14 i“) mit gesunden Probanden, Hämodialysepatienten (HD) und nicht dialysepflichtige Niereninsuffizienten (NI). In unsere statistische Auswertung umfassten wir ebenfalls die Vergleichsgruppen (NI, HD, gesunde Probanden) um den Unterschied zu NTX Patienten besser erfassen zu können.
.

Kruskal-Wallis-U Test

Tabelle 53:

	Total Cd14 16 expr	HLACD14++	HLACD1416	HLACD16++	TLR2-CD14++	TLR2-CD14/16+
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000	,001	,023	,742	,014	,157

Auf Niveau p ≤ 0,05 signifikant

Tabelle 54:

	TLR2-CD16++	TLR4-CD14++ ez	TLR4-CD14++ iz	TLR4-CD14/16+ ez	TLR4-CD14/16+	TLR4-CD16++ ez	TLR4-CD16++ iz
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,024	,427	,144	,809	,000	,062	,000

Auf Niveau p ≤ 0,05 signifikant

Die Überprüfung mithilfe des Kruskal-Wallis Tests als Vortest, für die paarweise Überprüfung der Stichproben mittels des Mann-Whitney -H Tests.

Monozytäre Antigenmuster zwischen NI (Niereninsuffiziente) und Gesunden

Tabelle 55:

	HLA DR CD14++	HLA DR CD14++ CD16+	HLA DR CD14+ CD16++	TLR2-CD14++	TLR2-CD14+ CD16++	TLR2-CD14+ CD16++	TLR4-CD14++ iz	TLR4-CD14+ CD16++ iz	TLR4-CD14+ CD16++ iz	Total CD14 expr
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000	,007	,198	,006	,022	,070	,711	,835	,454	,008

Auf Niveau p ≤ 0,05 signifikant

Statistischer Vergleich der Gruppe niereninsuffizienter Patienten (NI) und gesunder Probanden (Mann-Whitney Test). Die Expression, der HLA DR Antigene auf CD14++ und CD14++/16 + Monozyten ist, bei Gesunden höher verglichen zur Oberflächenexpression bei NI Patienten (p ≤ 0,000, p ≤ 0,007) (Abb. 30 S. 127, Abb. 31 S. 128). Die HLA DR Expression auf CD14+CD16++ Monozyten ist bei Gesunden tendenziell höher als bei NI Patienten (p ≤ 0,198) (Abb.32 S. 128). Signifikant präsentieren sich in diesem Vergleich die TLR 2 Expressionen auf CD14++ und CD14++CD16+ Monozyten. Gesunde weisen höhere TLR 2 Expressionen im Vergleich zu NI Patienten (p ≤ 0,006, p ≤ 0,022) (Abb. 33 S. 129, Abb. 34 S. 129). Die TRL 2 Expression auf CD14+CD16++ Monozyten ist ebenfalls bei Gesunden tendenziell höher (p ≤ 0,070) (Abb. 35 S. 130). Insgesamt haben gesunde Probanden gegenüber NI Patienten eine höhere CD14 Expression (p ≤ 0,008) (Abb. 29 S. 127).

Monozytäre zellimmunologische Merkmale zwischen HD (Hämodialyse) Patienten und Gesunden

Tabelle 56:

	HLA DR CD14++	HLA DR CD14++ CD16+	HLA DR CD14+ CD16++	TLR2- CD14++	TLR2- CD14+ CD16+	TLR2- CD14+ CD16++	TLR4- CD14++ iz	TLR4- CD14+ CD16++ iz	TLR4- CD14+ CD16++ iz	Total CD14 expr
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,048	,132	,195	,009	,059	,429	,064	,006	,012	,343

Auf Niveau p ≤ 0,05 signifikant

Mann-Whitney-Test zwischen Hämodialysepatienten (HD) und Gesunden. Die HLA DR Expression auf den CD14++ Monozyten HD Patienten ist im Vergleich zur Expression Gesunder stark erniedrigt (p ≤ 0,048) (Abb. 30 S. 127). Die übrigen Monozytengruppen weisen bezüglich der HLA DR Antigene eine Tendenz für erhöhte Expressionen bei Gesunden gegenüber HD Patienten. Die TLR 2 Expressionen der CD14++ und CD14+CD16+ Monozyten Gesunder ist im Vergleich zur Gruppe der HD Patienten signifikant erhöht (p ≤ 0,009, p ≤ 0,059) (Abb. 33 S. 129, Abb.34 S. 129). Die TLR 2 Expressionen sowohl bei Gesunden als auch bei HD Patienten in CD14+CD16++ Monozyten zeigen keine Unterschiede (Abb. 35 S. 130).
Die intrazelluläre TLR 4 Expressionen in allen untersuchten Monozytengruppen weisen zwischen Gesunden und HD Patienten signifikante Unterschiede. Die intrazelluläre TLR 4 Expression ist bei HD Patienten höher als bei Gesunden (p ≤ 0,064, p ≤ 0,06, p ≤ 0,012) (Abb. 36 S. 130, Abb. 37 S. 131, Abb. 38 S. 131). Die CD14 Verteilung auf den Monozyten HD Patienten ähnelt der Verteilung Gesunder (Abb. 29 S. 127), und zeigt keine Unterschiede.

Monozytäre zellimmunologische Merkmale zwischen NI (chronische Niereninsuffizienz) Patienten und HD (Hämodialyse) Patienten

Tabelle 57:

	HLA DR CD14++	HLA DR CD14++ CD16+	HLA DR CD14+ CD16++	TLR2- CD14++	TLR2- CD14+ CD16+	TLR2- CD14+ CD16++	TLR4- CD14++ iz	TLR4- CD14+ CD16++ iz	TLR4- CD14+ CD16++ iz	Total CD14 expr
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,020	,154	,847	,709	,445	,002	,044	,000	,000	,018

Auf Niveau p ≤ 0,05 signifikant

Vergleich zwischen NI und HD Patienten (Mann-Whitney-Test). Die HLA DR Expression ist bei HD Patienten auf CD14++ Zellen am höchsten (p ≤ 0,020) (Abb. 30 S. 127). CD14+CD16+ und CD14+CD16++ Zellen unterscheiden sich nicht in ihrer HLA-DR Expression zwischen diesen beiden Gruppen. Die TLR 2 Expression auf CD14+16++ Monozyten ist bei HD Patienten signifikant höher als bei Niereninsuffizienten (p ≤ 0,002) (Abb. 34 S. 129). Die intrazelluläre TLR 4 Expression aller Monozytensubpopulationen ist im Vergleich beider Gruppen unterschiedlich. HD Patienten haben höhere intrazelluläre TRL4 Expressionen in allen untersuchten Monozytensubsets im Vergleich zur NI-Patientengruppe (p ≤ 0,044, p ≤ 0,000, p ≤ 0,000) (Abb. 36 S. 130, Abb. 37 S. 131, Abb. 38 S. 131), während NI Patienten gegenüber HD-Patienten signifikant geringere monozytäre CD14 Expressionen aufweisen (p ≤ 0,018) (Abb. 29 S. 127).

Monozytäre zellimmunologische Merkmale zwischen NTX > 14 Jahre Patienten und Gesunden

Tabelle 58:

	HLA DR CD14++	HLA DR CD14++CD16+	HLA DR CD14+ CD16++	TLR2-CD14++	TLR2-CD14+ CD16+	TLR2-CD14+ CD16++	TLR4-CD14++ iz	TLR4-CD14+ CD16++ iz	TLR4-CD14+ CD16++ iz	Total CD14 expr
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,001	,006	,232	,026	,044	,115	,924	,497	,348	,000

Auf Niveau p ≤ 0,05 signifikant

Aus der Gegenüberstellung zwischen NTX > 14 Jahre Patienten und Gesunden erkennt man die Beziehung zwischen HLA DR auf den CD14++ und CD14+CD16+ Monozyten (p ≤ 0,001, p ≤ 0,005) (Abb. 30 S. 127, Abb. 31 S. 128) sowie zwischen den TLR 2 Expressionen auf CD 14++ und CD 14+CD16+ Zellen (p ≤ 0,026, p ≤ 0,045) (Abb. 33 S. 129, Abb. 34 S. 129). NTX > 14 Jahre Patienten haben eine geringere HLA DR Expression auf CD14++ und CD14+CD16+ Monozyten (Abb. 30 S. 127, Abb. 31 S. 128), ebenso eine niedrigere TLR 2 Expression auf CD14++ und CD 14++CD16+ Monozyten (Abb. 33 S. 129, Abb. 34 S. 129). Die CD14 Expression ist auf allen untersuchten Monozyten bei gesunden Probanden höher im Vergleich zu den NTX > 14 Jahre Patienten (p ≤ 0,000) (Abb. 29, S. 127).

Monozytäre zellimmunologische Merkmale zwischen NTX > 14 Jahre Patienten und NI Patienten

Tabelle 59:

	HLA DR CD14++	HLA DR CD14++CD16+	HLA DR CD14+ CD16++	TLR2-CD14++	TLR2-CD14+ CD16++	TLR2-CD14+ CD16+	TLR4-CD14++ iz	TLR4-CD14+ CD16++ iz	TLR4-CD14+ CD16++ iz	Total CD14 expr
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,962	,810	,804	,929	,706	,997	,679	,547	,508	,089

Auf Niveau p ≤ 0,05 signifikant

Vergleich zwischen NTX > 14 Jahre Patienten und Niereninsuffizienten (NI). Die monozytären zellimmunologischen Merkmale zwischen diesen beiden Gruppen ähneln sich stark. Sowohl die CD14 Expressionen als auch die die HLA DR (Abb. 30 S. 127, Abb. 31 S. 128, Abb. 32 S. 128), TLR 2 (Abb. 33 S. 129, Abb. 34 S. 129, Abb. 35 S. 130) und die intrazelluläre TLR 4 Expression (Abb. 36 S. 130, Abb. 37 S. 131, Abb. 38 S. 131) sind auf den Monozyten ähnlich gleich verteilt. Die CD14 Expression ist in der Gruppe der NTX > 14 Jahre Patienten tendenziell geringer als bei niereninsuffizienten Patienten (NI) (Abb. 29 S. 127).

Monozytäre zellimmunologische Merkmale zwischen NTX > 14 Jahre Patienten und HD Patienten

Tabelle 60:

	HLA DR CD14++	HLA DR CD14++CD16+	HLA DR CD14+ CD16++	TLR2-CD14++	TLR2-CD14+ CD16++	TLR2-CD14+ CD16++	TLR4-CD14++ iz	TLR4-CD14+ CD16++ iz	TLR4-CD14+ CD16++ iz	Total CD14 expr
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,087	,122	,589	,564	,371	,013	,065	,001	,000	,000

Auf Niveau p ≤ 0,05 signifikant

Hämodialyse (HD) Patienten haben im Vergleich zu den NTX > 14 Jahre Patienten eine signifikant höhere CD 14 Expression auf den Blutmonozyten (p ≤ 0,000) (Abb. 29 S. 127), sowie eine höhere intrazelluläre TLR 4 Expression auf den CD 14++, CD 14+CD16+ und CD14+CD16++ Monozyten (p ≤ 0,065, p ≤ 0,001, p ≤ 0,000) (Abb. 36 S. 130, Abb. 37 S. 131, Abb. 38 S. 131). Für die TLR 2 Expression ergibt sich ein Unterschied für die CD14+CD16++ Monozyten. Hämodialysepatienten weisen auf diesen eine höhere TLR 2 Expression als in der Gruppe der NTX > 14 Jahre Patienten (p ≤ 0,013) (Abb. 35 S. 130).

Monozytäre zellimmunologische Merkmale zwischen NTX > 14 Jahre Patienten und NTX < 14 Jahre Patienten mit einer instabilen Transplantatfunktion (NTX < 14 i)

Tabelle 61:

	HLA DR CD14++	HLA DR CD14++CD16+	HLA DR CD14+ CD16++	TLR2-CD14++	TLR2-CD14+ CD16+	TLR2-CD14+ CD16+	TLR4-CD14++ iz	TLR4-CD14+ CD16++ iz	TLR4-CD14+ CD16++ iz	Total CD14 expr
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,052	,946	,969	,049	,294	,607	,237	,043	,010	,954

Auf Niveau p ≤ 0,05 signifikant

Der Vergleich zwischen NTX > 14 Jahre Patienten und NTX < 14 instabilen (NTX < 14 i) ergibt einen Unterschied für die HLA DR (p ≤ 0,052, Abb. 30 S. 127) und TLR 2 (p ≤ 0,049, Abb. 33 S. 129) Expressionen der CD 14++ Monozyten. Sowohl HLA DR und TLR 2 sind bei Langzeit-transplantierten (NTX > 14) niedriger als bei NTX Patienten, die unmittelbar vor einer Dysfunktion stehen. Ähnlich verhält es sich mit der intrazellulären 4 Expression auf den CD14+CD16+ und CD14+CD16++ Monozyten (p ≤ 0,043, p ≤ 0,010). Auch hier weisen NTX > 14 Jahre Patienten signifikant niedrigere intrazelluläre monozytäre Expressionen gegenüber instabilen NT Patienten auf (Abb. 37 S. 131, Abb. 38 S. 131).

Monozytäre zellimmunologische Merkmale des extrazellulären TLR 4 Rezeptors zwischen NTX > 14 Jahre Patienten und NTX < 14 Jahre mit einer instabilen Transplantatfunktion (NTX < 14 i)

Tabelle 62:

	TLR4-CD14++ ez	TLR4-CD14+CD16+ ez	TLR4-CD14+16++ ez
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,427	,809	,062
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,443(a)	,825(a)	,064(a)

a Nicht für Bindungen korrigiert.
b Gruppenvariable: Gruppe

Vergleich des extrazellulären TLR 4 Rezeptors zwischen NTX > 14 Jahre Patienten und instabilen NTX < 14 Jahre Patienten (NTX < 14 Jahre instabil). Die Häufigkeitsverteilung des extrazellulären TLR 4 Rezeptors auf den untersuchten Monozyten ist bei beiden Gruppen ähnlich (Abb. 39 S. 132, Abb. 40 S. 132, Abb. 41 S. 133). Auf den CD14+CD16++ Monozyten zeigt sich in der Gruppe der NTX < 14 i (instabil) eine tendenziell (p ≤ 0,064) höhere extrazelluläre TLR 4 Expression (Abb. 41 S. 133).

Monozytäre zellimmunologische Merkmale zwischen NTX < 14 Jahre mit einer instabilen Transplantatfunktion (NTX < 14 i) und Gesunden

Tabelle 63:

	HLA DR CD14++	HLA DR CD14++CD16+	HLA DR CD14+ CD16++	TLR2-CD14++	TLR2-CD14+ CD16+	TLR2-CD14+ CD16++	TLR4-CD14++ iz	TLR4-CD14+ CD16++ iz	TLR4-CD14+ CD16++ iz	Total CD14 expr
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,026	,003	,265	,488	,192	,724	,181	,088	,111	,000

Auf Niveau p ≤ 0,05 signifikant

Vergleich zwischen NTX < 14 instabilen Patienten (NTX < 14 i) und gesunden Probanden. NTX < 14 i Patienten haben eine niedrigere CD14 ++ Expression (p ≤ 0,000, Abb. 29 S. 127), sowie eine ebenfalls niedrigere HLA DR (p ≤ 0,026, p ≤ 0,002) Expression auf ihren CD14++ und CD14+16+ Monozyten (Abb. 30 S. 127, Abb. 31 S. 128). Tendenzielle Unterschiede ergeben sich auch für den intrazellulären TLR 4 Rezeptor auf den CD14+CD16+ und CD14+CD16++ Monozyten. Diese Rezeptoren sind bei instabilen NTX Patienten höher intrazellulär exprimiert als bei Gesunden (Abb. 37 S. 131, Abb. 38 S. 131).

Monozytäre zellimmunologische Merkmale zwischen NTX < 14 Jahre mit einer instabilen Transplantatfunktion (NTX < 14 i) und Niereninsuffizienten (NI)

Tabelle 64:

	HLA DR CD14++	HLA DR CD14++CD16+	HLA DR CD14+ CD16++	TLR2-CD14++	TLR2-CD14+ CD16+	TLR2-CD14+ CD16++	TLR4-CD14++ iz	TLR4-CD14+ CD16++ iz	TLR4-CD14+ CD16++ iz	Total CD14 expr
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,131	,371	,862	,021	,250	,234	,195	,014	,003	,072

Auf Niveau p ≤ 0,05 signifikant

Vergleich zwischen Niereninsuffizienten (NI), welche nicht auf eine Hämodialyse angewiesen sind und NTX < 14 i Patienten. Die TLR 2 Expression auf CD 14++ Monozyten bei instabilen NT Patienten ist höher als die monozytäre CD14++ Expression in Gruppe der Niereninsuffizienten (p ≤ 0,021) (Abb. 26). Die intrazelluläre TLR 4 Expression auf CD14+CD16+ und CD14+CD16++ Monozyten ist in der Gruppe der NTX < 14 Jahre Patienten mit instabiler NT Funktion signifikant höher als die entsprechende TRL 4 Expression in der Gruppe der Niereninsuffizienten (p ≤ 0,014, p ≤ 0,003) (Abb. 30, Abb. 31). Die Gesamtexpression des CD14 Rezeptors ist bei Patienten nach NTX mit einen Transplantatalter unter 14 Jahren und instabiler NT Funktion tendenziell niedriger als bei NI Patienten (Abb. 22).

Monozytäre zellimmunologische Merkmale zwischen NTX < 14 Jahre mit einer instabilen Transplantatfunktion (NTX < 14 i) und HD Patienten

Tabelle 65:

	HLA DR CD14++	HLA DR CD14++CD16+	HLA DR CD14+ CD16++	TLR2- CD14++ CD16+	TLR2- CD14+ CD16++	TLR2- CD14+ CD16++	TLR4- CD14++ iz	TLR4- CD14+ CD16++ iz	TLR4- CD14+ CD16++ iz	Total CD14 expr
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,650	,029	,522	,034	,526	,246	,964	,853	,438	,000

Auf Niveau p ≤ 0,05 signifikant

Auswertung immunologischer Merkmale auf Monozyten zwischen Hämodialysepatienten (HD) und NTX < 14 Jahre Patienten mit instabiler NT Funktion (NTX < 14 i). Die HLA DR Expression auf CD 14+CD16+ Monozyten bei HD Patienten ist höher als bei NTX < 14 i Patienten (p ≤ 0,029, Abb. 31 S. 128). Die Gesamtexpression des CD14 Rezeptors ist in unserer untersuchten NTX < 14 i Population im Vergleich zu HD Patienten stark vermindert (p ≤ 0,000, Abb. 29 S. 127). Die gilt gleichsam für die niedrigere TLR 2 Expression auf CD14++ Zellen NTX < 14 i Patienten (p ≤ 0,034, Abb. 33 S. 128).

13.19 Molekularbiologische Untersuchungen im IL-4 590 C/T,IL-10 1082 G/A, IFN γ-874 T/A, Gm-Csf 677 C/A und VDR Bsm I Polymorphismus

Häufigkeitsverteilung des IL-10 1082 G/A Polymorphismus bei NTX Patienten

Tabelle 66:

	NTX > 14 Jahre	NTX < 14 i Jahre	NTX Gesamt
IL 10 -1082 G	40% (11)	33% (7)	27% (13)
IL 10 -1082 A	19% (5)	24% (5)	31% (15)
IL 10 -1082 G/A	41% (11)	43% (9)	42% (20)

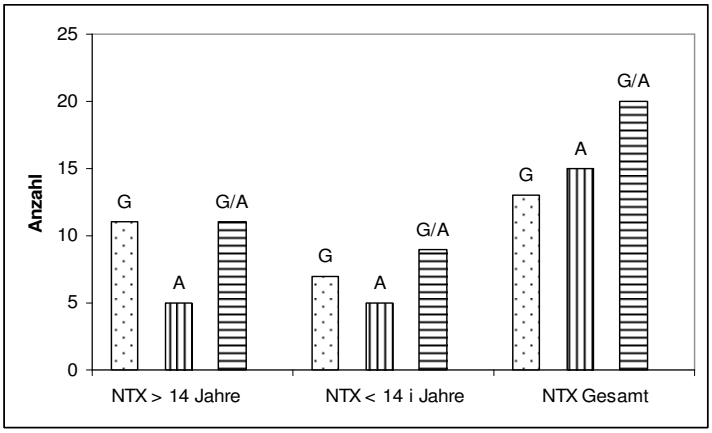


Abbildung 42: Abb. in Tab 66.Die Häufigkeitsverteilung des IL-10 1082 G/A Polymorphismus zeigt in der Gruppe der NTX > 14 Jahre Patienten eine höhere Verteilung des IL-10 1082 G- Alleles. Das IL 10 -1082 G-Allel steht als antiinflammatorisches Zytokin für eine hohe IL- 10 Ausschüttung (sog. „high producer“) (vergl. Turner D.M. 1997). Hohe IL-10 Produktion steht im Zusammenhang mit einer verbesserten Langzeitfunktion des Transplantates. Poole et al. stellten bei NTX Patienten ein besseres Transplantatüberleben in Verbindung mit dem IL-10 1082 G-Allel fest (Poole K.L. 2001).

Häufigkeitsverteilung des IL-4 590 C/T Polymorphismus der NTX-Patienten

Tabelle 67:

	NTX > 14 Jahre	NTX < 14 i Jahre	NTX Gesamt
IL 4 -590 C	85% (23)	90% (19)	85% (42)
IL 4 -590 T	4% (1)	5% (1)	4% (2)
IL 4 -590 C/T	11% (3)	5% (1)	11% (4)

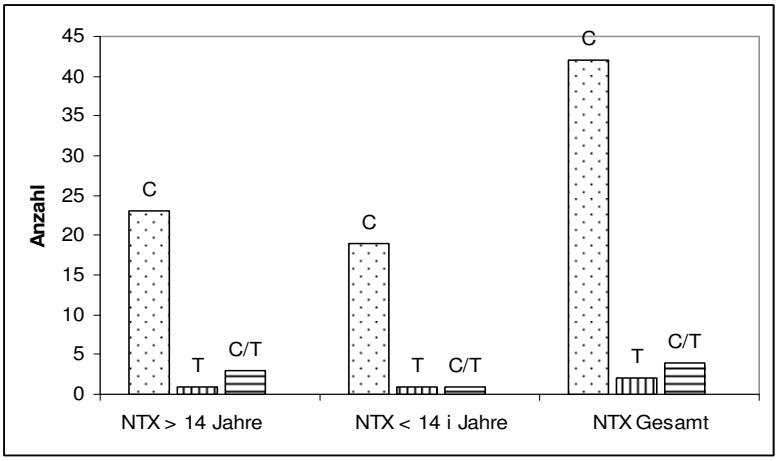


Abbildung 44: Abb. in Tab 67. Die Inzidenz des IL-4 590 C/T Polymorphismus wird in der Literatur unterschiedlich angegeben. Die Verteilung der Häufigkeiten in unseren NTX-Kollektiven (NTX > 14, NTX < 14i) zeigt ein unterschiedliches Bild. Das IL 4 -590 T-Allel was mit einer hohen Ausschüttung (high producer) korreliert, erscheint in unseren Kollektiven sehr selten. Poole et al. konnte in seinen Untersuchungen an NTX-Patienten eine Korrelation zwischen Spender C-Allel/Empfänger C-Allel und dem Auftreten akuter Transplantatabstoßung aufzeigen (Poole K.L. 2001)

Häufigkeitsverteilung des IFN-874 T/A Polymorphismus der NTX-Patienten

Tabelle 68:

	NTX > 14 Jahre	NTX < 14 i Jahre	NTX Gesamt
IFN γ -874 T	7% (2)	29% (6)	7% (8)
IFN γ -874 A	41% (11)	29% (6)	41% (17)
IFN γ -874 T/A	52% (14)	42% (9)	52% (23)

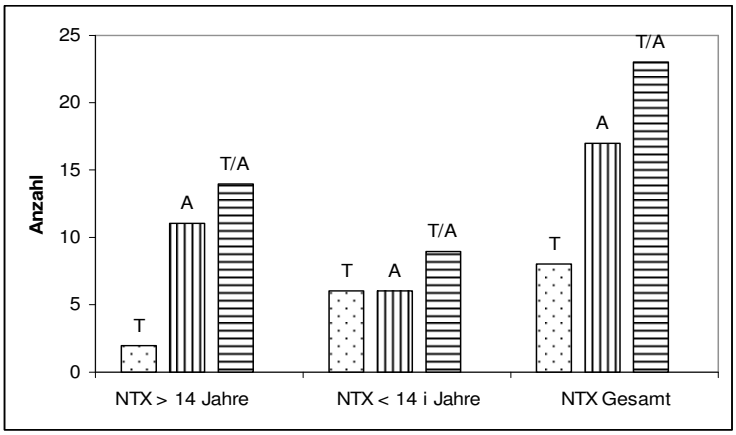


Abbildung 45: Abbildung in Tab. 68. Der IFN γ 874 T/A Polymorphismus korreliert stark mit der Produktion und Ausschüttung des Zytokin (vergl. Azarpina et al. 2006). Das IFN-874 T-Allel korreliert mit einer vermehrten Ausschüttung von IFN γ (Azarpira N. 2006). Eine verstärkte IFN-Sekretion hat einen negativen Einfluss auf das Transplantatüberleben. Es kommt zur verstärkten Migration von Makrophagen in das Transplantat und einer Aktivierung der HLA-Antigene. In der Gruppe der NTX > 14 Jahre ist das T-Allel, welches mit einer hohen IFN-Produktion korreliert, weniger häufig exprimiert. Vergleicht man Gesunde und NTX Patienten, erkennt man, dass in der Gruppe der **NTX > 14** Jahre das T-Allel (high producer) **weniger häufig** vorkommt (7%), in der Gruppe der NTX < 14 Jahre mit einer instabilen NT Funktion dagegen häufiger (29%), verglichen zur gesunden Probandengruppe (21%).

Häufigkeitsverteilung des IL-4 590 C/T und IFN γ 874 T/A Polymorphismus innerhalb eines gesunden Probandenkollektives

Die statistische Auswertung der Häufigkeiten des IL-4 590 C/T und des IFN γ 874 T/A Polymorphismus ergab Unterschiede zwischen den von uns ermittelten Häufigkeitsverteilungen beider Polymorphismen und den Angaben in der Literatur. Um die Validität unserer Ergebnisse zu bestätigen, verglichen wir diese beiden Polymorphismen mit denen gesunder Probanden. Für jeden NTX-Patienten wurden zwei DNA Proben gesunder Probanden zur genetischen Untersuchung herangezogen. Die Auswahlkriterien für die gesunden Probanden wurden anhand des Geschlechtes und des Geburtsjahres festgelegt. Insgesamt wurden 96 gesunde Probanden auf ihre IL-4 590 C/T und IFN γ 874 T/A Genotypus untersucht. Von den 96 Patienten waren 58 männlich und 38 weiblichen Geschlechtes.

Häufigkeitsverteilung des IL-4 590 C/T Polymorphismus gesunder Kontrollpersonen

Tabelle 69:

	Männer (n=58)	Frauen (n=38)	Gesamt (n=96)
IL 4 -590 C	82% (48)	76% (29)	79% (77)
IL 4 -590 T	2% (1)	3% (1)	2% (2)
IL 4 -590 C/T	16% (9)	21% (8)	19% (18)

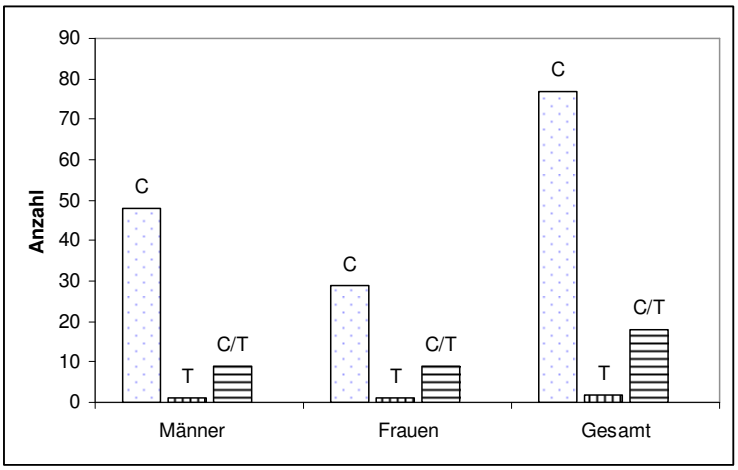


Abbildung 46: Die Verteilung des IL-4 590 C/T Polymorphismus innerhalb des Kontrollkollektives Gesunder ähnelt den Häufigkeiten unseres NTX Kollektivs. Das für die höhere Produktion und Ausschüttung günstigere T-Allel ist auch in unserem Kontrollokollektiv äußerst selten vertreten. Der Unterschied in der Verteilung der beiden Allele, der in der Literatur beschrieben ist, liegt in den jeweiligen Kollektiven.

Häufigkeitsverteilung des IFN-γ 874 T/A Polymorphismus gesunder Kontrollgruppe

Tabelle 70:

	Männer	Frauen	Gesamt
IFN γ -874 T	14% (8)	35% (13)	22% (21)
IFN γ -874 A	31% (18)	19% (7)	26% (25)
IFN γ -874 T/A	55% (32)	46% (17)	52% (49)

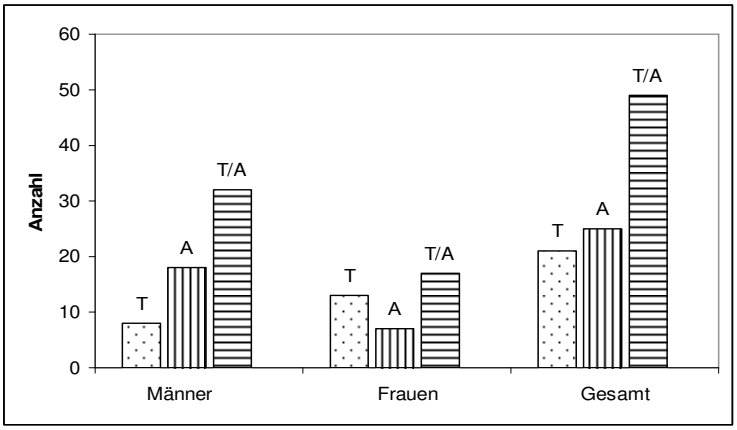


Abbildung 47: Verteilung des IFN γ 874 T/A Polymorphismus zwischen gesunden Männern und Frauen. Eine ähnliche Verteilung des Polymorphismus ergibt sich auch für unser NTX-Kollektiv (NTX-Gesamt).

Häufigkeitsverteilung des GM-CSF 677 C/A Polymorphismus der NTX-Patienten

Tabelle 71:

	NTX > 14 Jahre	NTX < 14 i Jahre	NTX Gesamt
GM-CSF C	28% (8)	24% (5)	28% (13)
GM-CSF A	31% (9)	24% (5)	31% (14)
GM-CSF C/A	41% (12)	52% (11)	41% (23)

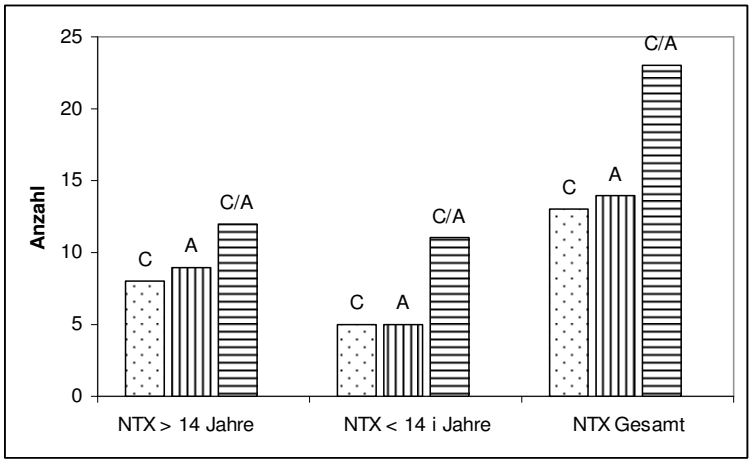


Abbildung 48: Im Vergleich der Häufigkeiten innerhalb der NTX Kollektive ist das A-Allel fast doppelt so häufig bei stabiler NTX Funktion als bei NTX < 14 Jahre i (instabil). In Fällen einer Infektion kommt es offenbar zu einer erhöhten GM-CSF Freisetzung, die durch Intervention mit Cyclosporin oder Glukokortikoiden herunterreguliert werden kann (Daniel V. 1992, Lehnhoff S. 1996).

Häufigkeitsverteilung des VDR BsmI Polymorphismus der NTX-Patienten

Tabelle 71:

	NTX > 14 Jahre	NTX < 14 i Jahre	NTX Gesamt
VDR BsmI BB	37% (10)	37% (11)	37% (21)
VDR BsmI bb	15% (4)	33% (10)	15% (14)
VDR BsmI B/b	48% (13)	30% (9)	48% (22)

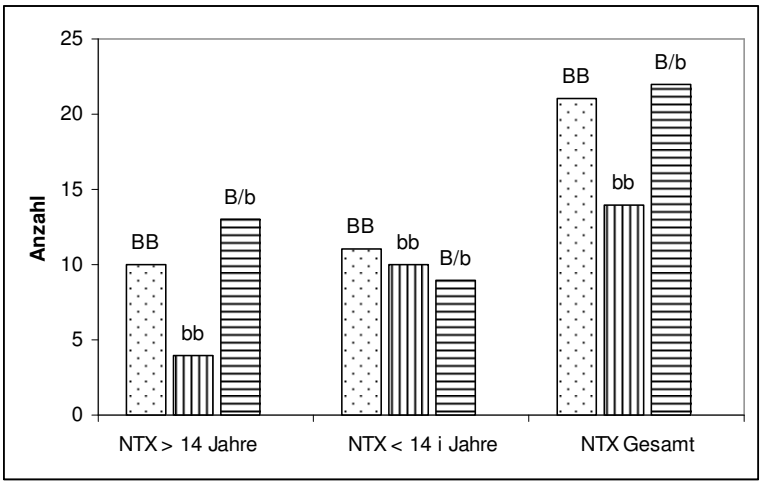


Abbildung 49: Die Verteilung des VDR BsmI Polymorphismus ergibt für die NTX > 14 Jahre Gruppe eine häufigere Präsenz des BB-Alles gegenüber der des bb-Alles. Dagegen zeigt sich in der Gruppe unseres NTX < 14 i (instabile NT Funktion) Kollektives eine ähnlich hohe Verteilung beider Allele. Zwischen Transplantatüberleben und VDR-BsmI Polymorphismus besteht bis dato kein Zusammenhang. Es ist bekannt, dass das bb-Allel bei Nierentransplantierten mit einer ungünstigen Veränderung der Knochendichte einhergehen kann (Morrison N.A. 1994). Zudem wird eine verminderte Freisetzung von Parathormon, begünstigt durch das bb-Allel, beschrieben (Torres A. 1996).

13.20 Kreuztabellen der Polymorphismen IL 4 –590 C/T, IL-10 -1082 G/A, IFN γ -874 T/A, Gm-Csf -677 C/A und VDR Bsm I aller NTX.

Die Überprüfung der Korrelation zwischen den immunologischen Merkmalen und den genetischen Polymorphismen erfolgte mit Hilfe von Kreuztabellen und des Chi-Quadrat Test. Mit deren Hilfe lässt sich erkennen, ob sich die beobachteten Häufigkeiten signifikant von den erwarteten Häufigkeiten unterscheiden. Überprüft wurde die Unabhängigkeit beider Variablen der Kreuztabelle und damit indirekt der Zusammenhang beider Merkmale. Zusätzlich dienten die berechneten Residuen als Maß, wie stark beobachtete und erwartete Häufigkeiten voneinander abweichen. Zur Quantifizierung der Stärke bzw. Schwäche des Zusammenhangs zwischen der Immunologie und der Genetik dienten die berechneten Korrelationsmaße, wie die Produkt-Moment-Korrelation nach Pearson (Bühl A., Zöffel P. 2005). In einer ersten Auswertung der genetischen und zellimmunologischen Merkmalen nierentransplantierter Patienten wurden die von uns molekulargenetisch untersuchten NTX Patienten als ein gemeinsames Kollektiv berücksichtigt. Unter Berücksichtigung der Expression ihrer zellimmunologischen Merkmale der CD14, CD16, TLR 2, TLR 4 und HLA DR Expressionen untersuchten wir die Korrelation dieser zum jeweiligen Genotypus (Polymorphismus). Um ein Maß als definierten Wert für die Einteilung der NTX-Patienten zu erhalten, bestimmten wir den Medianwert (angegeben als RFC-Wert, „Relativ Fluorescence Channel“) jedes immunologischen Merkmales auf den Monozyten. Die Einteilung erfolgte in eine hohe oder niedrige Expression entsprechend dieses Medianwertes. Aufgeführt werden nur die statistisch relevanten Kreuztabellen, die unabhängig der berechneten Residuen einen signifikanten Chi-Quadrat-Test aufwiesen.

Gegenüberstellung der monozytären TLR 2 Expression auf den CD14+16++ Blutmonozyten und IFN γ 874 T/A Polymorphismus

Tabelle 72:

Kreuztabelle						
			IFN γ 874 T/A			Gesamt
			T-Allel	A-Allel	T/A-Allel	
TLR 2 CD14+CD16++	TLR 2 CD14+CD16++ unter 66,11 RFC	Anzahl	9	6	12	27
		% der Gesamtzahl	18,8%	12,5%	25,0%	56,3%
		Standardisierte Residuen	1,8	-1,2	-,1	
	TLR 2 CD14+CD16++ über 66,11 RFC	Anzahl	0	11	9	20
		% der Gesamtzahl	,0%	22,9%	18,8%	41,7%
		Standardisierte Residuen	-1,9	1,5	-,1	
Gesamt		Anzahl	9	17	22	47
		% der Gesamtzahl	18,8%	35,4%	45,8%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests	
	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	**,021**
Likelihood-Quotient	,005
Zusammenhang linear-mit-linear	,309
Anzahl der gültigen Fälle	46

Der Chi-Quadrat Test weist eine Assoziation (p ≤ 0,021) zwischen dem TLR 2 Rezeptor auf den CD14+16++ exprimierenden Monozyten und dem IFN γ 874 T/A Genotyp hin. Der IFN γ -874 T Genotyp in der Gruppe der niedrig exprimierenden TLR 2 auf CD14+CD16++ Monozyten korreliert mit einer niedrigen Expression des TLR 2 Rezeptors.

Gegenüberstellung der extrazellulären TLR 4 Expression auf CD14+16++ Monozyten und IL-10 1082 G/A Polymorphismus.

Tabelle 73:

Kreuztabelle						
			IL-10 1082 G / A			Gesamt
			G-Allel	A-Allel	G/A Allel	
TLR 4 CD14+CD16++ ez	Faktor TLR 4 ez CD14+CD16++ unter 27,63 RFC	Anzahl	10	2	5	17
		% der Gesamtzahl	30,3%	6,1%	15,2%	51,5%
		Standardisierte Residuen	1,3	-1,0	-,5	
	Faktor TLR 4 ez CD14+CD16++ über 27,63 RFC	Anzahl	3	6	7	16
		% der Gesamtzahl	9,1%	18,2%	21,2%	48,5%
		Standardisierte Residuen	-1,3	1,1	,5	
Gesamt		Anzahl	13	8	12	33
		% der Gesamtzahl	39,4%	24,2%	36,4%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests	
	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	**,048**
Likelihood-Quotient	,041
Zusammenhang linear-mit-linear	,077
Anzahl der gültigen Fälle	46

Zusammenhang zwischen der extrazellulären TLR 4 Expression auf CD14+CD16 ++ Monozyten und des IL 10 -1082 G/A Polymorphismus. Zwischen beiden Merkmalen besteht ein signifikanter Zusammenhang (p ≤ 0,048). Dieser Zusammenhang im IL 10 -1082 G Genotyp in der Gruppe der niedrig TLR 4 exprimierenden CD14+CD16++ Monozyten.

Gegenüberstellung der extrazellulären TLR 4 Expression auf CD14+16++ Monozyten und des VDR BsmI Polymorphismus.

Tabelle 74:

Kreuztabelle						
			VDR BsmI			Gesamt
			BB-Allel	bb-Allel	Bb-Allel	
TLR 4 CD14+16++ ez	TLR 4 ez CD14+CD16++ unter 27,63 RFC	Anzahl	10	2	5	17
		% der Gesamtzahl	30,3%	6,1%	15,2%	51,5%
		Standardisierte Residuen	1,3	,0	-1,1	
	TLR 4 ez CD14+CD16++ über 27,63 RFC	Anzahl	3	2	11	16
		% der Gesamtzahl	9,1%	6,1%	33,3%	48,5%
		Standardisierte Residuen	-1,3	,0	1,2	
Gesamt		Anzahl	13	4	16	33
		% der Gesamtzahl	39,4%	12,1%	48,5%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests	
	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	**,050**
Likelihood-Quotient	,044
Zusammenhang linear-mit-linear	,016
Anzahl der gültigen Fälle	46

Zusammenhang zwischen der extrazellulären TLR 4 Expression auf CD14+16++ Monozyten und dem VDR-BsmI Polymorphismus. Die Auswertung zeigt für diesen Zusammenhang eine Beziehung zwischen diesen beiden Variablen ($p \leq 0,05$). Begründet liegt dieser in der Häufigkeit des VDR BsmI BB Polymorphismus bei NTX Patienten mit einer niedrigen extrazellulären TLR 4 Expression auf den CD14+16++ Monozyten.

Gegenüberstellung der intrazellulären TLR 4 Expression auf CD14++ Monozyten und IL-4 590 C/T Polymorphismus.

Tabelle 75:

Kreuztabelle						
			IL 4 -590 C/T			Gesamt
			C-Allel	T-Allel	C/T - Allel	
TLR 4 CD14++ iz	TLR 4 iz CD14++ unter 22,88	Anzahl	20	0	4	24
		% der Gesamtzahl	43,5%	,0%	8,7%	52,2%
		Standardisierte Residuen	-,2	-1,0	1,3	
	TLR 4 iz CD14++ über 22,88	Anzahl	20	2	0	22
		% der Gesamtzahl	43,5%	4,3%	,0%	47,8%
		Standardisierte Residuen	,2	1,1	-1,4	
Gesamt		Anzahl	40	2	4	46
		% der Gesamtzahl	87,0%	4,3%	8,7%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests	
	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	**,052**
Likelihood-Quotient	,016
Zusammenhang linear-mit-linear	,166
Anzahl der gültigen Fälle	46

Der Chi-Quadrat-Test weist einen Zusammenhang zwischen dem IL-4 590 C/T Polymorphismus und einer hohen intrazellulären TLR 4 Expression auf CD14++ Monozyten ($p \leq 0{,}052$). Dieser Zusammenhang begründet sich durch das Auftreten des IL 4 -590 T Polymorphismus in der Gruppe der hoch exprimierenden intrazellulären TRL 4 Expression auf CD14 ++ Monozyten. Die Produktmoment-Korrelation nach Pearson zeigt für diesen Zusammenhang jedoch eine geringe Stärke. Die Ursache für diese schwache Bindung liegt in der Stärke (Anzahl n) des Kollektives und der Häufigkeit des IL 4 -590 T-Alleles.

Gegenüberstellung der intrazellulären TLR 4 Expression auf CD14++ Monozyten und GM-CSF 677 C/A Polymorphismus.

Tabelle 76:

Kreuztabelle						
			GM-CSF -677 C/A			Gesamt
			C-Allel	A-Allel	C/A-Allel	
TLR 4 CD 14++ iz	Faktor TLR 4 iz CD14++ unter 22,88 RFC	Anzahl	10	5	9	24
		% der Gesamtzahl	21,7%	10,9%	19,6%	52,2%
		Standardisierte Residuen	1,5	-,5	-,7	
	Faktor TLR 4 iz CD14++ über 22,88 RFC	Anzahl	2	7	13	22
		% der Gesamtzahl	4,3%	15,2%	28,3%	47,8%
		Standardisierte Residuen	-1,6	,5	,8	
Gesamt		Anzahl	12	12	22	46
		% der Gesamtzahl	26,1%	26,1%	47,8%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests	
	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	**,042**
Likelihood-Quotient	,033
Zusammenhang linear-mit-linear	,029
Anzahl der gültigen Fälle	46

Intrazelluläre TLR 4 Expression auf CD14++ Monozyten und GM-CSF -677 C/A Polymorphismus. Der Chi-Quadrat-Test weist für diese beiden Merkmale eine Signifikanz von p ≤ 0,042. Der Grund liegt in der Häufigkeit des GM-CF -677 C-Allel´s in der Gruppe der niedrig exprimierenden intrazellulären TRL 4 auf CD14++ Monozyten.

Gegenüberstellung der intrazellulären TLR 4 Expression auf CD14++CD16+ Monozyten und IL-4 590 C/T Polymorphismus.

Tabelle 77:

Kreuztabelle						
			IL 4 -590 C/T			Gesamt
			C-Allel	T-Allel	C/T -Allel	
TLR 4 CD14+CD16+ iz	TLR 4 iz CD 14+CD16+ unter 11,78 RFC	Anzahl	21	0	4	25
		% der Gesamtzahl	45,7%	,0%	8,7%	54,3%
		Standardisierte Residuen	-,2	-1,0	1,2	
	TLR 4 iz CD14+CD16+ über 11,78 RFC	Anzahl	19	2	0	21
		% der Gesamtzahl	41,3%	4,3%	,0%	45,7%
		Standardisierte Residuen	,2	1,1	-1,4	
Gesamt		Anzahl	40	2	4	46
		% der Gesamtzahl	87,0%	4,3%	8,7%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests	
	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	**,055**
Likelihood-Quotient	,018
Zusammenhang linear-mit-linear	,200
Pearson – R	,204
Anzahl der gültigen Fälle	46

Intrazelluläre TLR 4 Expression auf CD14++CD16+ Monozyten und IL 4 -590 C/T Polymorphismus. Der Chi-Quadrat-Test weist einen signifikanten Zusammenhang auf (p ≤ 0,055). Zieht man in diese Betrachtung den Korrelationskoeffizienten nach Pearson mit ein erkennt man, wie schwach (geringe Korrelation) dieser Zusammenhang ist (Kp ≤ 0,204). Auch in dieser Betrachtung ist das T-Allel in der Gruppe hoch exprimierenden TLR 4 iz auf CD14++CD16+ Monozyten verantwortlich.

Gegenüberstellung der intrazellulären TLR 4 Expression auf CD14++CD16+ Monozyten und GM-CSF 677 C/A Polymorphismus.

Tabelle78:

Kreuztabelle						
			GM-CSF -690 A/C			Gesamt
			C-Allel	A-Allel	C/A-Allel	
TLR 4 CD14+CD16+ iz	TLR 4 iz CD14+16+ unter 11,78 RFC	Anzahl	11	6	8	25
		% der Gesamtzahl	23,9%	13,0%	17,4%	54,3%
		Standardisierte Residuen	1,8	-,2	-1,1	
	TLR 4 iz CD14+16+ über 11,78 RFC	Anzahl	1	6	14	21
		% der Gesamtzahl	2,2%	13,0%	30,4%	45,7%
		Standardisierte Residuen	-1,9	,2	1,2	
Gesamt		Anzahl	12	12	22	46
		% der Gesamtzahl	26,1%	26,1%	47,8%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests	
	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	**,008**
Likelihood-Quotient	,004
Zusammenhang linear-mit-linear	,003
Pearson-R	,002
Anzahl der gültigen Fälle	46

Zusammenhang zwischen der intrazellulären Expression TRL 4 auf CD14+CD16+ Monozyten und GM-CSF -677 C/A Polymorphismus. Der Chi-Quadrat-Test zeigt für diese beiden Merkmale einen Zusammenhang ($p \leq 0{,}008$). Dieser liegt im GM-CSF -677 C-Allel in der Gruppe der niedrig exprimierenden intrazellulären TLR 4 auf CD14+CD16+ Monozyten. Bestätigt wird die Stärke dieser Assoziation durch die Produkt-Moment-Korrelation nach Pearson.

Gegenüberstellung der intrazellulären TLR 4 Expression auf CD14+16++ Monozyten und GM-CSF 677 C / A Polymorphismus.

Tabelle 79:

Kreuztabelle						
			GM-CSF -690 A/C			Gesamt
			C-Allel	A-Allel	C/A-Allel	
TLR 4 CD 16++	TLR 4 iz CD14+CD16+ unter 14,52 RFC	Anzahl	10	3	10	23
		% der Gesamtzahl	21,7%	6,5%	21,7%	50,0%
		Standardisierte Residuen	1,6	-1,2	-,3	
	TLR 4 iz CD14+CD16+ über 14,52 RFC	Anzahl	2	9	12	23
		% der Gesamtzahl	4,3%	19,6%	26,1%	50,0%
		Standardisierte Residuen	-1,6	1,2	,3	
Gesamt		Anzahl	12	12	22	46
		% der Gesamtzahl	26,1%	26,1%	47,8%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests	
	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	**,014**
Likelihood-Quotient	,010
Zusammenhang linear-mit-linear	,080
Pearson-R	,079
Anzahl der gültigen Fälle	46

Betrachtet man den Zusammenhang zwischen der intrazellulären TLR 4 Expression auf CD14+CD16++ Monozyten und dem GM-CSF C/A Polymorphismus, zeigt sich eine Beziehung zwischen dem C-Allel und der Patientengruppe ($p \leq 0{,}014$), die TLR 4 auf CD14+CD16++ Zellen niedrig exprimieren. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson ($Kp \leq 0{,}079$) weist auf eine schwache Bindung zwischen beiden Merkmalen hin.

14. Besprechung der Ergebnisse

14.1 Ätiologie der terminalen Niereninsuffizienz

Die terminale Niereninsuffizienz bzw. der totale Verlust der Nierenfunktion ist die häufigste Ursache, die zu einer chronischen Nierenersatztherapie führt. Zur chronischen Nierenersatztherapie gehören alle Formen der Dialyseverfahren (Hämodialyse, Peritonealdialyse), wie auch die Nierentransplantation. Als Ursache für die terminale Niereninsuffizienz gilt mit 23% die Glomerulonephritis, gefolgt vom Diabetes mellitus Typ I und II mit ebenfalls 24%. Weitere Grunderkrankungen, die zu einer Nierenersatztherapie führen können, sind vaskuläre Nephropathien mit 16 %, die interstitielle Nephritis mit 12 %, Zystennieren mit 7 %, Systemerkrankungen mit 3 %, kongenitale Nephropathien mit 1 %, unbekannter Genese 10 % (Quelle: Quasi-Niere Bericht 2005).

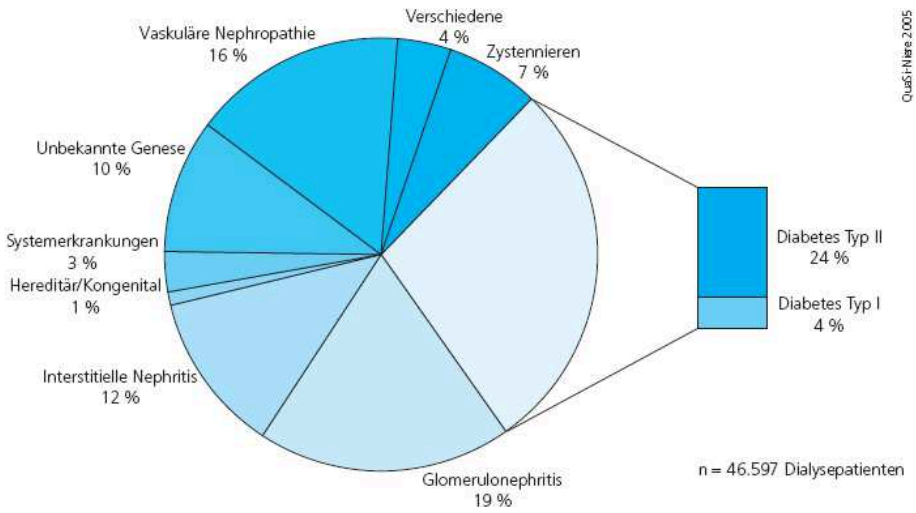


Abbildung 50: Quasi-Niere Bericht 2005 / 2006

Die klinischen Daten unseres Patientenkollektiv an Nierentransplantierten (mit Schwerpunkt Langzeittransplantierte) bestätigen nur marginal diese Verteilung. Auch in unserem NTX-Kollektiv traten als Grunderkrankungen, die primär zur Dialysepflichtigkeit und anschließender Transplantation führten, Glomerulopathien bzw. Glomerulonephritiden. Allerdings waren die zur weiterführenden Behandlung nach TX gemeldeten Patienten „vorselektiert“ und weichen deshalb in der Häufigkeit der renalen Grunderkrankungen ab. Mit 31 % ist die chronische Glomerulonephritis (GN) die häufigste Grunderkrankung, während die übrigen Glomerulonephritiden, wie die mesangial proliferative GN und fokal sklerosierende GN mit 4 % und 7 % und die perimembranöse GN mit 1 %, weniger häufig in Erscheinung treten. Den Glomerulonephritiden als Grunderkrankung folgen in unserem NTX-Kollektiv die autosomal dominanten Zystennieren mit 11 %, Schrumpfnieren unklarer

Genese mit 9%, die Nephrosklerose mit 7 %, die IgA Nephritis (Nephropathie) mit 6 % und die diabetische Nephropathie mit 3%. Die Häufigkeit aller übrigen Grunderkrankungen liegt zwischen 1-4%.

14.2 Chronische Transplantatdysfunktion, Bestimmung des NTX < 14 instabil (NTX < 14 i) Kollektives (klinisch instabil)

Die Definition der chronischen Transplantatdysfunktion erfolgt anhand funktioneller und morphologischer (histopathologischer) Merkmale. Bezeichnend für eine chronische Transplantatdysfunktion ist die Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und ein verminderter renaler Plasmafluss. Daneben kommt es zum Anstieg der Nierenretentionswerte (Kreatinin, Cystatin C, Harnstoff) und einer verstärkten Proteinausscheidung im Harn (meistens glomeruläres Proteinurieprofil; Scherberich J.E.: www.proteinurie.de). Histologisch finden sich Hyalinose und entzündliche Infiltrate (Lymphozyten, dendritische Zellen, Makrophagen) im Bereich der Nierengefäße, eine zunehmende Glomerulosklerose, eine interstitielle Fibrosierung und eine Tubulusatrophie (Racusen L.C., Regele H. 2010). Chronisch proliferative Veränderungen, die zu Beginn noch wenige zelluläre Infiltrationen aufweisen, überwiegen (Lee S.B., Kalluri R. 2010), wie z.B. die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen (Tilney N.L. 1991, Hayry P. 1992, Paul L.C. 1992, Scherberich J.E. et al. 1990). Klinisch lässt sich neben einer progredienten Verschlechterung der Transplantatfunktion regelhaft eine arterielle Hypertonie feststellen (Paul L.C. 1995, 2001). Die regelmäßige Bestimmung der Nierenretentionswerte gehört zur TX-Nachsorge. Aus unserem Gesamtkollektiv von 130 NTX Patienten ermittelten wir mithilfe zuvor genau definierter Konstellation klinischer und laborchemischer Parameter eine Subpopulation von 24 Nierentransplantierten, die als „instabil“ klassifiziert wurde.
Selektionskriterien für eine „instabile“ bzw. einen eher „ungünstig zu erwartenden“ klinischen Verlauf waren:

- Erhöhung des Kreatinin (S) Median $\geq$ 0,3 mg / dl innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von einem Jahr
- Verdoppelung des Albumin (U; Protein-Kreatinin-Index) innerhalb eines Jahres
- Verdoppelung des alpha-1-Mikroglobulin (U; Protein-Kreatinin-Index)) innerhalb eines Jahres

Aufgrund dieser Kriterien, sowie des Gesamtbildes dieser Patienten (unselektive glomerulotubuläre PU), definierten wir eine beginnende oder bereits fortschreitende chronische Transplantatdysfunktion. Innerhalb des Beobachtungszeitraumes von (nur) drei Jahren ereigneten sich in unserem Gesamtkollektiv insgesamt 14 Transplantatverluste. Davon ereigneten sich 8 Transplantatverluste in diesem von uns definierten Kollektiv von 24 NTX < 14 i (instabil) Patienten. Die gewählten Kriterien stimmen damit genau mit der

Beschreibung einer „instabilen Transplantatfunktion“ (chron. progrediente Transplantatdysfunktion) überein.

14.3 Chronische Transplantatdysfunktion als Folge einer chronischen Abstoßung

Das chronische Transplantatversagen ist ein multifaktorielles Geschehen, dem sowohl immunologische wie auch nicht-immunologische Ursachen zugrunde liegen.
In der Pathophysiologie einer chronischen Transplantatdysfunktion sind hierbei sowohl humorale als auch zellvermittelte Abstoßungsmechanismen beteiligt (Safinia N. et al. 2010, Colvin R.B. et al. 2010). Neben den MHC-Klasse I/II Antigenen, sind auch sog. „non-MHC-Moleküle“ an dem chronischen Abstoßungsprozess beteiligt (Gärtner H.V. 2003). Vor dem Hintergrund immunologischer Parameter Nierentransplantierter mit einem Transplantatüberleben von > 14 Jahren untersuchten wir zellimmunologische Merkmale auf CD14++ Monozyten, wie auf CD14++CD16+ und CD14+16++ (CD14dimCD16++) Monozyten. Scherberich et al. stellten in ihren Untersuchungen an NTX Patienten einen signifikant höheren Anteil proinflammatorischer CD14++CD16+ Monozyten fest ungeachtet einer durch Blutspiegelmessungen „optimierten“ Immunsuppression, und beschrieben diesen Phänotyp als potenziellen zellulären Marker für die Transplantatprognose (Scherberich J.E. 2004). Neben T-Zellen und (mutmaßlich B-Zellen) stehen Monozyten / Makrophagen als wesentliche Ziel- und Effektorzellen bei chronischer Transplantatdysfunktion im Mittelpunkt (Safina N et al. 2010; Colvin RB et al. 2010).

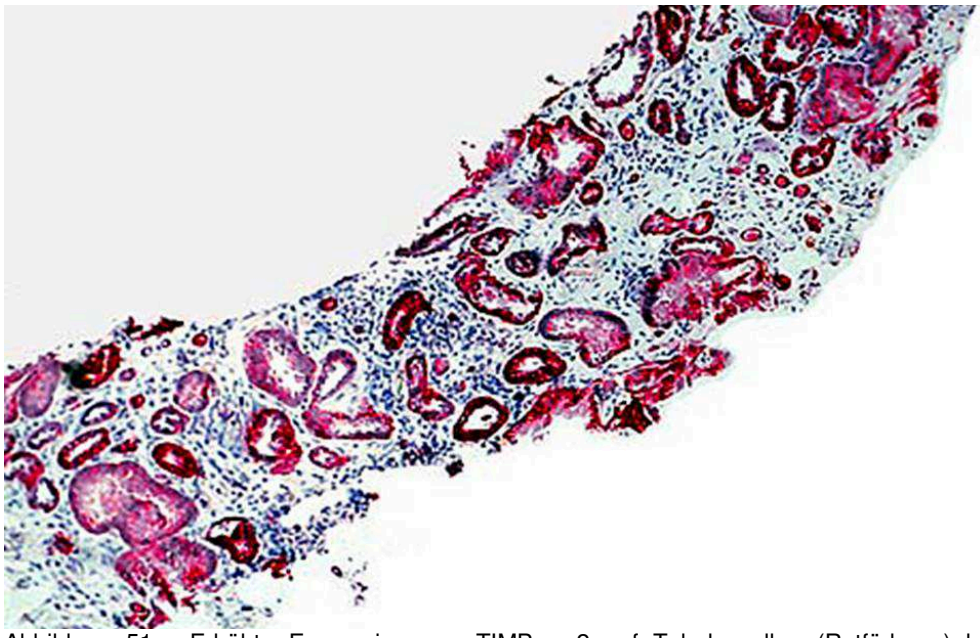


Abbildung 51: Erhöhte Expression von TIMP – 2 auf Tubuluszellen (Rotfärbung) bei chronischer TX-Dysfunktion (akzelerierte Abstoßung). TIMP hemmt renale Matrixmetalloproteasen; bei Imbalanz wird daher eine interstitielle Fibrose (hellblau) gefördert, Immunhistochemische Darstellung; Vergröß. x 80fach. (Abb. Prof. J. Scherberich)

Für die zuverlässige Erkennung einer TX-Dysfunktion, ihrer Progression (Prognose) ist das z.Z. verfügbar „immunologische Monitoring“ und die Anwendung potenzieller „Biomarker“ unverändert unbefriedigend (Bestard O. et al., 2010; Mannon R.B. 2010; Alachkar N. et al. 2011).

14.4 Serologische Parameter und Proteinausscheidungsmuster der NTX Patienten

Die Untersuchung serologischer Standardparameter und des Proteinausscheidungsmusters im Harn in regelmäßigen Abständen diente der Verlaufskontrolle (-Beobachtung) der Transplantatfunktion. Daneben ermöglicht das „Monitoring“ der Serumkonzentrationen von Immunsuppressiva (soweit möglich), wie stets erfolgt, während der Erhaltungstherapie der optimalen Einstellung der Wirkdosis. In unserer Untersuchung verfolgten wir (klinisch-chemisches Basisprotokoll) über einen *jahrelangen* Zeitraum sowohl traditionelle serologische Messgrößen („Surrogatparameter“) als auch die Proteinausscheidungsmuster (quantitativ Gesamtprotein, IgG, Albumin, alpha-1-Mikroglobulin) von 130 NTX Patienten.

14.5 Vergleich klinischer Surrogat-Marker (u.a. Blutbild, Proteinurie) innerhalb der NTX-Beobachtungszeit

Die Analysen klinischer Parameter über einen Zeitraum von drei Jahren dienten primär dazu die Entwicklung einer möglichen chronischen Transplantatdysfunktion zu erkennen und zu verfolgen. Verglichen wurden die unterschiedlichen vier NTX Subgruppen (NTX 1-4, NTX 5-8, NTX 9-13, NTX > 14). Primäres Einteilungsmerkmal war der Zeitraum nach Organtransplantation; das sog. „Transplantatalter“. Im Durchschnitt endet ein Nierentransplantat nach 8-10 Jahren in einer chronischen Transplantatdysfunktion: Der Patient wird wieder nierenersatzpflichtig.

Vergleicht man die Subgruppe der NTX > 14 Patienten untereinander (getrennt nach Patienten mit einem NTX > 14 *guten* und NTX > 14 *schlechten* Verlauf aufgrund der in der Methodik aufgeführten Kriterien, werden für beide Gruppen signifikante Unterschiede der Messgrößen von Krea (S) ($p \leq 0{,}001$), Harnstoff (S) ($p \leq 0{,}001$), Phosphat (S) ($p \leq 0{,}018$) und alpha1-Mikroglobulin (U) ($p \leq 0{,}027$) (Tabelle 18, S. 108) evident. Dagegen weisen die übrigen analysierten Blutparameter wie Gesamtcalcium (S), CRP (S) sowie das Gesamteiweiß im Harn und Albumin (U), keine Unterschiede auf. Erst die Einbeziehung der weiteren NTX-Kollektive (NTX 1-4 Jahre, NTX 5-8 Jahre, NTX 9-13 Jahre) lässt

erkennen, dass mit zunehmendem Transplantatalter diversifizierte Verläufe auftreten, nämlich eine Aufteilung in stabile und in instabile Funktionsverläufe.

Der Vergleich der NTX 1-4 Jahre Patienten mit *guter* NT Funktion und der NTX 1-4 Jahre Patienten mit *instabilen* Verlauf der NT-Funktion, lässt noch keine Beziehung zwischen den Blutparametern (Ausnahme Ca^{++} im Serum, Abb. 22a S. 107) oder der Proteinurie erkennen. Dies liegt an der noch relativ guten Organfunktion in den ersten Jahren nach erfolgter Transplantation.

Der direkte Vergleich in der *NTX 5-8* Jahren Gruppe (guter Verlauf der NT-Funktion gegen instabilen Verlauf der NT-Funktion) lässt dagegen statistisch signifikante Unterschiede im Ausmaß der Proteinurie erkennen: So ist in der Gruppe der *NTX 5-8* Jahren mit instabiler Transplantatfunktion die Gesamteiweissauscheidung im Harn (erwartungsgemäß) gegenüber der „klinisch stabilen“ Gruppe ($p \leq 0{,}000$), des Albumins (U) ($p \leq 0{,}025$) und alpha-1-Mikroglobulins (U) ($p \leq 0{,}015$) vermehrt (Tab. 20, S. 108). Vergleicht man die Gruppe der *NTX 9-13* Patienten, verfestigt sich dieser Trend, der schon in der Gruppe der *NTX 5-8* Jahren beobachtet wurde. Die Verschlechterung der Serumkonzentrationen von Kreatinin ($p \leq 0{,}000$), Harnstoff (S) ($p \leq 0{,}000$) der Harnsäure (S) ($p \leq 0{,}055$), wie auch des Gesamteiweißes im Harn(U) ($p \leq 0{,}008$), Albumins (U) ($p \leq 0{,}002$) und des alpha-1 Mikroglobulins (U) ($p \leq 0{,}006$) zeigen in der Gruppe der NTX 9-13 Jahren mit einer instabilen Transplantatfunktion im Vergleich zur stabilen NTX 9-13 Jahre Patientengruppe in die gleiche Richtung (Tab. 21, S. 108). Betrachtet man beide Gruppen zusammen (NTX 5-8 Jahre Patienten im Vergleich zur Subpopulation NTX 9-13 Jahre Patienten), lässt sich die Progression der Transplantatdysfunktion bis hin zum Verlust des Transplantates eindeutig erkennen. So sind in der Gruppe der NTX 9-13 Jahren mit schlechtem Transplantatverlauf das Serumkreatinin und die Proteinausscheidung im Harn erhöht. Ebenfalls erkennen lässt sich die progressive Verschlechterung der Transplantatdysfunktion im Vergleich der Gruppe der *NTX 1-4 Jahren mit einem guten Verlauf* und der Gruppe der *NTX 9-13 Jahren Patienten mit schlechtem Transplantatverlauf* (Tab. 27, S. 111) . Aus der Betrachtung der Serumparameter und der differenzierten Proteinurie (Ausscheidungsprofil) dieser beiden Gruppen lässt sich die Zunahme an Patienten mit einer chronischen Transplantatdysfunktion ableiten. Die Proteinurie (Gesamteiweiß, Albumin und alpha-1-Mikroglobulin) und das Serumkreatinin, (als wichtigste Indikatoren der Transplantatfunktion in der Gruppe der instabilen NTX 9-13 Jahren Patienten) sind signifikant ($p \leq 0{,}022$, $p \leq 0{,}007$, $p \leq 0{,}036$) gegenüber dem Vergleichskollektiv Kurzzeit-transplantierter mit guter Transplantatfunktion (NTX 1-4 guter Verlauf) erhöht (Tab. 27, S. 111).

CRP und NTX-Langzeitfunktion:

In unserem Gesamtkollektiv ließ sich das Serum-CRP als unspezifischer „Inflammations-Marker“ nicht direkt mit einer Verschlechterung der Transplantatfunktion, und somit als potenzielle Marker für die chronische Transplantatdysfunktion, in Verbindung bringen.

Serum-Calcium und NTX-Verlauf:

Verlauf der Serumcalcium-Konzentration über die Beobachtungsjahre: Es wird deutlich, dass mit zunehmendem Transplantatalter und einer Verschlechterung der Organfunktion die Konzentration des Serumcalcium *abnimmt*. Während in der Gruppe der NTX 1-4 Jahren und in der Gruppe der NTX 5-8 Jahren signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Subgruppen bestehen, wird dieser Unterschied in der Konzentration zwischen den Subgruppen mit zunehmendem Transplantatalter 9-13 Jahren geringer. Die Gruppe der NTX 9-13 Jahren Patienten weist die niedrigsten Calciumkonzentrationen im Serum aller Gruppen. Die Gruppe der NTX > 14 Jahre Patienten dagegen weist im Serum konstante Calciumkonzentrationen ähnlich der Gruppe der NTX 1-4 Jahren mit einer guten Organfunktion (Tab. 22a, Tab. 22b, S.107). Pathophysiologischer Hintergrund kann eine Imbalanz im Calcium- Phosphat- PTH- Vit D Segment sein.

Die Zusammensetzung des Harns Nierentransplantierter enthält wertvolle Informationen in Form von Proteinen, kleinen Peptiden und weiterer Moleküle, welche für die Verlaufsbeobachtung der NT-Funktion eine wichtige Funktion spielen können. Die Grenzwerte der Eiweißausscheidung für Nierentransplantierte entsprechen den Grenzwerten gesunder Patienten. Eine hohe Eiweißausscheidung nach Nierentransplantation ist in den ersten Wochen zu erwarten, jedoch gibt es keine einheitliche Grenzwerte für die Definition einer Eiweißausscheidung nach Organaufnahme (Knoll G. 2009). Die Prävalenz der Eiweißausscheidung ist in der NTX-Population häufiger als bei Gesunden und entspricht der Proteinurie, die bei Niereninsuffizienten mit einer chronischen Nierendysfunktion die unmittelbar vor der Dialyse stehen (Boulware E. 2003, Knoll G. 2009). Dabei korreliert das Ausmaß der Eiweißausscheidung unmittelbar mit den histologischen Merkmalen einer Glomerulonephritis des Transplantates und weniger mit einer interstitiellen Fibrosierung oder Atrophie (Amer H. 2007). Der Verlauf der Eiweißausscheidung kann als ein Indikator für den Funktionsverlauf des Transplantates herangezogen werden. Park et al. konnte in seinen Untersuchungen eine erhöhte 5-Jahres-Überlebensrate bei Nierentransplantierten mit einer Proteinurie niedriger als 1 g/d als bei Nierentransplantierten mit einer höheren Eiweißausscheidung (>1g/d) feststellen (Park J.H. 2000). Ähnliche Ergebnisse werden durch weitere Studien untermauert. Welche Effekte die verstärkte Proteinurie im Transplantat bzw. welche Mechanismen hierdurch „aktiviert“ werden, ist bis zum heutigen Zeitpunkt noch unklar. Es wird jedoch ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Proteinurie und einer verstärkten Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen diskutiert, die wiederum zu einer interstitiellen Fibrosierung führen (Knoll G. 2009). Faktoren die eine erhöhte Eiweißausscheidung begünstigen sind ein erhöhter arterieller Blutdruck, kalte und

warme Ischämiezeiten, Spenderalter und das Serumkreatinin (Amer H. 2007, Halimi J.M. 2005). Weiterführende Untersuchungen sind hierfür notwendig.
Die Ausscheidung von Albumin im Harn Nierentransplantierter kann als ein weiterer Faktor für den Funktionsverlauf -ähnlich der Gesamteiweißausscheidung- herangezogen werden. Eine Albuminausscheidung im Harn Nierentransplantierter korreliert mit einer erhöhten Kreatininkonzentration im Serum und einem erhöhten Risiko eines Transplantatverlustes. Dies konnten sowohl Untersuchungen um die Arbeitsgruppe um Halimi et al., und um die Arbeitsgruppe Fellström et al. unabhängig voneinander feststellen (Halimi J.H. 2005, Fellström B. 2005). Auch hierzu sind weiterführende Untersuchungen notwendig.
Zunehmendes Transplantatalter (Alter nach Organtransplantation) ist *per se* **nicht** gleich zusetzen mit einer progredienten Verschlechterung der Organfunktion. Die klinische Beobachtung unserer Nierentransplantierter mit einem Transplantatalter von über 14 Jahren bestätigt diese Feststellung. Bei Langzeittransplantierten ist zwar die Gesamteiweißausscheidung im Harn von 0,5 gr/dl (Medianwert) im Vergleich zu Kurzzeittransplantierten erhöht. Diese geringgradige Proteinurie ist jedoch offenbar kein Progressionsfaktor. Auffällig ist die konstant fehlende oder nur *geringe* Ausscheidung an alpha1-Mikroglobulin in der Gruppe der NTX > 14 Jahre Patienten (Abb. 21a, S.106). Die ausbleibende „Verschlechterung“ der alpha1-Mikroglobulin Ausscheidung lässt auf einen sehr geringen oder fehlenden tubulointerstitiellen Umbau mit guter Prognose in unserem langzeittransplantierten Patientenkollektiv schließen (Abb. 19a S. 104, Abb. 20a S.105, Abb. 21a S. 106).

14.6 Vergleich zwischen den NTX-Subgruppen

Vergleicht man die vier Untergruppen der NTX-Patienten (NTX > 14, NTX 1-4, NTX 5-8 und NTX 9-13) ohne die in dieser Untersuchung erfasste Differenzierung der Gruppen in NTX Patienten mit *guten* (stabil) oder *schlechten* (instabil) Verlauf der NT-Funktion (Subgruppenanalyse), ist es nicht möglich die Progredienz der chronischen Transplantatdysfunktion zu erkennen. Diskriminierungskriterien waren das Serumkreatinin und das quantitative Proteinausscheidungsmuster im Harn (Gesamteiweißausscheidung, Albumin, alpha1-Mikroglobulin (s. Kap. 12.1ff).

14.7 Immunsuppressive Therapie

Die zur Immunsuppression verwendeten Wirkstoffe werden nach ihrer pharmakologischen Wirkung in zwei Gruppen eingeteilt, den Calcineurininhibitoren und den Antiproliferativa. Zur Gruppe der Calcineurininhibitoren gehören Cyclosporin A (Cyclosporin) und Tacrolimus und zur Gruppe der Antiproliferativa die Wirkstoffe

Azathioprin und Mycofenolat Mofetil. Darüber hinaus existieren weitere Wirkgruppen polyklonaler und monoklonaler Antikörper.
Cyclosporin A (Cyclosporin) ist eines der am häufigsten eingesetzten Immunsuppressiva. Seine Wirkungsweise beruht auf die Hemmung des Enzymes Kalzineurin, einem wichtigen intrazellulären Signalmolekül für die T-Zell-Aktivierung (Denton M.D. 1999). Die eigentliche Wirkung von Cyclosporin A beruht auf die Hemmung der IL-2 Produktion und dessen Freisetzung aus den T-Helferzellen. Intrazellulär bindet Cyclosporin an sogenanntes Immunophilin (Cyclophilin), das wiederum einen Komplex mit Kalzineurin eingeht (Andres A. 1997). Zu den (Langzeit-) gravierendsten Nebenwirkungen von Cyclosporin gehört seine Nephrotoxizität. Des Weiteren führt Cyclosporin zu einer Erhöhung des arteriellen Blutdruckes, das Auftreten einer Cholesterinämie, Diabetes mellitus, Gingivahyperplasien und Hirsutismus (Braun W.E. 2003). Darüber hinaus ist Cyclosporin neurotoxisch. Es kann zu Parästhesien und Kopfschmerzen bis hin zu Krampfanfällen führen (Karow T. 2000).
Tacrolimus (FK506) gehört ebenfalls zur Gruppe der Calcineurininhibitoren. Es handelt sich hierbei um ein makrozyklisches Lacton, welches ähnlich wie Cyclosporin, den Stoffwechsel der T-Zellen beeinflusst. Der im Zellinneren gebildete Tacrolimus-Immunophilin Komplex lagert sich an Kalzineurin an. Zu den Nebenwirkungen von Tacrolimus gehören ebenfalls Nephrotoxizität und Neurotoxizität. Daneben können Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypomagnesiämie und Hyperglykämie auftreten (Kino T. 1987). Es ist sehr Effektiv in der Verhinderung von akuten Abstoßungen und wirkt schon wenige Tage nach Einnahme. Deshalb ist auch eine parallele Einnahme zu Azathioprin möglich. Trotz seiner Nebenwirkungen ist sein Nebenwirkungsprofil wesentlicher günstiger (Magee C.C. 2004).
Azathioprin gehört zur Gruppe der Antiproliferativa und blockiert die Synthese von DNA und RNA, und somit die Vermehrung von T- und B-Lymphozyten. Seine Wirkungsweise ist noch nicht geklärt. Es werden mehrere Mechanismen zugrunde gelegt, wobei die Hemmung mehrerer Stufen der Nukleinsäure-Biosynthese und der Proliferation von T- und B-Lymphozyten, für seine immunologische Wirkung verantwortlich ist. Nebenwirkungen der immunsuppressiven Therapie mit Azathioprin können zu Veränderungen der Blutparameter, erhöhtes Infektionsrisiko, intrahepatischer Cholestase, Entzündung der Bauchspeicheldrüse, Übelkeit und Erbrechen führen.
Mycofenolat Mofetil gehört ebenfalls zur Gruppe der Antiproliferativa. Es handelt sich hierbei um eine Esterverbindung, die im Organismus zu Mycophenolsäure umgewandelt wird. Mycophenolsäure ist ein nicht selektiver, nicht kompetitiver und reversibler Hemmer der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH). Mycophenolsäure hemmt somit die Synthese der Guanin-enthaltenden Nukleotide und wirkt auf die Proliferation von T- und B-Lymphozyten zytostatisch. Zu den Nebenwirkungen der Anwendung mit Mycofenolat Mofetil (MMF) gehören Thrombozytopenie, Anämie, Übelkeit und Erbrechen und das vermehrte Auftreten von Infektionen (Alison A. 1991, Eugui E. 1991).
Rapamycin: Es handelt sich um ein Makrolidantibiotikum aus Streptomyceten als Bestandteil eines Bodenpilzes. Rapamycin unterbindet die Protein- als auch die DNA-Synthese und arretiert die T-Zelle, indem es eine Reihe von zytokinvermittelten Signaltransduktionswegen hemmt. Seine Nephrotoxizität ist, verglichen mit den Calcineurininhibitoren, dem Transplantat gegenüber geringer hat allerdings erhebliche Auswirkungen auf den Lipidstoffwechsel. Durch seine antiproliferative Wirkungsweise vermag Rampamycin die Neovaskularisation bestimmter Tumore zu hemmen (Seghal S.N. 1998)

14.8 Immunsuppressive Therapie Nierentransplantierter

Die Modulation des Immunsystems mit Immunsuppressiva nach erfolgter Nierentransplantation ist von verschiedenen postoperativen Phasen abhängig. In der frühen Phase nach Transplantation ist eine intensive immunmodulatorische Therapie notwendig um die Abstoßung des Transplantates zu kontrollieren. In der späteren Phase der Transplantation wird diese der Erhaltungstherapie adaptiert. Kombinationstherapien mit unterschiedlichen Wirkgruppen dienen dabei zur Langzeiterhaltung des Transplantates und zur Abschwächung der durch diese verursachten Nebenwirkungen. Akute Abstoßungsreaktionen führen zu einer Veränderung der

eingesetzten Kombinationen und Dosierungen von Immunsuppressiva. Zusätzlich können, abhängig vom individuellen Risiko der Transplantatabstoßung, Kortikoide zur Anwendung kommen.
Glucokortikoide gehören zur Gruppe der Steroidhormone und werden bei nierentransplantierten Patienten in der Initialphase nach einer Organübertragung angewendet. Kortikoide kommen in Kombination mit Immunsuppressiva auch während einer Abstoßungsreaktion zum Einsatz. Jedoch ist der langfristige Einsatz von Kortikoiden mit Nebenwirkungen verbunden wie Veränderungen der klinsich-chemischen Blutparameter, Osteoporose, Gewichtszunahme, Glucoseintoleranz, erhöhtes Infektionsrisiko.

14.9 Transplantatüberleben und Immunsuppression (Darstellung nach Kaplan-Meier)

Das in unserer Studie untersuchte Patientenkollektiv von 130 NTX Patienten wurde mit Immunsuppressiva aus der Gruppe der Calcineurininhibitoren und der Antiproliferativa behandelt. Daneben wurden in bestimmten Fällen auch Kortikoide angewendet. Wir unterteilten unsere NTX-Patienten in vier Gruppen:

- Einfachimmunsuppression
- Einfachimmunsuppression plus Glucokortikoid
- Zweifachimmunsuppression
- Zweifachimmunsuppression plus Glucokortikoid

Wir untersuchten das Transplantatüberleben von 130 NTX Patienten prospektiv in einem Beobachtungszeitraum von drei Jahren. Das Überleben des Transplantates, abhängig von der angewendeten Immunsuppression wurde über eine Kaplan-Meier-Funktion dargestellt. Als Ereignis definierten wir das „Ausscheiden“ des Patienten aufgrund eines vollständigen Funktionsverlustes (Dialysepflichtigkeit) oder das Versterben des Patienten. Patienten mit einer Einfachtherapie in Kombination mit einem Kortikoid zeigten im Verlauf der Untersuchung das beste Transplantatüberleben, gefolgt von den NTX-Patienten, die eine Zweifachtherapie erhielten. Patienten, die eine Zweifachtherapie mit einer Kombination aus Immunsuppression und einem Glucokortikoid erhielten, hatten dagegen das schlechteste Transplantatüberleben. Vergleichbare Ergebnisse wiesen auch NTX Patienten auf, die ausschließlich eine Monotherapie mit einem Immunsuppressivum erhielten (s. Kap. 13.10ff).

14.10 Vergleich der Transplantatüberleben NTX > 14 Jahren Patienten und NTX < 14 mit instabiler NT Funktion

Aufgrund der relativen Häufigkeit eines Transplantatverlustes in der von uns definierten Gruppe NTX < 14 Jahre mit instabiler Organfunktion (NTX < 14 Jahre instabil), verglichen wir das Transplantatüberleben zur Gruppe der NTX > 14 Jahre in Abhängigkeit der angewendeten Immunmodulation. Betrachtet man nur diese beide Gruppen aus dem

Gesamtkollektiv, so erkennt man, dass die Patienten die ausschließlich eine immunsuppressive Monotherapie erhielten, das beste Transplantatüberleben hatten, gefolgt von den Patienten mit einer Zweifachimmunsuppression und einem Glucokortikoid. Das schlechteste Transplantatüberleben wiesen die NTX-Patienten die eine Einfachimmunsuppression mit einem Kortikoid erhielten, gefolgt von den Patienten mit einer Zweifachimmunsuppression ohne Glucokortikoid (Kap. 13.9, Tab.33 Abb. 26 S.120).

14.11 Gesamte CD 14 Expression zirkulierender Blutmonozyten der NTX > 14 Jahre Gruppe versus NTX < 14 Jahre mit einer instabilen (NTX < 14 i) NT Funktion

Die CD14 Expression auf Blutmonozyten der NTX> 14 Jahre Patientengruppe, wie auch der NTX < 14 Jahre Patienten mit einer instabilen NT Funktion, ist im Vergleich zur CD14 Expression gesunder Probanden vermindert. Auch der Vergleich zur Gruppe niereninsuffizienter Patienten (NI) und Hämodialysepatienten (HD) zeigt eine **verminderte CD14** Expression auf den Monozyten Langzeittransplantierter (Abb. 39 S. 127). Dies kann auf eine mögliche Toleranzentwicklung gegenüber Endotoxin hinweisen und interferiert mit der immunsuppressiven Medikation. Der direkte Vergleich der NTX> 14 Jahre Gruppe zu Gesunden und Hämodialysepatienten, zeigt eine signifikant verminderte monozytäre CD14 Expression in der NTX-Gruppe ($p \leq 0{,}000$ Tab. 58 S. 136, $p \leq 0{,}000$ Tab. 60 S. 137). Gegenüber Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (NI) fällt dieser Unterschied weniger stark aus ($p \leq 0{,}089$ Tab. 59 S. 136). Dennoch bleibt die Tendenz der NTX > 14 Patienten gegenüber Niereninsuffizienten zu niedrigeren CD 14 Expressionen erkennbar (Abb. 29 S. 127). In der Gruppe der NTX < 14 Jahre mit instabiler NT Funktion zeigt sich ein ähnliches Bild. Der Vergleich zu den Subgruppen Gesunder und HD Patienten zeigt für die NTX < 14 i eine verminderte CD14 Expression ($p \leq 0{,}00$ Tab. 63 S. 138, $p \leq 0{,}00$ Tab. 65 S. 139). Gegenüber NI Patienten erkennt man ebenfalls in Gruppe der NTX < 14 Jahre mit instabiler NT Funktion eine Tendenz ($p \leq 0{,}072$ Tab. 64 S. 138) zu geringeren monozytären CD14 Expressionen (Abb. 29 S. 127).

Insgesamt haben demnach NTX Patienten durchschnittlich eine verminderte CD14 Expression auf zirkulierenden Blutmonozyten. Vergleichsweise hierzu haben hämodialysierte Patienten eine erhöhte CD14 Expression auf ihren Blutmonozyten (Nockher et al. 1997, Ulrich C. 2008), welche als Zeichen einer chronisch systemischen Mikroinflammation betrachtet werden kann. Die chronisch systemische Mikroinflammation im NTX-Gewebe ist laborchemisch durch einen erhöhten CRP-Spiegel und eine Erhöhung weiterer Akute-Phase-Proteine wie z.B. SAA (Serum Amyloid A) charakterisiert. Als Ursache für diesen Status der „Mikroinflammation“ ist die verstärkte Freisetzung humoraler Faktoren wie z.B. proinflammatorische Zytokine (IL-6, IL-1, TNF-α). Ebenfalls begünstigt wird diese Mikroinflammation durch einen vermehrten Anteil CD14++CD16+ zirkulierender Blutmonozyten im Vergleich zur gesamten CD14++ Population. CD14++CD16+ exprimierende Monozyten werden im Vergleich zu CD 14++ Monozyten als reife Monozyten betrachtet, die für eine hohe Produktion proinflammatorischer Zytokine verantwortlich sind (U. Sester 2001). Die niedrige CD14 Gesamtexpression ist unabhängig

der immunsuppressiven Therapie, steht jedoch in Kontrast zur erhöhten pro-inflammatorischen Aktivität von NTX Patienten. Die CD14 Expression ist sowohl bei NTX Patienten als auch Niereninsuffizienten (ohne Hämodialyse) herunterreguliert. Die verstärkte Präsentation proinflammatorischer Monozyten / reifer Gewebsmakrophagen bei NTX Patienten, ist wesentlich aussagekräftiger über den Status des NTX als die bisherige klinische Betrachtung humoraler Faktoren (wie z.B. CRP, SAA, IL-6, IL-18), bezogen auf den Transplantatverlauf und der Entwicklung einer interstitiellen Fibrose (Scherberich J.E., Rosskopf S. 2004). Nierentransplantate mit chronischer Transplantatdysfunktion weisen eine starke Akkumulation CD14++CD16+ exprimierender Monozyten im Nierenparenchym aus. Diese können sowohl die einzelnen Glomeruli durchsetzen, als auch das Tubulointerstitium infiltrieren (Chenchanna-Merzhäuser 2006; Scherberich J.E., Estner H. 2004). Das histologische Bild der zellulären Infiltration eines Nierentransplantates während einer akuten Abstoßungsreaktion prägen nicht ausschließlich Monozyten / Makrophagen, sondern auch T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und NK–Zellen. Jedoch hat die Infiltration mit T-Lymphozyten keinen ausschlaggebenden Effekt auf den Verlauf einer akuten Abstoßungsreaktion, im Vergleich zur monozytären Infiltration des Transplantates. Diese macht sich ganz besonders in späteren NTX Stadien, im Rahmen einer TX-Dysfunktion, bemerkbar. Erst die verstärkte Infiltration antigenpräsentierender Blutmonozyten (CD14++CD16+) und die daraus resultierende Ausschüttung von Zytokinen, amplifiziert die Wirkung der T-Lymphozyten im Nierengewebe (Girlanda R. 2008). Mit zunehmenden Transplantatalter nimmt die Anzahl zirkulierender CD14 exprimierender Monozyten ab. Scherberich et al. konnten dies im Zusammenhang mit einer gleichzeitigen Abnahme des humoralen Faktors CRP beobachten. Die Anzahl proinflammatorischer CD14++CD16+ exprimierender Monozyten nimmt dagegen mit zunehmenden Alter des Nierentransplantates zu, was auf eine „diagnostische Unsicherheit“ in der prognostischen Bewertung humoraler und zellulärer Faktoren deutet. Die CD14++CD16+ Expression von Blutmonozyten kann, im Gegensatz zu den bisher bekannten humoralen Faktoren, zur wesentlich besseren Verlaufskontrolle eines Nierentransplantates herangezogen werden. Die erhöhte Expression proinflammatorischer Monozyten, welche als „reife“ Monozyten im Vergleich zu den weniger potenten jungen CD14++CD16+ Zellen eine höhere phagozytotischer Kompetenz und Nähe zu dendritischen Zellen haben, kann krankhafte Bedingungen des Nierentransplantates bzw. krankhafte Prozesse innerhalb des NTX, wahrscheinlich besser erfassen (Scherberich J.E., Estner H. 2004). Die Akkumulation und Proliferation aktivierter CD14++CD16+ Monozyten mit ihrer Nähe zu Gewebsmakrophagen innerhalb der Glomeruli und des Tubulointerstitiums führt in aller Regel zum Untergang von Nierengewebe. Die darüber hinaus verstärkte Freisetzung von Zytokinen und Wachstums-faktoren amplifiziert den progressiven Zelluntergang (unterstützt durch T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und NK-Zellen), eine interstitielle Fibrose, mikrovaskuläre Calcifizierung und

Glomerusklerose (Nockher W.A. 1999). Hierzu sind jedoch weitere Untersuchungen nötig. Eine niedrigere CD14 Expression auf Blutmonozyten lässt sich ebenfalls bei Nierenkranken mit einer geringradigen Nierendysfunktion beobachten, was als Zeichen einer „Immundefizienz“ bzw. „adaptiven Toleranz“ interpretiert werden kann (Scherberich J.E., Estner H. 2004). Die Behandlung einer Entzündungsreaktion bei NTX Patienten mit Glucokortikoiden reguliert die CD14 Expression auf Blutmonozyten, die Konzentration des löslichen sCD14, sowie auch die Anzahl proinflammatorischer Monozyten akut herunter (Scherberich J.E., 2000, Nockher W.A. 1997). Betroffen ist vor allem die CD14+CD16++ exprimierende Subpopulation. Diese werden durch die therapeutische Gabe von Glucokortikoiden herunterreguliert, was wiederum zu einer abgeschwächten Immunreaktion gegenüber bakteriellen Infektionen führen kann (Nockher W.A et al. 1997). Ähnliche Befunde haben wir früher in einen anderen Zusammenhang beschrieben (Nockher W., Scherberich J.E. 1999, 2001, 2005). Eine verminderte CD14 Expression bei Nierentransplantierten, kann für eine Anfälligkeit gegenüber Infektionen und kardiovaskulärer Ereignisse verantwortlich gemacht werden (Scherberich J.E., Estner H. 2004), oder auch für eine relative Toleranzentwicklung nach NTX. Eine über CD14 und TLR-4 vermittelte Aktivierung der Zytokinsekretion wird so wahrscheinlich durch die geringere Rezeptordichte abgeschwächt (Scherberich J.E. 2008).

14.12 Monozytäre HLA DR Expression der NTX > 14 Jahre, NTX < 14 Jahre instabil Patienten und Subgruppenanalyse zu Gesunden, Niereninsuffizienten (NI) und Hämodialysepatienten (HD)

Die Expression der HLA DR Antigene auf CD14++, sowie CD14++CD16 + Monozyten der NTX > 14 Patienten ist gegenüber Gesunden erniedrigt ($p \leq 0{,}001$, $p \leq 0{,}005$ Tab. 58 S. 136). In der CD14+CD16++ Monozytengruppe zeigte die Auswertung keinen Unterschied zwischen der HLA DR Expression auf den CD14+CD16++ Monozyten Gesunder und NTX > 14 Jahre Patienten. Der Vergleich unserer NTX > 14 Patienten mit Niereninsuffizienten (NI) und Hämodialysepatienten (HD), weist für die HLA DR Expressionen (auf allen untersuchten Monozytensubpopulationen) keine Unterschiede auf. Die Häufigkeitsverteilung, der HLA DR Antigene ist in diesen Patientengruppen (NI, HD, NTX > 14) ähnlich gering im Vergleich zu Gesunden (Abb. 30 S. 127, Abb. 31 S. 128, Abb. 32 S. 128). Vergleichbar der NTX > 14 Gruppe verhält sich die HLA-DR-Expression auf CD14++ und CD14++CD16 + Monozyten in der Gruppe der NTX < 14 i (instabil) Patienten. Unsere Untersuchungen zeigten auf CD14++ und CD 14++CD16 + Monozyten einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe Gesunder ($p \leq 0{,}026$, $p \leq 0{,}02$ Tabelle 63 S. 138). Die HLA DR Expression auf den Monozyten der NTX < 14 i (instabil) Gruppe ist geringer als die Gesunder. Im Vergleich der NTX < 14 i Gruppe zur Gruppe der Hämodialysepatienten zeigt die HLA DR Expression auf CD 14++CD16+ Monozyten einen Unterschied ($p \leq 0{,}029$ Tab. 65 S. 139): Die HLA DR Expression auf Monozyten hämodialysierter Patienten ist höher als bei NTX < 14 i Patienten. Möglicherweise werden Leukozyten durch den chronischen Membrankontakt bei HD-Patienten aktiviert, woraus sich die unterschiedlichen Monozyten HLA-DR Expressionen (gegenüber NT Patienten) ergeben (Nockher W., Scherberich J. 1998) . Kein Unterschied in der Expression, der HLA DR Antigene fand, sich zwischen der Gruppe der NTX < 14 Jahre Patienten mit einer instabilen NT Funktion und niereninsuffizienten Patienten (Tab. 64 S. 138).

Langzeittransplantierte Patienten, niereninsuffiziente und hämodialysierte Patienten weisen ähnliche Expressionsprofile ihrer HLA DR Antigene auf den Monozyten. Sie sind in allen drei Patientengruppen gegenüber Gesunden vermindert. Sowohl Langzeittransplantierte als auch nierentransplantierte Patienten mit einer instabilen Transplantatfunktion haben insgesamt betrachtet geringere HLA DR Expressionen. Die grenzwertig signifikante Erhöhung der HLA-DR Expression bei Patienten mit instabiler Transplantatfunktion gegenüber Langzeittransplantierten deutet darauf hin, dass sich die Abregulation positiv auf das Transplantatüberleben ausmacht (Abb. 30 S.127, Abb. 31 S. 128, Abb. 32 S. 128).

14.13 TLR 2 Expression der klinischen Subgruppen NTX > 14 Jahre, NTX < 14 Jahre mit instabiler NT Funktion und Vergleich mit Gesunden, Niereninsuffizienten (NI) und Hämodialysepatienten (HD)

Die TLR-2 Expression der NTX > 14 Jahre Patienten auf CD14++ und CD14++CD16+ Blutmonozyten ist im Vergleich zu Gesunden unterschiedlich stark. Sowohl auf CD14++ als auch auf CD14++CD16+ exprimierenden Monozyten der NTX > 14 Jahre Gruppe ist die TLR-2 Expression signifikant niedriger als bei Gesunden ($p \leq 0{,}026$, $p \leq 0{,}045$ Tab. 58 S. 136). Dagegen zeigt die TLR-2 Expression auf den CD14+CD16++ Monozytensubsets der NTX > 14 Jahre Patienten im Vergleich zu Gesunden keinen nennenswerten Unterschied. Sowohl bei den NTX > 14 Patienten als auch bei Gesunden ist die TLR-2 Expression auf CD14+CD16++ Monozyten gleichartig verteilt (Abb. 34 S. 129, Abb. 35 S. 130, Abb. 36 S. 130). Die TLR-2 Ausprägung auf Monozyten der NTX < 14 Jahre Patienten mit instabiler NT Funktion (NTX < 14 i) ergibt in keine der untersuchten Monozytensubpopulation (CD14++, CD14++CD16+, CD14+CD16++) Unterschiede zur gesunden Vergleichsgruppe (Tab. 63 S. 138). **Vergleicht man die NTX Kollektive NTX > 14 und NTX < 14 i (instabile NT Funktion) miteinander so ergibt sich ein Unterschied zwischen der TLR-2 Expression auf CD14++ Monozyten ($p \leq 0{,}049$ Tab. 61 S. 137). Die TLR-2 Expression ist auf CD14++. Monozyten der NTX > 14 Gruppe niedriger als die von NTX < 14 i Patienten (Abb. 33 S. 129)**. Die Expression der monozytären TRL-2 Rezeptoren bei den beiden anderen untersuchten Monozytensubgruppen CD 14++CD16+ und CD14+CD16++ zeigt zwischen den NTX > 14 und NTX < 14 i (instabil) Patienten keine Unterschiede.

Die TLR-2 Expression zwischen NTX > 14 Jahre Patienten und NI Patienten auf den untersuchten Monozytensubpopulationen ist ähnlich. Ein Vergleich zwischen NTX < 14 i (instabil) Patienten und NI Patienten zeigt einen Unterschied auf CD14++ Monozyten: Die TLR-2 Expression bei den CD14++ Monozyten NTX < 14 Jahre Patienten mit einer instabilen NT Funktion, ist signifikant niedriger ($p \leq 0{,}021$ Tab. 64 S. 138) als bei Niereninsuffizienten. Vergleicht man die TLR-2 Expression zwischen der Gruppe der NTX > 14 und HD-Patienten so ergibt sich für CD14+CD16++ Monozyten Folgendes: Die Expression der TLR-2 Rezeptoren ist in der Gruppe der NTX > 14 Jahre niedriger, als auf CD14+CD16++ Monozyten von HD-Patienten($p \leq 0{,}013$ Tab. 60 S. 136). Zwischen der Gruppe der NTX < 14 i Patienten und den HD-Patienten zeigt die TLR-2 Expression auf CD14++ Zellen einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0{,}034$ Tab. 65 S. 139). Diese ist in der Gruppe der NTX < 14 i (instabil) gegenüber Hämodialysepatienten erhöht. Weitere Unterschiede, in der Ausprägung des Rezeptors auf den Monozytensubgruppen zwischen den verschiedenen Gruppen konnten nicht festgestellt werden (Abb. 33 S. 129, Abb. 34. S. 139, Abb. 35 S. 130).

Unsere durchflusszytometrischen Analysen ergaben eine geringere Expression des TLR 2 Rezeptors auf Monozyten langzeittransplantierter Patienten (im Vergleich zu instabilen Patienten). Dadurch kommt es offenbar zu einer abgeschwächten TLR 2 spezifischen Folgereaktion d.h. geringer Nf-kappa vermittelte Ausschüttung von Zytokinen. Diese Folgereaktion wirkt sich mutmaßlich langfristig positiv auf das Langzeitüberleben des Transplantates aus. Der Zusammenhang zwischen einer guten und stabilen Organfunktion nach Transplantation und einer korrespondierenden niedrigen TLR-2 Expression auf CD14++ Monozyten hatten zwischenzeitlich auch Deng et al. bei anderen Organtransplantaten aufgezeigt. Die Aktivierung der TLR-2 Rezeptoren auf Monozyten, die in das Transplantatgewebe während einer chronischen Abstoßungsreaktion infiltrieren, initiieren den ersten kritischen Schritt hin zur funktionellen Transplantatdysfunktion. Die TRL-2 bzw.TLR-4 Expression auf peripheren CD14++ Monozyten könnte künftig bei Transplantierten als ein prognostischer Faktor einer Dysfunktion verwendet werden. Steroidtherapie während einer akuten Abstoßungsreaktion bewirkt, dass die TLR-2 Expression auf den Monozyten herunterreguliert wird, um das Transplantat auf diese Weise vor den Folgen einer weiteren zellulären Infiltration zu bewahren (Deng J.F. 2007). Die Abwesenheit einer TLR-2 Expression auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) weist auf ein geringeres Risiko einer zytokinvermittelten Rejektion hin (Goldstein D. 2003). Ähnliches gilt wohl bei Lebertransplantierten. Patienten mit guter Organfunktion nach Lebertransplantation hatten eine niedrige TLR-2 Expression auf CD14++ Monozyten (Deng J.F. 2007).

Analog hierzu weisen unsere Analysen an Nierentransplantierten mit instabiler Transplantatfunktion auf eine Koinzidenz einer höheren monozytären TLR-2 Verteilung. Ihre Verteilung ähnelt derer von HD-Patienten, die ohnehin einen erhöhten latenten Entzündungsstatus haben. Die über Zytokine induzierte Wirkung TLR-2 Rezeptoren steht demnach für einen instabilen klinischen NTX-Verlauf (höhere Gesamteiweißausscheidung, alpha1-Mikroglobulin, Albumin, „creaping“ Kreatinin) im Vordergrund. TLR-2 Rezeptoren können als Detektoren für eine Vielzahl sowohl exogener als auch endogener pathogener Faktoren betrachtet werden. Diese These wird dadurch untermauert, dass TLR-2 Rezeptoren nicht nur auf antigenpräsentierende Zellen (APC) begrenzt sind, sondern auch auf epithelialen Tubuluszellen und auf Epithelzellen der Bowman`schen Kapsel, während eines ischämischen Nierenschaden, vorkommen. Diese funktionelle Hochregulierung des TLR-2 Rezeptors auf epithelialen Tubuluszellen und Epithelzellen der Bowman Kapsel lässt sich am besten durch die Akkumulation endogener Faktoren wie z.B. HSP (Heat Shock Protein) und pränekrotischer bzw. apoptotischer Zellen im Nierenparenchym während eines ischämischen Gewebeschadens erklären. Der renale Ischämie- und Reperfusionsschaden wird durch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine amplifiziert, was zum totalen Transplantatverlust führen kann. TLR-2 ist hier das wichtige

Bindeglied zwischen Parenchymschaden und einer Transplantatdysfunktion bzw. einer Abstoßungsreaktion. Dies konnten Leemans et al. bestätigt (Leemans J. 2005). In Ihren Untersuchungen fanden sie zu Beginn eines Ischämie-Reperfusionsschaden eine signifikant geringere Infiltration an Makrophagen / Granulozyten im Interstitium TLR-2 negativen Mäusen. Bestätigen ließ sich die stabile Nierenfunktion durch signifikant niedrigere Serumkreatinin- und Harnstoffwerte, welche parallel zur Gewebeinfiltration bestimmt wurden. Diese Ergebnisse untermauern substanziell unsere Beobachtungen bei langzeittransplantierten Patienten mit instabiler Organfunktion. So steht eine hohe TLR-2 Expression in direkten Zusammenhang mit der Aktivierung des Immunsystems, im Rahmen von Parenchymschäden, als Folge einer verstärkten Infiltration CD14++CD16+ Blutmonozyten als reife Gewebsmakrophagen in das NTX-Gewebe und den damit verbundenen Konsequenzen. Langzeittransplantierte profitieren durch eine geringere TRL-2 Präsentation auf den CD14 und CD 16 exprimierenden Blutmonozyten als protektiven Faktor aufgrund einer erhöhten Immuntoleranz. Eine weitere Untersuchung beschäftigte sich ebenfalls mit der Gewebsexpression von TLR 2. In dieser Studie um die Arbeitsgruppe um de Groot et al wurde ein direkter Zusammenhang zwischen einer hohen TLR-2 Expression und einer guten Organfunktion nach Transplantation festgestellt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung stehen im Gegensatz zu den Erkenntnissen unserer aktuellen und vorangegangenen Untersuchungen. Die Schlussfolgerungen aus dieser Studie waren auf mehrfache Rücksprache mit den an der Studie beteiligten Pathologen, der die immunhistologischen Untersuchungen durchführte, allerdings anhand unserer und ähnlicher abweichender Daten selbst nicht erklärbar (de Groot K. et al. 2008).

14.14 Intrazelluläre Expression von TRL 4 (CD14 Monozyten) bei NTX-Patienten > 14 Jahre, NTX < 14 Jahre mit instabiler NT Funktion und Subgruppenanalyse zu Gesunden, Niereninsuffizienten (NI) und Hämodialysepatienten (HD)

Die intrazelluläre TLR-4 Expression in den Monozytensubgruppen sowohl der NTX > 14 Jahre als auch der NTX < 14 i (instabil) Patienten ergab keinen Unterschied zur intrazellulären TLR-4 Ausprägung Gesunder. Die intrazelluläre TLR-4 Expression auf CD14++, CD14++CD16+ und CD14+CD16++ Monozyten der instabilen NTX < 14 Jahre Patienten wies eine Tendenz für eine höhere Expression des TLR-4 Rezeptors gegenüber dem gesunden Kontrollkolektiv ($p \leq 0,1$ Tab. 63 S. 138) auf. Die Verteilung der TLR-4 Rezeptoren auf den untersuchten Monozytensubgruppen zwischen den NTX > 14 Jahre und Gesunden ist dagegen vergleichbar (Abb. 36 S. 130, Abb. 37 S. 131, Abb. 38 S. 131).
Ein Vergleich zwischen der Gruppe der NTX > 14 Jahre Patienten und der Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ergab ebenfalls keinen Unterschied. Vergleicht man in diesem Zusammenhang die Patientengruppe der instabilen NTX < 14 Jahre mit der NI-Gruppe so kann ein Unterschied auf den CD14++CD16+ und den CD14+CD16++ Monozyten deutlich gemacht werden ($p \leq 0,014$, $p \leq 0,003$ Tab. 64 S. 138): Patienten mit instabiler NT Funktion haben eine höhere intrazelluläre monozytäre TLR-4 Expression. Da TLR-4 auch über einen intrazellulären Signalweg proinflammatorische Zytokine vermittelt, könnte sich hieraus das erhöhte Transplantatverlustrisiko erklären.

Der Vergleich zwischen der NTX > 14 Patientengruppe und chronische Dialysepatienten (HD-Patienten) zeigt auf allen untersuchten Monozytensubsets einen Unterschied für den intrazellulären TLR-4 Rezeptor. Die intrazelluläre TRL-4 Expression in der Gruppe der NTX > 14 Jahre Patienten ist im Vergleich zur Expression der HD-Patienten in allen untersuchten Monozytensubgruppen (CD14++, CD14++CD16+, CD 14+CD16++) signifikant vermindert ($p \leq 0{,}065$, $p \leq 0{,}001$, $p \leq 0{,}000$ Tab. 60 S. 136). Im Vergleich zu allen anderen hier untersuchten Patientengruppen haben HD-Patienten die höchste intrazelluläre TLR-4 Rezeptordichte peripherer Blutmonozyten. Die intrazellulären TLR-4 Expressionen der instabilen NTX < 14 Patientengruppe (NTX < 14 i) unterschied sich von der Gruppe der HD-Patienten; d.h. die Verteilung der intrazellulären TLR-4 Rezeptoren ist bei beiden Gruppen im „proentzündlichen Bereich“ (Abb. 36 S. 130, Abb. 37 S. 131, Abb. 38 S. 131).

Dialysepatienten leiden typischerweise an einer chronisch entzündlichen sog. „**Mikro-inflammation“**, deren Hintergründe noch nicht vollständig geklärt sind: Beteiligt sind u.a. der periodisch wiederkehrende Kontakt von Leukozyten mit künstlichen Membranoberflächen, die Monozyten und Granulozyten aktivieren und Zytokine freisetzen, die Akkumulation potenziell zytotoxischer Substanzen (freie-L-Ketten, ß2-Mikroglobulin, Polyamine), endotheltoxisches asymmetrisches Dimethyl-Arginin, Protein/Peptidfragmente, die die Phagozytose hemmen, Dyslipidämie mit erhöhten proatherogenen LDL-Subfraktionen (Typ 5,6-small dense Lipoproteine), erhöhte Blutspiegel an Endotoxinen etc.

Ähnlich wie Nierentransplantierte haben Dialysepatienten ein erhöhtes Infektionsrisiko. Auch eine optimierte Immunsuppression kann nach Nierentransplantation eine ständige proentzündliche Aktivität peripherer Blutmonozyten des Empfängers **nicht** vollständig unterdrücken (Scherberich J.E., Estner H. 2004.). Wahrscheinlich sind hierbei u.a. empfängerseitige Immunreaktionen gegen lösliche und gewebsgebundene Alloantigene des Transplantats mit verantwortlich, d.h. eine vollständige Immuntoleranz ist auch durch die chronische Immunsuppression nicht gewährleistet. Die erhöhte monozytäre TLR 4 Expression kann hierbei im Zusammenhang stehen. Die intrazelluläre Expression des monozytären TLR 4 Rezeptors ist bei langzeittransplantierten Patienten verglichen zu allen anderen Patientengruppen (instabile NTX Gruppe, HD, NI) geringer. Nierentransplantierte Patienten mit **instabiler** Transplantatfunktion (damit mutmasslich progredienter Transplantatdysfunktion) haben dagegen eine sehr **hohe** Expression des intrazellulären TLR 4 Rezeptors zirkulierender Monozyten (Tab. 52 S. 125, Abb. 36 S. 130, Abb. 37 S 131, Abb. 38 S. 131). Untersuchungen der Studiengruppe um Braudeau et al (2008) und Nogueira et al.(2010) bestätigen unsere Ergebnisse. Eine erhöhte TRL4 Expression geht mit einem langfristig progredienten Organ(funktions)verlust einher (Braudeau C. 2008). Zudem ist unter akuten Abstossungsreaktionen gewebsständig im Transplantat die TLR-4 Expression erhöht (Dessing M.C. et al. 2010)

Die Kooperation zwischen CD14 Epitop, einem transmembranalen TLR-4 Rezeptor, und MD-2 ist von zentraler Bedeutung für die Erkennung bakterieller LPS (Endotoxin, gebunden an LPB). TLR-4 tritt nicht nur als ein extrazellulärer Rezeptor in Erscheinung,

sondern zeigt im Gegensatz zu TLR-2 auch eine intrazelluläre Funktion. Arbeiten um die Arbeitsgruppe um Duzendorfer et al. konnten diese zusätzliche intrazelluläre Funktion von TLR-4 an koronalen Epithelzellen nachweisen. Wahrscheinlich gewährleistet der intrazelluläre TLR-4 Rezeptor einen adäquaten Abbau intrazellulärer Antigene, z.B. HSP60 (Duzendorfer 2004b). Die intrazelluläre Expression der monozytären TLR-4 Rezeptoren ist bei Langzeittransplantierten, verglichen zu allen anderen Patientengruppen (instabil NT, HD, NI), geringer. Nierentransplantierte Patienten mit instabiler Transplantatfunktion weisen dagegen eine hohe Expression der intrazellulären TLR-4 Rezeptoren. Untersuchungen um die Studiengruppe um Braudeau et al. bestätigen unsere Ergebnisse. Eine erhöhte TRL-4 Expression geht mit einen langfristig progredienten Organverlust nach Nierentransplantation einher (Braudeau C. 2008).

Ähnlich den instabilen NTX-Patienten verhält sich die Verteilung des intrazellulären TLR-4 Rezeptors bei hämodialysierten Patienten. Hämodialysierte und instabile NT Patienten mit einem Transplantatüberleben von NTX< 14 Jahren, zeigen die höchsten Expressionen (Abb. 36 S. 130, Abb. 37 S 131, Abb. 38 S. 131). Vergleichbare Untersuchungen, an Patienten, die ein Lebertransplantat bekommen hatten, bestätigen unsere Beobachtungen. Deng et al. konnten feststellen, dass Patienten mit akuten Abstossungsreaktionen des Lebertransplantates eine erhöhte TLR-4 Expression auf CD14++ Monozyten aufwiesen. Dagegen hatte die Kontrollgruppe transplantierter Patienten mit stabiler Organfunktion keine erhöhten TLR-4 Expressionen auf CD14++ Monozyten. Kommt es zu einem akuten Abstoßungsprozess des Transplantates, kann man unter Gabe i.v. gepulster Glucokortikoide die Wirkungen einer TLR-4 Aktivierung auf peripheren CD14++ Monozyten abmildern (Deng J.F. 2007). Molekulargenetische Untersuchungen an Nierentransplantaten durch Palme et al. untermauern unsere immunologischen Daten. Die genetische Prädisposition für eine hohe TLR-4 Expression kann zu einer erhöhten Häufigkeit akuter Abstossungsreaktionen bei Nierentransplantierten führen. Die Ursache liegt in einer erhöhten „Suszeptibilität“ der Immunabwehr. Ein bestimmter TLR 4 Polymorphismus (Asp 299Gly, Thr399Ile) hat eine erhöhte Sensibilität TLR-exprimierender Zellen zur Folge, die dadurch vermehrt proinflammatorische Zytokine freisetzen („Burst“) (Palme S.M. 2006). Zu ähnlichen Ergebnisse kamen ebenfalls molekulargenetische Untersuchungen durchgeführt durch Methe et al. an Herztransplantierten. Patienten mit endothelialer Dysfunktion unmittelbar nach Transplantation, zeigten signifikant erhöhte TLR-4 Expressionen auf ihren CD14++ Blutmonozyten. Diese betraf nicht ausschließlich CD14++ Monozyten, sondern lies sich auch auf Endothelzellen intramyokardialer Gefäße nachweisen. Eine endotheliale Dysfunktion nach Herztransplantation steht im Zusammenhang mit erhöhter monozytärer TLR-4 Expression, da Monozyten zu den dominierenden Zellen einer Transplantatinfiltration gehören (Methe H. 2004). Der Infiltration des Transplantates geht die Reifung zirkulierender antigenpräsentierender

Zellen voraus. Auch hier sind TLR´s ein regulierender Faktor. Eine Signaltransduktion über TLR-4 führt zur Reifung junger undifferenzierter antigenpräsentierender Zellen wie z.B. dendritische Zellen (Goldstein D.R 2006). Die Arbeitsgruppe um Scherberich et al. konnten bereits in zahlreichen vorausgegangenen Studien eine erhöhte CD14++CD16+ exprimierender Monozyten/Makrophagen im Nierenparenchym nachweisen (Scherberich J.E., Estner H. 2004). Wir nehmen an, dass TLR´s, wie in diesem Fall TLR-4, diesen Reifungsprozess in bestimmter Weise fördern. Es sind hierfür noch keine gesicherten Daten vorhanden. Die Kapazität TLR-4 exprimierender CD14++CD16+ Monozyten proinflammatorische Zytokine zu „synthetisieren“ steht in Zusammenhang mit der TLR-Expressionsdichte. Dies ist insofern bedeutungsvoll, da zirkulierende proinflammatorische Zytokine im Blut keine sicheren „Screeningparameter“, bezogen auf den inflammatorischen Status einer chronischen Niereninsuffizienz, sind (Ando M. 2005). Auch fanden wir verminderte TLR-4 RFC Werte unterschiedlicher Monozytensubsets bei NTX mit (sehr) guter Transplantatfunktion (NTX > 14 Jahre) und Niereninsuffizienten. Anders verhält es sich bei NTX Patienten mit instabiler Organfunktion und Hämodialysepatienten. Patienten, die sich regelmäßig einer Dialyse unterziehen müssen, weisen die höchste TLR-4 Dichte im Vergleich zu allen anderen Gruppen (NTX, NI, Gesunde) auf (Abb. 36. S. 130, Abb. 37 S. 131, Abb. 38 S. 131). Die Infektionshäufigkeit in dieser Patientengruppe (HD) ist i.d.R. hoch, woraus sich der Zusammenhang der TLR-4 Expression und der Zytokinsynthese ergibt. NTX Patienten dagegen und vor allem NTX > 14 Jahre Patienten mit guter Organfunktion sind weniger infektanfällig, was auf eine gewisse „Immuntoleranz“ schließen lässt. Diese Aussage muss sehr vorsichtig interpretiert werden, da umgekehrt eine Herunterregulierung der TLR-4 Expression das Infektionsrisiko bei Hochrisiko-Patienten, wie es Dialyse und NTX Patienten mit einer instabilen Transplantatfunktion sind, erhöhen kann (u.a. verminderte Sekretion von Zytokinen). Unsere Ergebnisse bezüglich TLR-4 widersprechen den Beobachtungen die die Arbeitsgruppe um Kuroki et al., welche über die TLR-4 Expression bei Hämodialysepatienten gemacht wurden. Hier fanden sich auf zirkulierenden Monozyten eine verminderte TRL-4 Präsentation bei HD Patienten, die während des Dialyseprozesses weiter herunterreguliert wurde. Diese Herunterregulierung monozytären TLR-4 Rezeptors folgt einer verminderten Immunkompetenz (Kuroki Y. 2007). Unsere Beobachtungen zeigen im Gegensatz zur Arbeit um Kuroki et al., dass Nierentransplantierte mit instabilen Transplantatverlauf (NTX <14 i) sowie Hämodialysepatienten eine hohe TRL-4 Expressionen auf allen Monozytensubsets aufweisen.

Im Falle der NTX <14 Jahre mit instabiler Organfunktion kann die hohe TLR-4 Expression auf immunkompetenten Zellen als ein Surrogatfaktor für die eher schlechte Prognose dieser Patientengruppe angesehen werden.

14.15 Vergleich monozytärer Expression immunologischer Merkmale zwischen stabilen NTX-Patienten > 14 Jahre und NTX Patienten < 14 J. mit instabiler NT Funktion

Der Vergleich der CD14, HLA DR und TLR 2 / 4 Merkmalen zwischen den untersuchten NTX (NTX > 14 Jahre und NTX < 14 Jahre mit einer instabilen NT Funktion) Patienten, zeigt einen Unterschied der HLA DR und TLR 2 Expressionen auf den CD14++ Zellen ($p \leq 0{,}052$, $p \leq 0{,}049$ Tab. 62 S. 137, Abb. 30 S. 127, Abb. 31 S. 128, Abb. 32 S. 128). Langzeittransplantierte mit einer stabilen Transplantatfunktion, weisen eine geringere HLA DR und TLR 2 Ausprägung auf CD14++ Monozyten. Der Vergleich der weiteren Monozytensubpopulationen (CD 14++CD16+, CD14+CD16++) deutet auf geringe Unterschiede in der HLA DR und TLR 2 Expression (Tab. 61 S. 137).

Die intrazelluläre TLR 4 Expression beider NTX Gruppen, weist einen signifikanten Unterschied auf den CD14++CD16+ und CD14+16++ Monozyten auf. Hier ist die Häufigkeitsverteilung der TLR 4 iz Rezeptoren der NTX > 14 Patienten zu den NTX < 14 i Patienten niedriger ($p \leq 0{,}043$, $p \leq 0{,}01$ Tab. 61 S. 137).

Im Gegensatz zur Intrazellulären TLR 4 Expression, ist die extrazelluläre Ausprägung in beiden NTX-Gruppen sehr ähnlich. Lediglich auf der CD14+CD16++ Monozytenpopulation kann man eine Tendenz der instabilen NTX-Patientengruppe zu höheren extrazellulären TRL 4 Ausprägungen erkennen ($p \leq 0{,}062$, Tab. 62 S. 137, Abb. 41 S. 133). Langzeittransplantierte Patienten mit stabiler Transplantatfunktion (und „ausgewogenem“ TLR System) sind mutmasslich weniger anfällig auf Infektionen. Nierentransplantierte mit instabiler NT Funktion (NTX<14i), weisen im direkten Vergleich zur Gruppe der stabilen Langzeittransplantierten eine höhere Dichte verschiedener monozytärer funktionell wichtiger Antigene auf. Darunter höhere Anteile CD16-positiver (Fc-Gamma-RIII), Monozyten, veränderte Zellexpression von HLA-DR und TLR-2 sowie die der intrazellulären und extrazellulären TLR-4 Rezeptoren. Die erhöhte Expression auf Blutmonozyten Nierentransplantierter mit instabilen NT Funktion, ungeachtet der Immunsuppression, kann als Zeichen einer latenten und „labilen Mikroinflammation“ interpretiert werden und sich nachhaltig ungünstig auf die Transplantatfunktion auswirken, z.B. durch erhöhten Influx von Leukozyten ins Transplantat, beschleunigte Transdifferenzierung von CD14++ Monozyten in Fibrozyten (vergl. auch: Niedermeir et al. 2009, Braudeau C. 2008).

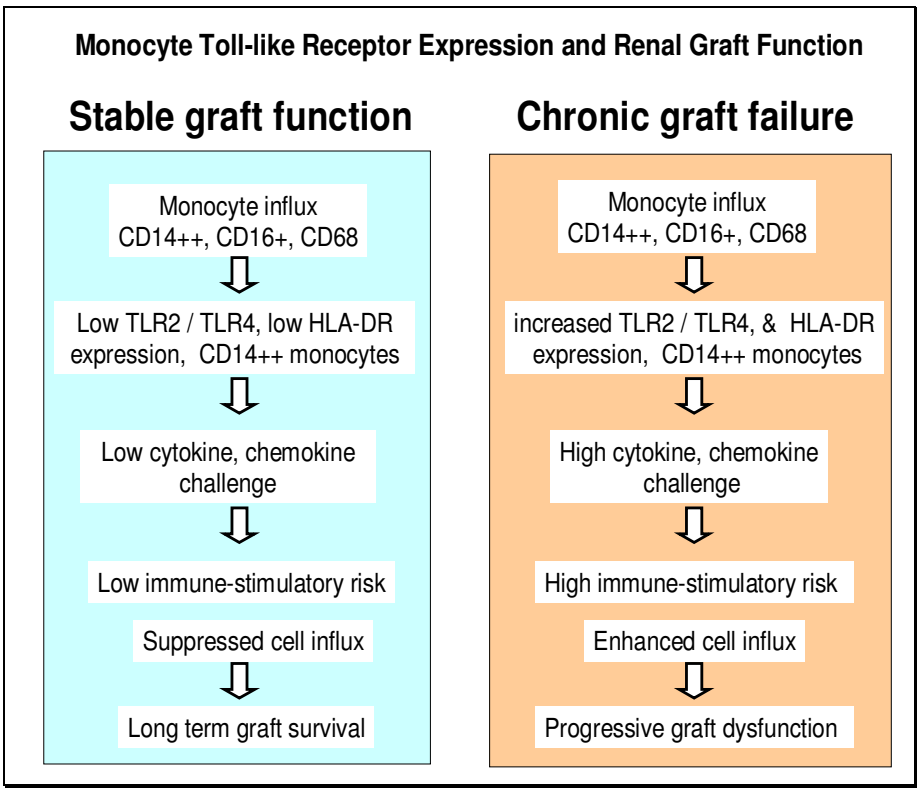


Abb. 52

Schematische Darstellung der aus den erarbeiteten Daten vermuteten Zusammenhänge zwischen der Expression monozytärer Antigene (HLD-DR, TLR, CD14-CD16) und einem stabilen bzw. instabilen Transplantatverlauf (Scherberich J.E. et al. 2008, Nieren und Hochdruckkrankheiten 37, 522-523; Farmakiotis A. Scherberich et al., 2009).

14.16 Genetische Polymorphismen von Zytokinen

Zytokine vermitteln und regulieren immunologische Reaktionen und sind an der Proliferation antigenpräsentierender Zellen (APC´s) beteiligt. Zytokine werden nach ihrer immunologischen Antwort und nach ihrem Effekt während eines Entzündungsprozesses klassifiziert. Typ I Zytokine werden von Zellen der zellulären Immunität induziert und sezerniert, während Typ II Zytokine von Zellen der humoralen Immunität generiert werden. Die Einteilung aufgrund ihres immunmodulierenden Effektes während einer Entzündungsreaktion erfolgt in **pro**inflammatorisch und **anti**inflammatorisch. Zur Gruppe proinflammatorischen Zytokine gehören (Eiselt M. 2006):

- Interleukin 1 (IL-1)
- Interleukin 2 (IL-2)
- Interleukin 6 (IL-6)
- Interleukin 8 (IL-8)
- Interleukin 12 (IL-12)
- TNF-α
- MCAF
- INF-γ
- GM-CSF
- Thromboxan A2
- Leukotrien B4
- Substanz P

Zur Gruppe antiinflammatorischen Zytokine gehören (Eiselt M. 2006):

- Interleukin 1 Rezeptorantagonist
- Interleukin 4 (IL-4)
- Interleukin 10 (IL-10)
- Interleukin 13 (IL-13)
- TGF-β
- TNF-Bindungsprotein
- Prostaglandin E2
- Prostaglandin I2

Die Regulation der Zytokine auf genetischer Ebene erfolgt durch Bindung regulierender Faktoren an bestimmte Sequenzen einer Promoterregion. Kommt es zu einem Austausch eines Basenpaares in der genetischen Sequenz (Single Nucleotid Polymorphism, SNP) hat diese Mutation zur Folge, dass die Bindung transkriptioneller Faktoren beeinflusst wird. Damit ändert sich die Genaktivität für das entsprechende Zytokin.

Die in der Transplantationsmedizin verwendeten Transplantate unterliegen bald nach ihrer Entnahme und der weiteren Transplantation starken Einflüssen. Schwerwiegendste Komplikation, nach erfolgter Übertragung, ist die Abstoßung durch den Empfänger. Zytokine haben hierbei eine Schlüsselfunktion und genetische Polymorphismen, die auf deren Expression einwirken, können Einfluss auf die Toleranz oder Abstoßungsreaktion des Organismus auf das Transplantat haben (Poole K.L. 2001). Die Wirkung der Zytokine

auf das Transplantatüberleben wird jedoch in der Literatur kontrovers diskutiert (Lee H. 2004).

Hier untersuchten wir 48 NTX Patienten nach ihrer genetischen Expressionen folgender Zytokine:

- IL-4 -590 C/T.
- IL- 10 -1082 G/A
- IFN –γ -874 T/A
- GM-CSF -677 C/T

Von 48 Patienten hatten 27 Patienten ein Transplantatüberleben von NTX ≥ 14 Jahren, 11 Patienten ein Transplantatüberleben NTX ≤ 5 Jahren, 7 Patienten ein Transplantatüberleben NTX ≤ 9 Jahren und 3 Patienten ein NTX ≤ 12 Jahren (Kap. 8.7). Wir untersuchten den Zusammenhang zwischen immunologischen Merkmalen und genetischer Expression sowie die Häufigkeit der Polymorphismen in den verschiedenen NTX-Gruppen.

14.17 IL-4 590 C / T Polymorphismus

IL-4 gehört zu den antiinflammatorischen Zytokinen und wird durch Th2 Zellen produziert und sezerniert (Abbas A.K. 1996). IL-4 induziert die Proliferation von B-Zellen und die Produktion von Immunglobulin E (Jabara H.H. 1990), Immunglobulin G und M durch B-Lymphozyten (Defrance T. 1988). Weiterhin ist IL-4 an der Differenzierung von T-Zellen und Thymozyten aus hämatopoietischen Stammzellen beteiligt (D´Andrea A. 1995). IL-4 hemmt in Monozyten und Makrophagen die Expression IFN-γ induzierter Gene, und vermittelt die Bildung zytoplasmatischer Ausläufer bei Monozyten, die dadurch das Erscheinungsbild dendritischer Zellen erhalten (De Waal M.R. 1993). IL-4 hemmt die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine TNFα, IL-6 und IL-1a, IFN-γ, sowie die Freisetzung der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und PG E2 (Hart P.H. 1999). In vitro Langzeituntersuchungen an Monozytenzellkulturen zeigten, dass IL-4 die Ausdifferenzierung der Monozyten unter Einfluss von GM-CSF blockiert. Daneben findet man auch einen hemmenden Effekt auf die Expression immunologischer Merkmale auf der Oberfläche der Makrophagen, wie z.B. CD14 und Fc Rezeptoren. Kurzzeitbehandlung von Monozyten mit IL-4 verstärkt die Expression MHC Klasse II Antigene auf der Oberfläche von Monozyten sowie auf der Oberfläche von B-Lymphozyten (Peters J.H. 1991, Litmann B.H. 1989, Lee H. 2004).

Genetische Untersuchungen an der Promoterregion des fünften Chromosom ergaben für das IL-4 Gen einen C zu T Polymorphismus (Substitution von C nach T) der Position -590 (Rosenwasser L. J. 1995). Das Auftreten dieses IL-4 590 C/T Polymorphismus wird in der

Literatur mit unterschiedlichen Häufigkeiten beschrieben. Rosenwasser et al. beschreiben das Auftreten des T- Polymorphismus in ihrem nordamerikanischen Kollektiv auf Position -590 mit 40%. Ähnliche genetische Untersuchungen in einer japanischen Studie ergaben eine vergleichbare Häufigkeit des T- Allels für den IL-4 590 C/T Polymorphismus (Noguchi E. 1998). Unsere eigenen Untersuchungen an 48 nierentransplantierten Patienten, und zusätzlich 96 Gesunden, ergaben eine Häufigkeit des T-Allels für den IL-4 590 C/T Polymorphismus von 2-3%. Untersuchungen durch Lee H. an nierentransplantierten Patienten ergaben eine vergleichbare Häufigkeit des IL-4 T-Allels in ihren untersuchten Kollektiv von 6% (Lee H. 2004).

14.18 Immunologischer Einfluss des IL-4 590 C/T Polymorphismus

Das IL-4 Zytokin reguliert die Ausschüttung von IgE aus B-Lymphozyten. Genetische Studien, die die Häufigkeit des IL-4 -590 C/T Polymorphismus untersuchten, wiesen auf einen Zusammenhang zwischen dem T-Allel und einer verstärkten IgE Produktion (Rosenwasser L.J. 1995). Dieser Zusammenhang wurde in genetischen Untersuchungen durch Noguchi et al. 1998 an Asthmapatienten, sowie durch weitere Studien an Patienten mit atopischer Dermatitis bestätigt (Noguchi E. 1998, Kawashima T. 1998). Der IL-4 590 C/T Polymorphismus hat direkte Auswirkungen auf die Produktion von IL-4. Das T-Allel führt zu einer verstärkten Ausschüttung von IL-4 (sog. „high producer“), wohingegen dazu das C-Allel zu einer geringeren IL-4 Produktion beiträgt (sog. „low producer“) (Poole K.L. 2001, Bittar M.N. 2007)

14.19 Einfluss des IL-4 Genpolymorphismus bei nierentransplantierten Patienten

Molekulargenetische Analysen sowohl an Organspendern als auch an Empfängern eines Nierentransplantates ergaben, dass das IL-4-T-Allel die Abstoßung des Transplantates beeinflussen kann. Untersucht wurde der Zusammenhang zwischen genetischer Expression von Spender / Empfänger und Transplantatabstoßung. Hierbei zeigte sich, dass die Kombination von Spender IL-4 C Allel / Empfänger IL4 C Allel (Spender „low producer“ / Empfänger „low producer“) in der Gruppe der Patienten die eine Abstoßung aufzeigten, signifikant erhöht war. Als „Transplantatabstoßung“ wurde eine Mehrfachabstossung des Transplantates definiert. Patienten mit nur einen Abstoßungsereignis wurden in die Gruppe der sogenannten „non-rejectors“ zusammengefasst. Anderseits zeigte sich eine Verbindung zwischen dem IL-4 -590 T Allel („high producer“) und einer geringeren Häufigkeit von Abstossungsreaktionen (Poole K.L. 2001). Im Gegensatz zu den

Ergebnissen der Studiengruppe um Poole et al., konnten in ihren molekulargenetischen Untersuchungen an nierentransplantierten Patienten die Arbeitsgruppe um Lee et al. diese Erkenntnisse nicht bestätigen. In ihren Studien wurden 277 Nierentransplantierte bezüglich des IL-4 590 Polymorphismus untersucht. Hierbei ergab sich keine Verbindung zwischen einer akuten Abstoßungsreaktion innerhalb des ersten Jahres und dem IL-4 590 C / T Polymorphismus (Lee H. 2004).

14.20 Einfluss von Calcineurininhibitoren auf die IL- 4 Freisetzung

Die Induktion der IL-4 Transkription in Th2 Zellen unter physiologischen Bedingungen erfolgt nach Stimulation des T-Zell Rezeptors mit antigenpräsentierenden Zellen in Zusammenhang mit MHC Klasse II Antigenen (Li-Weber M. 1997). Dies löst zwei intrazelluläre Mechanismen aus, die zur Transkription des IL-4 Genes führen:

1) den Protein-Kinase C abhängigen Mechanismus der zur Synthese des Aktivierungs-Proteins 1 (AP-1, Activator-protein 1) führt.

2) einen Ca^{2++} abhängigen Mechanismus. Dieser resultiert in einer Kalzineurin abhängigen Dephosphorylierung und nukleären Translokation präexistierender nukleärer Faktoren aktivierter T-Zellen (NFAT). Der Ca^{2++} abhängige Mechanismus der IL- 4 Genaktivierung kann durch Calcineurininhibitoren (Cyclosporin, FK506) vollständig gehemmt werden (Schreiber S.L. 1992).

14.21 Monozytäre CD14++ TLR 4 (intrazellulär) Expression und IL-4 590 C/T Polymorphismus

In unserer Studie an Nierentransplantierten untersuchten wir den Zusammenhang zwischen intrazellulären TLR 4 Expression auf CD14++ Monozyten und des IL-4 590 C/T Polymorphismus. Die Auswertung dieser Merkmale zeigt eine positive Korrelation zwischen dem IL-4 590 T-Allel und einer hohen intrazellulären TLR 4 Expression. Es besteht eine signifikante Assoziation ($p \leq 0{,}052$ Tab. 75 S. 147). Der Korrelationskoeffizient nach Pearson zeigt eine schwache Bindung zwischen diesen beiden Merkmalen ($Kp \leq 0{,}169$). Die Ursache für diese schwache Bindung ist im Kollektiv und in der Häufigkeitsverteilung des Polymorphismus zu finden.

Aus unseren früheren Untersuchungen an Blutmonozyten konnten wir eine verminderte Expression des CD14 Epitops auf zirkulierende Blutmonozyten Nierentransplatierter feststellen (Nockher W.A., Scherberich J.E. 1995). Patienten mit einer geringgradigen Nierendysfunktion weisen ähnlich den Nierentransplantierten eine niedrige Expression des CD14 Epitops, was als Zeichen einer „adaptiven Toleranz“ interpretiert werden kann

(ScherberichJ.E., Estner H. 2004). Unsere aktuelle Untersuchung kommt zusätzlich zum Ergebnis, dass eine niedrige TLR 4 Expression vorteilhaft für eine langfristige NT Funktion sein kann. Betrachtet man die vorausgegangenen Erkenntnisse und die Ergebnisse aus unseren aktuellen immunologischen Untersuchung aus der Beobachtung langzeittransplantierter NT Patienten, vervollständigen wir unsere Ergebnisse zellimmunologischer Merkmale peripherer Blutmonozyten. Auch wird ebenfalls deutlich, wieso der Effekt einer verminderten IL-4 Zytokinproduktion vorteilhaft für ein stabile NT Funktion sein kann: Die Häufigkeitsverteilung der *intrazellulären TLR 4* Expression von CD14++ Monozyten zeigt in unserer Untersuchung eine *größere* Dichte auf Blutmonozyten der NTX < 14 Jahre Patienten mit *instabiler NT Funktion* gegenüber Langzeittransplantierten. Eine mögliche Ursache könnte als genetische Prädisposition hierfür im Polymorphismus des IL-4 Gens liegen (T-Polymorphismus, „high Producer“) was sich wiederum in der antiinflammatorischen Funktion des IL-4 Zytokins in der Gruppe der instabilen Nierentransplantierten (NTX < 14 i Gruppe) widerspiegelt. Nierentransplantierte Patienten unterliegen einer latenten *Mikroinflammation,* die sich negativ auf die Funktion des Transplantates auswirkt. NTX Patienten mit instabiler Organfunktion haben eine stärkere Progression einer Arteriosklerose (Arteriolopathie, Mikroangiopathie) unter dem Einfluss der Mikroinflammation im Transplantat. Damit verbunden ist ein höheres Infektionsrisiko (Scherberich J. 1998). Dies fördert die Entwicklung der chronischen Transplantatdysunktion bei diesen Patienten. Die hohe intrazelluläre Expression von TLR 4 lässt darauf schließen (Tab. 52 S. 125). In dieser Patientengruppe mit instabilen Transplantat fand sich eine hohe IL- 4 Produktion und erhöhte monozytäre CD14++ Expressionen im Vergleich zu Langzeittransplantierten.

14.22 Intrazelluläre TLR 4 Expression auf CD14++CD16+ Monozyten und IL-4 590 C/T Polymorphismus

Die Untersuchung unseres Patientenkollektiv an NTX Patienten ergab einen Zusammenhang zwischen der intrazellulären TLR 4 Expression in CD14++CD16+ Blutmonozyten und dem IL-4 590 C/T Polymorphismus. Die Auswertung zwischen der TLR-4 Expression und der Häufigkeit des IL-4 590 T Polymorphismus ergibt zwischen beiden Ausprägungen einen engen Zusammenhang. Bei näherer Betrachtung liegt die Begründung für diese Assoziation in der verstärkten Häufigkeit des T-Allels („high Producer“) in der Gruppe der hochexprimierenden intrazellulären TLR 4 auf CD14++CD16+ Monozyten ($p \leq 0{,}05$ Tab. 77 S. 149). Bei genauerer Betrachtung lässt sich für diese Assoziation eine relativ schwache Bindung feststellen ($Kp \leq 0{,}204$ Tabelle 77 S. 149). Die Ursache hierfür liegt in der geringen Häufigkeit des T-Allels innerhalb des Kollektives.

Der immunologische Vergleich zwischen der NTX > 14 Jahre Gruppe und der NTX < 14 (i) Jahre mit einer instabilen NT Funktion ergibt eine signifikant erhöhte Dichte der intrazellulären TRL 4 Expression auf CD14++CD16+ Monozyten der NTX < 14 (i) Jahre (=

Gruppe instabiler NT Funktion (NTX < 14 i). Blutmonozyten Nierentransplantierter mit *instabiler* Organfunktion haben eine *höhere* Dichte an TLR 4 Rezeptoren. Scherberich et al. wiesen 2004 in ihren Untersuchungen sowohl bei Patienten mit chronischer Nieren-insuffizienz als auch bei NTX Patienten, ungeachtet optimierter Immunsuppression, einen höheren Anteil proinflammatorischer Monozyten (CD14++CD16+) nach. Offenbar ist trotz Dauerimmunsuppression eine vollständige Unterdrückung des proinflammatorischen Status dieser Patienten (offenbar vermittelt durch zirkulierende Alloantigene) nicht möglich. Eine Ursache könnte molekulargenetisch im individuell variablen IL-4 590 T Polymorphismus liegen. Unsere aktuelle Studie zeigte, wie aus bereits vorangegangenen Studien um die Arbeitsgruppe von Scherberich et al. bekannt, dass eine niedrigere Beladung von Blutmonozyten mit TLR- 4 eine günstigere Prognose für das Transplantat aufweisen (wie Sie in unserer Studie Nierentransplantierte mit NT > 14 Jahren aufzeigen). Die antiinflammatorische Wirkung des IL-4 Zytokines spiegelt sich in den Status der „latenten Mikroinflammation“ instabiler NT Patienten. Nierentransplantierte mit instabiler Organfunktion weisen auf eine vermutete reaktive (stimulierte) Erhöhung des IL-4 hin (Tab. 77 S.149).

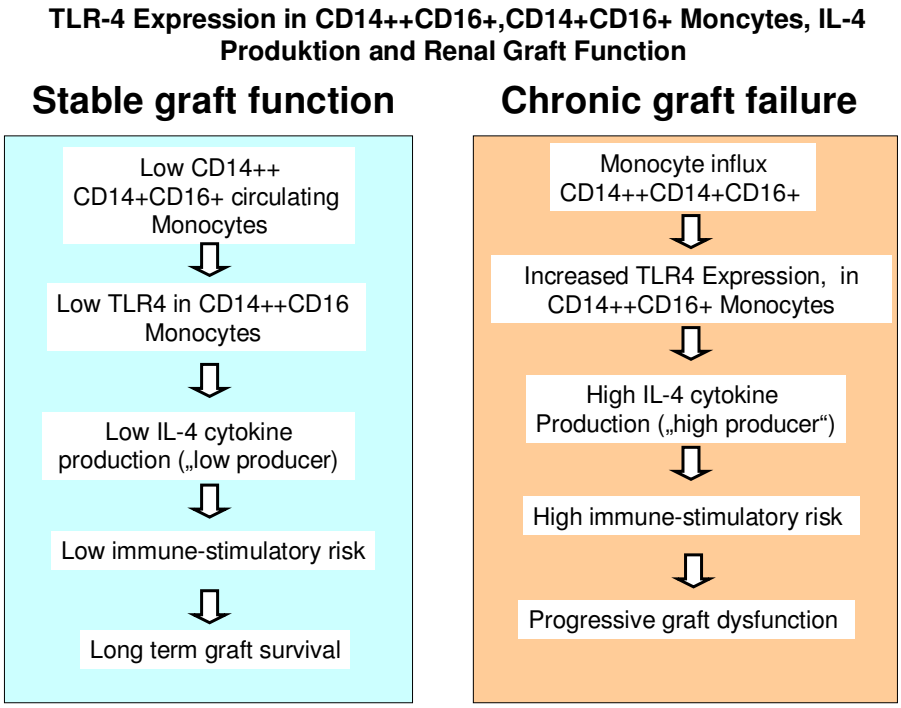


Abbildung 53: Schema vermuteter Effekte zwischen einer TLR 4 Expression in CD14++, CD14++CD16+ Blutmonozyten und einer reaktiven Zytokinkaskade. Vorschlag eines negativen Feedback zwischen stimulierter IL-4 „Synthese“ und präexistenter inflammatorischer Signale (erhöhte Expression des Mustererkennungsrezeptors TLR 4).

14.23 IL10 -1082 G / A Polymorphismus

Interleukin 10 gehört zur Gruppe antiinflammatorischer Zytokine und wird von einer Vielzahl immunologisch aktiver Zellen gebildet, darunter auch antigenpräsentierende (APC´s) Zellen (dendritische Zellen, Makrophagen und Monozyten). IL10 hemmt die Expression der Haupthistokompatibilitätsantigene Klasse II (MHC II) auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen. Die IL-10 Freisetzung hemmt die Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1a, IL-1β, IL-6, IL-12, TNF-α und GM-CSF (De Waal Malefyt R. 1991a, Fiorentino D.F. 1991). Dagegen verstärkt IL-10 die Differenzierung immunphänotypischer CD14 Oberflächenmerkmale sowie Fc-γ immunphänotypische Merkmale wie CD16, CD32 und CD64 (Te Velde A.A. 1992, Calzada-Wack J.C. 1996). Antiinflammatorische Zytokine wie IL 4, IL 13 und IFN γ können die Produktion von IL10 wiederum hemmen (De Waal Malefyt R. 1993, Chomarat P. 1993).
Eine weitere wichtige Funktion von IL-10, die im Zusammenhang mit der Stimulation und Aktivierung von Monozyten und Makrophagen durch LPS steht, ist die Hemmung von TLR 4 Rezeptoren (Muzio M. 2000).
Das IL-10 Gen befindet sich auf Chromosom 1 und wird durch 5 Exons codiert (Kim J.M. 1992). Insgesamt drei Polymorphismen wurden in der Promoterregion des IL10 Gens entdeckt, an denen eine Substitution eines Basenpaares erfolgt. An den Positionen -1082, -819, -519 kommt es in der Gensequenz zur Substitution einer Base. Von den drei IL10 Polymorphismen zeigt der IL 10 -1082 G / A eine direkte Assoziation mit der IL-10 Produktion. Untersuchungen konnten zeigen, dass das IL-10 1082 G Allel mit einer erhöhten IL-10 Produktion korrelierte („high producer“) (Turner D.M. 1997). Das IL10 -1082-A-Allel weist eine höhere Affinität zum Transkriptionsfaktor PU 1. Der Transkriptionsfaktor PU 1 hemmt die Genexpression in der IL-10 Promotorregion (Reuss E. 2002).
Aus früheren molekulargenetischen Untersuchungen an Gesunden ergibt sich für den IL-10 1082 G/A bei Gesunden Probanden für diesen Genotypus eine Verteilung von 30% für das A-Allel („low producer“), für das G- Allel („high producer“) 23% und 49% der untersuchten Probanden waren Heterozygoten G/A (Epplen C. 1997). Die Häufigkeitsverteilung in unserer Studie ergibt für alle untersuchten NTX-Patienten eine Genotypverteilung von 31% für das A-Allel (sog. „low producer“), 27% für das G-Allel (sog. „high producer“) und 42% für die Heterozygoten. Die Verteilung des IL-10 G/A Polymorphismus entspricht in etwas der Verteilung, die auch bei Gesunden vorgefunden werden kann (jedoch Kollektiv-abhängig). Betrachtet man beide NTX-Gruppen getrennt, so ergibt die Genotypverteilung für die Gruppe der NTX > 14 Jahre Patienten 19% für das A-Allel, 40% für das G-Allel und 41% für die Heterozygoten. In der Gruppe der NTX < 14 Jahren mit einer instabilen NT

Funktion, haben 24% das A-Allel, 33% das G-Allel und 43% der Patienten sind heterozygotisch veranlagt.
Die transkriptionale Aktivität des IL10 Gens wird durch den Promotergenpolymorphismus beeinflusst. Für die Promoterregion des IL 10 Gens auf dem Chromosom 1 ist der IL-10 G Polymorphismus u.a. für eine höhere Zytokinfreisetzung verantwortlich. Dies lies sich in Untersuchungen von Turner et al., und Reuss et al. unabhängig bestätigen (Turner D.M. 1997, Reuss E. 2002).

14.24 Einfluss des IL-10 Genpolymorphismus bei Nierentransplantierten

Der Einfluss des IL-10 Genpolymorphismus bei Nierentransplantierten wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Es besteht bis zum heutigen Zeitpunkt keine einheitliche Aussage, welchen Einfluss letztendlich der Genotypus für IL-10 auf die Funktion des Nierentransplantates haben kann (Plothow A. 2003). Der IL 10 Genotyp, gekennzeichnet durch hohe IL10 Produktion, ist für das Transplantatüberleben offenbar ungünstig: Gefunden wurde eine verstärkte „Sensibilität“ der humoralen Immunabwehr, eine erhöhte Stimulationsbereitschaft von B-Lymphozyten und der damit einhergehenden Aktivierung der Antikörpersynthese (Sankaran D. 1999, Merville P. 1995, Rousset F. 1992, Mossman T.R. 1994, Loucaidou M. 2005). Demgegenüber stehen Daten, die eine Verbindung zwischen einer *hohen IL10 Produktion* und einer offenbar *verbesserten Langzeitfunktion* der Nierentransplantate feststellen. Eine hohe Freisetzung von IL-10 scheint für das Langzeitüberleben von Nierentransplantaten einen positiven Effekt zu haben (Asderakis A. 2001). Der positive Effekt des Langzeitüberlebens von Nierentransplantaten durch hohe IL 10 „Präsenz“ hängt mit einer verstärkten Bindung transkriptioneller (protektiver) Faktoren am IL-10 1082 G-Allel zusammen (Hutchinson I.V. 1998). Untersuchungen von Poole et al. ergaben eine Korrelation zwischen einer hohen IL10 Produktion (=Antiinflammation) und einer verbesserten Langzeitfunktion von Nierentransplantaten jedoch erst bei genauer Betrachtung des Genotypus sowohl des Empfängers als auch des Spenders. Danach war die Kombination von Spender / Empfänger IL-10-1082 A („low producer“) / IL-10 -1082 G („high producer“) mit einer signifikant verbesserten Langzeitfunktion und eine verminderte Anzahl an Abstossungsreaktionen verbunden. Poole et al. stellten zudem fest, dass in der Gruppe der Nierentransplantierter mit mehreren akuten Abstossungsreaktionen das IL-10-A-Allel (sog „low producer“, geringere antiinflammatorische Wirkungen) vermehrt vorkam (Poole K.L. 2001).

14.25 Monozytärer Phänotyp: CD14+CD16++ extrazellulärere TLR 4 Expression und IL 10 -1082 G/A Polymorphismus

Ähnlich vorangegangenen Studien untersuchte unsere Arbeitsgruppe in unserem Kollektiv an Nierentransplantierten einen möglichen Zusammenhang zwischen der IL-10 Genexpression und der immunologischen TLR 4 Expression auf CD14+CD16++ Blutmonozyten. Nierentransplantierte Patienten mit einer niedrigen (Einteilungskriterien s. Kapitel 8.1 Studiendesign) extrazellulären TLR 4 Expression auf CD14+CD16++ Monozyten, weisen 30,3% in Ihrem Genom für den IL-10 1082 Polymorphismus das G-Allel („high Producer“), 6,1% der nierentranplanierten Patienten das A-Allel („low producer“) während 15,2% heterozygotisch veranlagt sind. Dieser mögliche Zusammenhang entsteht durch eine verstärkte Häufigkeit des G-Alleles („high producer) in der Gruppe der NTX Patienten bei niedriger extrazellulärer TLR 4 Dichte auf CD14+CD16++ Monozyten ($p \leq 0{,}048$, $Kp \leq 0{,}077$, Tabelle73). Der gegenläufige Trend lässt sich in der NTX-Gruppe mit einer hohen extrazellulären TLR 4 auf den CD14+16++ Zellen beobachten.

Die Ergebnisse aus unserer aktuellen Untersuchung bezüglich einer positiven Langzeitfunktion von Nierentransplantaten und der TRL 4 Expression auf Blutmonozyten zeigen, dass eine niedrige TLR 4 Expression vorteilhaft für eine gute Organfunktion sein können. Untermauert werden unsere Ergebnisse aus Untersuchungen früherer Studien um Bradaeu, Deng et al und um die Arbeitsgruppe um Methe et al. (Bradaeu C. 2008, Deng J.F. 2007, Methe H. 2004). Kombiniert man die Daten aus unserer immunologischen Beobachtung der TLR 4 Expression auf CD14, CD 16 positiven Blutmonozyten und die Ergebnisse bezüglich der genetischen Untersuchung des IL-10 G/A Polymorphismus kommen wir zum Ergebnis, dass eine geringe Expression des TLR 4 Rezeptors auf CD14+CD16++ Monozyten und eine hohe IL-10 Ausschüttung sich positiv auf die NT-Funktion auswirken können. Durch den Einfluss von IL-10 kommt es zu einer verminderten Expression von TLR 4 auf der Monozytenoberfläche. Dadurch kann es zur abgeschwächten Signaltransduktion durch LPS und somit zu einer Abnahme der stimulierenden Wirkung von LPS (Muzio M., 2000).

Aus der genaueren Betrachtung der molekularbiologischen Analyse unserer NTX-Patienten fanden wir eine höhere Häufigkeitsverteilung des IL 10 -1082 G Alleles („high producer“) in der Gruppe der NTX > 14 Jahre. Die immunologische Untersuchung der NTX-Kollektive (NTX > 14 Jahre Gruppe und NTX < 14 Jahre mit *instabiler* NT Funktion) ergibt eine *niedrigere TLR 4 Dichte* auf CD14+CD16++ Monozyten in der Gruppe NTX > 14 Jahre Gruppe (stabile Langzeitgruppe) gegenüber NTX< 14 Jahre Patienten (mit instabiler Transplantatfunktion ($p \leq 0{,}064$). Eine *höhere IL 10 Produktion* aufgrund eines IL 10 -1082 G Polymorphismus korreliert mit einer *niedrigen TLR 4 Dichte* auf den CD14+16++ Monozyten und wirkt sich offenbar *positiv* auf Transplantatalter & Transplantatfunktion aus.

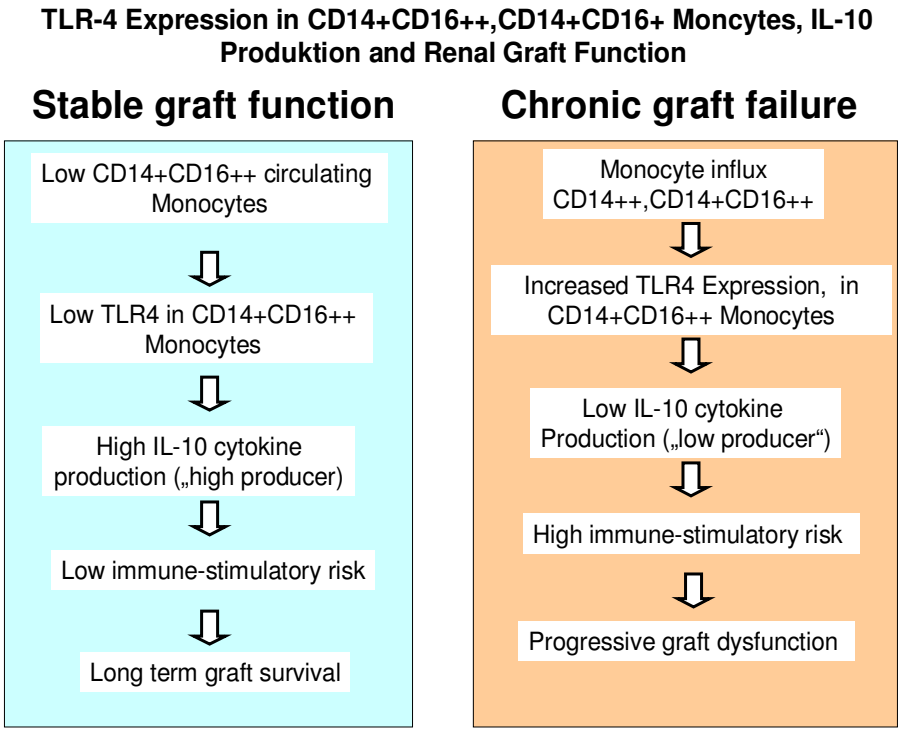


Abbildung 54: Schema vermuteter Effekte zwischen IL-10 Zytokinausschüttung und TLR 4 Expression in CD14++, CD14+CD16++ Blutmonozyten

14.26 Interferon γ -874 T / A Polymorphismus

Interferon γ ist ein Zytokin aus der Gruppe der proinflammatorischen Zytokine, das an der Modulation sowohl einer Entzündungsreaktion als auch der Immunabwehr beteiligt ist. Darüber hinaus entwickelt IFN γ antivirale und antiproliferative Eigenschaften (Boehm U. 1997). IFN γ ist ein 34 kD Protein welches aus Leukozyten, Fibroblasten und T-Lymphozyten gebildet wird. IFN γ induziert MHC Klasse I und Klasse II Antigene auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen (APC´s), welche wiederum für die Erkennung von Fremdantigenen verantwortlich sind. IFN γ nimmt in der Transplantationsmedizin einen sehr hohen Stellenwert ein (Landolfo S. 1985, Rosenberg A.S. 1990). Charakteristisch für das IFN γ Gen ist eine CA Mikrosatelitensequenz. Genetische Untersuchungen im ersten Intron ergaben an Position -874 im Genotypus eine T zu A Substitution (Pravica V. 2000). Der IFN γ-874 T/A Polymorphismus bestimmt auf genetischer Ebene die Höhe der Interferon γ Produktion. Sowohl in vitro Untersuchungen durch Pravica et al., als auch in vivo Untersuchungen durch Awad et al. an Patienten mit einer Fibrosierung ihres Lungentransplantates, konnten diesen Zusammenhang bestätigen (Pravica V. 1999, Awad M. 1999). Dabei assoziiert das T-Allel des IFN γ-874 T/A Polymorphismus mit einer hohen IFN-Produktion („high producer“) (Azarpira N. 2006). Der Grund für diese Assoziation zwischen hoher IFN γ Produktion und dem T-Allel, liegt in einer räumlichen Nähe zwischen einer vermeintlichen NF-kB Bindungsstelle und dem IFN γ -874 T/A Polymorphismus

(Heinmeyer T. 1998). Diese räumliche Übereinstimmung zwischen Bindungsstelle von Transkriptionsfaktoren und Polymorphismus beeinflusst die transkriptionelle Funktion des Gens. Das übereinstimmende NF-kB Leitmotiv hat eine hohe Bindungsaktivität zur Gensequenz des IFN γ-874 T-Allels (Sica A. 1992).

14.27 Einfluss des IFN γ -874 T / A Polymorphismus bei Nierentransplantierten

Der Einfluss des IFN γ-874 T/A Polymorphismus bei nierentransplantierten Patienten wird in der Literatur sehr unterschiedlich bewertet und diskutiert. Aus histologischen Untersuchungen an Nierentransplantaten ist jedoch bekannt, dass sich eine relevante Beziehung zwischen der Entwicklung einer akuten Abstoßungsreaktion und der IFN γ Sekretion befindet. Mononukleäre Zellen aus transplantierten Patienten mit einer akuten Abstoßungsreaktion sezernierten vermehrt IFN γ und IL-2 im Vergleich zu Patienten ohne Anzeichen einer akuten Abstoßungsreaktion. Keine derartige Korrelation fand sich für IL-2. Die IFN γ sekretorische Kapazität alloreaktiver T-Zellen beeinflusst die Abstoßung eines Nierentransplantates durch Förderung von Makrophageninfiltrationen in das Transplantat sowie der Regulierung der HLA-Antigene auf dem Transplantat (Kaminski E.R. 1995). Eine ähnliche Beziehung zwischen einer hohen IFN γ Sekretion und einer akuten Abstoßung des Transplantates belegte Cartwright et al. in ihren Studien an Patienten, die unmittelbar vor einer Transplantation standen. Anhand der gemischten Lymphozytenkultur sowohl aus Spendern als auch aus Empfängern, in Verbindung mit einer HLA-Kompatibilität, hatten Patienten mit hoher IFN γ Sekretion und geringer HLA-Übereinstimmung ein erhöhtes Risiko auf eine Transplantatabstoßung (Cartwright N.H. 2000). Dagegen konnte die Studie um Azarpira et al. an Nierentransplantierten keinen Zusammenhang zwischen akuter Transplantatabstoßung und erhöhten IFN γ Synthesewerten feststellen (Azarpira N. 2006).

14.28 Monozytäre CD14+16++TLR 2 Expression und IFN γ-874T/A Polymorphismus

Insgesamt 48 NTX Patienten wurden bezüglich ihrer Genexpression für das IFN γ Gen auf Position -874 untersucht. Aus unseren Ergebnissen an nierentransplantierte Patienten mit Niedriger TLR 2 Expression auf CD14+CD16++ Monozyten weisen 18,8% das T-Allel, 12,5% das A-Allel während 25% unserer untersuchten NTX-Patienten heterozygotisch für diesen Polymorphismus veranlagt sind. In der Gruppe der NTX-Patienten mit hoher TLR 2 Expression auf CD14+CD16++ Monozyten, haben 22,9% das A-Allel und 18,8% sind Heterozygoten. In dieser Gruppe (hohe TLR 2 Expression) kommt das T-Allel des IFN γ-874 T/A Polymorphismus nicht vor. Die Auswertung unserer Daten ergibt einen Zusammenhang zwischen dem IFN γ-874T/A Polymorphismus und TLR 2 Expression ($p \leq 0{,}021$, Tabelle 72). In unserem Kollektiv an NTX Patienten korreliert eine

niedrige TLR 2 Expression auf CD14+CD16++ Monozyten mit der des IFG γ -874 T Polymorphismus („high Producer“). Die Begründung für diesen Zusammenhang liegt in der Häufigkeit des T-Allels in der Patientengruppe mit niedriger TLR 2 Expression auf CD14+CD16++ Monozyten vor. Der gegenläufige Trend lässt sich in der NTX-Gruppe mit einer hohen TLR 2 Expression in den CD14+16++ Monozyten beobachten.

Aus unseren vorangegangenen immunologischen Daten bezüglich einer niedrigen TLR 2 Expression und einer daraus resultierenden günstigen Langzeitfunktion des Nierentransplantates und der molekulargenetischen Untersuchung, können wir einen möglichen Zusammenhang zwischen beiden Merkmalen erkennen. Die Häufigkeitsverteilung in unserer molekulargenetischen Betrachtung der NTX-Patienten, ergibt für den IFG γ -874 T/A Polymorphismus eine größere Häufigkeit des T Allels („high producer“) in der Gruppe der NTX < 14 Jahre Patienten mit einer instabilen NT Funktion. Dagegen weisen unsere NTX > 14 Jahre Patienten eine geringere Häufigkeit des T-Allels in ihren Genotypus. Eine geringe TLR 2 Expression auf peripheren Blutmonozyten und eine genetische Prädisposition für eine geringere IFN γ Ausschüttung ist vorteilhaft für eine gute und stabile Funktion des Nierentransplantates. NTX < 14 Jahre Patienten mit einer instabilen NT Funktion haben eine hohe TLR 2 Dichte gepaart mit einer genetischen Prädisposition für eine hohe IFN γ Ausschüttung. Eine hohe IFN γ Freisetzung kann eine negative Einwirkung auf die Transplantatfunktion haben. Dies haben jüngst erneut Daten anhand von 107 Nierentransplantierte ergeben (Tsaur I. et al. 2011): Hiernach hatten Patienten mir chronischer Transplantatdysfunktion signifikant höhere Expression (CD4+CD25+ regulatorische T-Zellen) an INF γ, Il2-und Il-17. Diese Untersuchungen unterstützen und ergänzen unsere Ergebnisse hier über antigenpräsentierende Zellen. Sowohl Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen, wie regulatorische T-Zellen beteiligen sich an der Prognose des Transplantats.

Eine erhöhte TLR 2 Ausprägung in Kombination mit einer erhöhten IFN γ Freisetzung bei NTX Patienten mit einer instabilen Organfunktion, kann als pathognomonisches Zeichen einer chronisch fortschreitenden Dysfunktion dienen, und sich nachteilig auf die Organfunktion auswirken (Abb. 55).

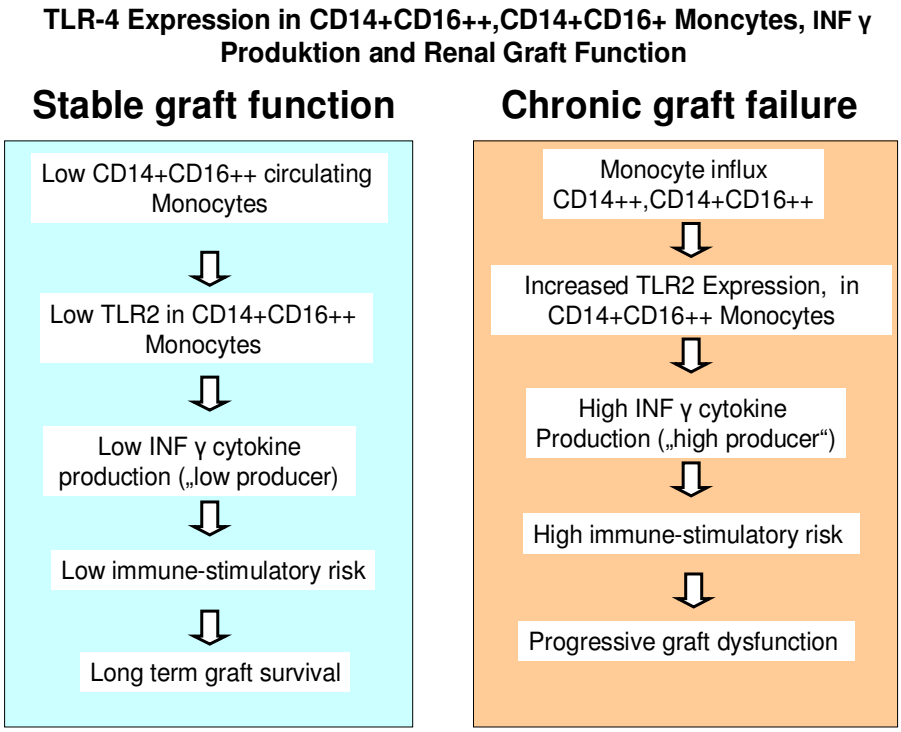


Abbildung 55: Schema vermuteter Effekte zwischen IFN γ Zytokinausschüttung, und TLR 2 Expression in CD14++, CD14+CD16++ Blutmonozyten

14.29 GM-CSF -677 C / A Polymorphismus

GM-CSF (Granulocyte-Makrophage Colony-Stimulating-Factor) ist ein proinflammatorisches Zytokin, das aus Makrophagen, T-Zellen, endothelialen Zellen und Fibroblasten sezerniert werden kann. Seine Funktion liegt, zusammen mit Erythropoietin und Interleukinen, in der Stimulation und Induzierung von Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile, Basophile) und Monozyten aus Stammzellen. Studien des GM-CSF Gens in seiner Promoterregion weisen auf einen C / A Polymorphismus an Position -677 hin. Dieser Polymorphismus an Position -677 der Promoterregion ist insofern von Bedeutung, da in dieser Promoterregion des GM-CSF Gens die Bindungsstelle des TEF-2 Transkriptionsfaktors zusammenfällt (Fiorentini P. 1995, Crossley M. 1996). TEF-2 ist ein Transkriptionsfaktor aus der Gruppe der sogenannten „Krüppel-Zink-Proteine“ (Crossley M. 1996).

14.30 Einfluss von GM-CSF auf Nierentransplantierte

Immunsupprimierte Patienten mit Nierentransplantat zeigen in Fällen einer Infektion eine erhöhte GM-CSF Freisetzung (Daniel V. 1992). Eine pharmakologische Intervention mit Cyclosporin A oder Dexamethasone regelt die GM-CSF Sekretion aus Endothelzellen und Fibroblasten herab (Lehnhoff S. 1996, Hamilton J.A. 1992). Der Entwicklung einer

Neutropenie nach Nierentransplantation kann durch Substitution rekombinanten humanen GM-CSFs entgegengewirkt werden. Daneben war, neben der Behandlung der Neutropenie durch Stimulation der myeloiden Progenitorzellen, die Infektanfälligkeit vermindert (Hashmi A. 1997). Dagegen zeigten Untersuchungen von Budde et al. keinen Einfluss von GM-CSF auf die Abstoßungsreaktion eines Nierentransplantates (Budde K. 1994). Der Effekt des GM-CSF -677 C/A Polymorphismus auf Nierentransplantate wurde bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht untersucht. Unsere Arbeitsgruppe um Scherberich et al. hat als erste Arbeitsgruppe einen Zusammenhang zwischen NTX Patienten mit stabiler und instabiler NT Funktion und einen möglichen Effekt eines GM-CSF -677 C/A Polymorphismus erstellt. Ein positiver Effekt des C-Allels ist aus Untersuchungen um die Arbeitsgruppe von Rafatpanah et al. bekannt.

14.31 Monozytäre CD14++, CD14+ CD16+, CD14+CD16++ TLR 4 (intrazellulär) Expression und GM-CSF -677 C / A

Wir untersuchten 48 NTX Patienten bezüglich ihres GM-CSF Genotypus auf Position -677. Aus der Auswertung unserer Daten wird deutlich, dass die Gruppe der NTX-Patienten mit einer niedrigen intrazellulären monozytären TLR 4 Expression das C-Allel in ihren Genotypus das C-Allel für den GM-CSF Polymorphismus aufweisen. Die Produkt-Moment-Korrelation nach Pearson weist für die untersuchten Monozytensubsets auf eine sehr starke Beziehung zwischen einer niedrigen intrazellulären TLR 4 Expression der Blutmonozyten und dem GM-CSF-677 C – Allel des Polymorphismus hin Kp ≤ 0,02, Kp ≤ 0,07 Tab. 78, Tab. 79. Der jeweilige Chi-Quadrat weist auf eine signifikante Bindung zwischen einer niedrigen intrazellulären TLR-4 Expression und dem GM-CSF C Polymorphismus (p ≤ 0,042 Tab.76 S. 148, p ≤ 0,008 Tab. 78 S.149, p ≤ 0,014 Tab. 79 S. 150). Eine niedrige intrazelluläre TLR 4 Ausprägung auf allen von uns untersuchten Monozyten kann als genetische Grundlage, das Vorkommen des C- Allels für den GM-CSF -677 C/A Polymorphismus haben, und sich auf diese Weise positiv auf die Langzeitfunktion des Transplantates auswirken.

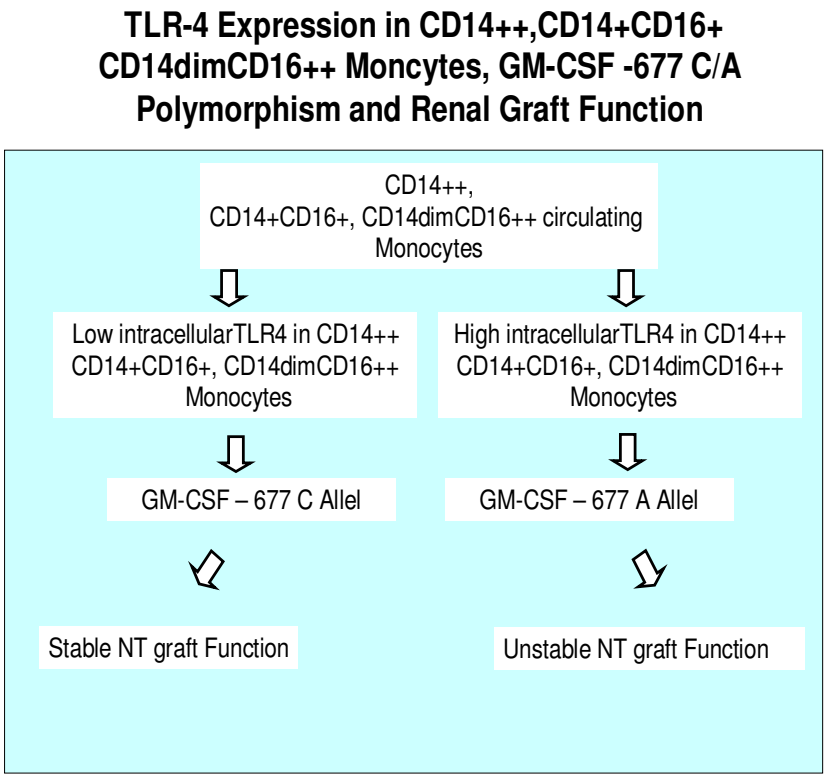


Abb. 56 Das GM-CSF Allel ist in der Gruppe der NTX Patienten mit einer stabilen Transplantatfunktion auf alle von uns untersuchten Monozytengruppen (CD14++, CD 14+CD16+, CD14+16++) vorhanden. Rafatpanah et al. konnten einen ähnlich positiven Effekt des C-Allels für den GM-CSF Polymorphismus in ihrer Studie an Patienten mit einer atopischen Dermatitis aufzeigen (Rafatpanah M. 2003)

14.32 Untersuchung des VDR (Vitamin D Rezeptor) BsmI Polymorphismus

Der Vitamin D Rezeptor gehört zur Gruppe der Hormonrezeptoren, welche als nukleäre Rezeptoren wirken. Steroidhormonrezeptoren regulieren und steuern, durch die Anbindung eines Liganden als Transkriptionsfaktor, die Aktivierung und Expression ihrer Zielgene. Der Vitamin D Rezeptor (VDR) gehört neben den Retinol-Säure-Rezeptor (RAR) und dem Thyroidhormon-Rezeptor (TR), zur Typ II Klasse der Nicht-Steroidhormon-Rezeptoren (Carson-Jurica M.A. 1990, Beato M. 1995, Mangelsdorf D.J. 1995, Murphy L.C. 2002). Der Vitamin D Rezeptor unterscheidet sich in seinem Aufbau gegenüber der weiteren Rezeptoren durch seine kurze N-terminale Domäne. Die aktive Form des Vitamin D, das 1-α,25-Dihydrocholecalciferol (VD3), bindet an den nukleären Vitamin D Rezeptor. Dieser Komplex aus Ligand und Rezeptor reguliert als Transkriptionsfaktor den Metabolismus des Knochens (Ca2+, Phosphat-Homöostase). Weitere Regulierungsmechanismen des aktivierten Vitamin D (VD3) ist die Sekretion des Parathormon, Erhaltung der epidermalen Integrität und die Funktion der Makrophagen. Die Modulation und Regulierung aller Prozesse erfolgt auf transkriptioneller Ebene durch Steuerung von Genen, die unter anderem auch an der Zellproliferation,

Differenzierungsvorgängen und Zellapoptose beteiligt sind (Welsh J. 2003). Das Gen, welches wiederum die Expression des Vitamin D Rezeptors reguliert, ist 65kB lang und befindet sich auf Chromosom 12 (Labuda M. 1992, Taymans S.E. 1999), in der Nähe des für den Vitamin D-Stoffwechsels wichtigen Enzyms 1-alpha-Hydroxylase (Huang M.C. 1991, Takahashi E. 1990). Polymorphismen im Genotypus des VDR Gens sind sehr häufig. Die Entdeckung der heute am häufigsten untersuchten Polymorphismen erfolgte hauptsächlich durch ein unselektives Screening des Genoms mit Restriktionsenzymen. Die aufgrund von Restriktionsenzymen aufgedeckten Polymorphismen sind ApaI (Faraco J.H. 1989), EconRV, BsmI (Morrison N.A. 1992), TaqI (Morisson N.A. 1994), Tru91 (Ye W.Z. 2000), FokI (Baker A.R. 1988), Cdx2 (Yamamoto H. 1999).

14.33 Einflüsse des VDR-BsmI Polymorphismus auf Nierentransplantierte

Patienten mit einem Nierentransplantat die mit Cyclosporin immunsupprimiert werden, entwickeln einen signifikanten Knochenverlust, wie auch eine erhöhte Rate an Knochenfrakturen (Julian B.H. 1991, Grotz W.H.1994). Die Ursachen für diesen Verlust an Knochen liegen wahrscheinlich in der Immunsupprimierung und einer chronischen metabolischen Azidose. Als weiterer Faktor kann ein vor der Transplantation vorhandener sekundärer Hyperparathyreoidismus, mit einem erhöhten Knochenverlust assoziiert sein (Almond M.K. 1994). Der Effekt des VDR BsmI Polymorphismus auf den Verlust von Knochenmasse nach einer Transplantation wird sehr unterschiedlich in der Literatur bewertet. Die Studiengruppe um Morrison et al. 1994, konnte eine Beziehung zwischen dem bb-Allel des VDR BsmI Polymorphismus und einer Veränderung der Knochenintesität feststellen. Dabei wurde eine verminderte Transkriptionsrate der VDR Genes in Kombination mit der Häufigkeit des bb-Allel beobachtet (Morrison N.A. 1994). In Kontrast zu den Ergebnissen von Morrison et al. stehen die Untersuchungen um die Arbeitsgruppe von Hustmyer, die keinen Zusammenhang feststellen konnten (Hustmyer F.G. 1994). Ein weiterer Einfluss des VDR BsmI Polymorphismus bei Patienten mit einem Nierentransplantat bezieht sich auf den persistierenden sekundären Hyperparathyreoidismus. Ein persistierender sekundärer Hyperparathyreoidismus nach einer Nierentransplantation ist ein häufig beobachtetes Ereignis (Cundy T. 1983). Daneben findet sich ein autonomes Muster der Sekretion des Parathyreoidhormon vergesellschaftet mit einer offenkundigen Hyperkalziämie, die eine Parathyreoidektomie nach sich ziehen kann. Bekannt ist, das Vitamin D an der Proliferation der Parathyroidzellen beteiligt ist. Untersuchungen lassen auf eine Beziehung zwischen den Polymorphismen des Vitamin D Rezeptors und der Sekretion des Parathyroidhormon, sowohl aufgrund eines primären oder sekundären Hyperparathyreoidismus, erkennen (Piergiorgio M. 1998). Studien von

Torres et al. wiesen in ihrer Untersuchung an 34 Nierentransplantierten eine verminderte Sekretion des Parathyroidhormon in der Gruppe, welche das bb-Allel des VDR BsmI Polymorphismus führten (Torres A. 1996). In Kontrast zu den Ergebnissen der Studiengruppe um Torres et al. stehen die Ergebnisse um Piergiorgio et al. und Fernandez et al. Hier wurde eine Beziehung zwischen den BB-Allel des VDR BsmI Polymorphismus und einer verminderten Sekretion des Parathormons festgestellt, dagegen zeigten diesbezüglich das bb-Allel sowie das Bb-Allel keine Korrelation (Piergiorgio M. 1998, Fernandez E. 1997).

Besonderheit des VDR ist, dass er nicht nur auf der antigenpräsentierende Zellen exprimiert wird, sondern auch auf Lymphozyten nach deren Aktivierung vorkommen kann (Hewison M. 2003, van Etten E. 2005). Die aktiver Form des Vitamin D, das 1-α,25-Dihydrocholecalciferol (VD3), hemmt die Zellprogression der T-Lymphozyten und reduziert dadurch die Freisetzung von Zytokinen (Takeuchi A. 1998). VDR Agonisten könnten eine interessante Option bei der Immunmodulation Nierentransplantierter bieten, da bereits aus vorausgegangene Studien ihr additiver Effekt in Kombination mit Cyclosporin, auf das Transplantat bekannt ist (Redaelli C. 2002, O´Herrin J. 2002). Bis zum heutigen Zeitpunkt existieren nur wenige Studien, die einen möglichen Zusammenhang zwischen VDR Polymorphismen und einer Transplantation untersucht haben. Middleton et al. konnten in ihren Untersuchungen eine verminderte Abstoßungsreaktion nach Knochenmarkstransplantation und dem Auftreten des VDR BsmI BB Allels im Genom feststellen (Middleton PG. 2002). Die Arbeitsgruppe um Lavin et al konnte an Nierentransplantierten eine signifikante Assoziation zwischen dem VDR FokI T Allel und einer guten Langzeitfunktion des Transplantates feststellen (Lavin P. 2007). Der Effekt der übrigen VDR-Polymorphismen darunter auch des VDR BsmI Polymorphismus auf Nierentransplantate konnte bis zum heutigen Zeitpunkt nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die Untersuchung von Azarpina et al. an Nierentransplantierten hat keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen akuten Abstossungsreaktionen und dem VDR Bsm I Polymorphismus feststellen können. Jedoch weist die Studie einige Limitierungen auf (Azarpina N. 2009). Unsere eigenen vorangegangenen wie auch aktuellen immunologischen Untersuchungen an Nierentransplantierten zeigen auf molekularer Ebene, dass eine gute und stabile Langzeitfunktion des Nierentransplantates immunologisch eine verminderte CD14 Expression und eine verminderte Zytokinfreisetzung voraussetzen (Scherberich J.E. 2008). Wir gehen davon aus, dass diese Feststellung in die Betrachtung der Molekulargenetik einfließen muss um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Transplantatfunktion und den Effekt eines VDR BsmI Polymorphismus zu erkennen.

Neuere Untersuchungen fokussieren auf einen Zusammenhang von VDR-Polymorphismen (VDR BsmI, TaqI) mit spezifischen Tumorverhalten (Ruggiero M. 1998, Lundin A.C. 1999). Studien an nierentransplantierten Patienten stehen jedoch hierzu noch aus.

14.34 Monozytäre CD14+CD16++ TLR 4 extrazelluläre Expression und VDR BsmI Polymorphismus

In unseren NTX-Gruppen untersuchten wir den Zusammenhang zwischen der immunologischen Ausprägung des TLR 4 extrazellulär Rezeptors auf den CD14+CD16++ Monozyten und den VDR-BsmI Polymorphismus. In der Gruppe der niedrigen extrazellulären TLR 4 Expression haben 30,3% der Patienten das BB-Allel in ihrem Genotypus, 6,1% das bb-Allel und 15,2% sind Heterozygoten. Die molekulargenetische Untersuchung unserer NTX-Kollektive ergibt eine signifikante Assoziation zwischen dem VDR-BsmI Polymorphismus und der extrazellulären TLR 4 Expression auf den CD14+CD16++ Monozyten ($p \leq 0{,}05$, $Kp \leq 0{,}014$ Tabelle 74). Begründet liegt dieser Zusammenhang in der Häufigkeit des BB-Allel in der Gruppe der NTX-Patienten mit einer niedrigen Expression des TLR 4 Rezeptors auf ihren CD14+CD16++ Monozyten. Statistisch wird dieser Zusammenhang durch einen sehr starken Korrelationskoeffizienten $p \leq 0{,}014$ (Tabelle 74) nach Pearson bestätigt, was auf eine sehr starke Bindung zwischen diesen beiden Merkmalen schließen lässt.
Die molekulargenetische Prädisposition für das BB-Allel des VDR BsmI Polymorphismus scheint für eine ausgewogene Calcium-Phosphat Homöostase von Vorteil zu sein. Morrison et al. konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem BB-Allel und einer hohen Osteocalcin Konzentration im Serum erkennen (Morrison N.A. 1994). Neben einer unausgewogenen Calcium-Phosphat-Homöostase ist der häufig auftretende sekundäre Hyperparathyreoidismus eine weitere Ursache für die verstärkte Freisetzung von Calcium aus den Knochen Nierentransplantierter. Molekulargenetisch liegt wahrscheinlich, nach Studien um Piergiorgio et al. und Fernandez et al., die Ursache im BB-Allel des VDR BsmI Polymorphismus. Das Auftreten BB-Allel im Genom für den VDR-BsmI Polymorphismus ist für eine verminderte Sekretion des Parathormon verantwortlich, und als Folge davon für eine verbesserte Knochenhomöostase ausschlaggebend (Piergiorgio M. 1998, Fernandez E. 1997). Aus unserer aktuellen Untersuchung an Langzeit-nierentransplatierten (NTX > 14 Jahre Patienten) konnten wir in dieser Patientengruppe eine konstant niedrige Calciumkonzentration und eine signifikante Häufigkeit des BB Allels für den VDR-BsmI Polymorphismus beobachten. Die Langzeitbeobachtung unseres NTX Patientenkollektiv macht deutlich, dass mit zunehmender Verschlechterung der Organfunktion das Serumcalcium parallel zur NT-Funktion über die Jahre abnimmt. Alle von uns untersuchten instabilen NTX Subgruppen zeigen im Vergleich zu den von uns bestimmten stabilen Gruppen signifikant erniedrigte Calciumkonzentrationen s Tab. 21a. Neben der Calcium-Homöostase untersuchten wir in diesen Zusammenhang das Vorkommen des BB Allels für den VDR-BsmI in unserem NTX-Kollektiv (NTX > 14 Jahre - NTX < 14 Jahre Patientengruppe mit instabiler NT Funktion)

mit der TLR 4 Expression auf den CD14+CD16++ Monozyten. Die Verteilung des bb-Allel in unseren NTX-Patienten weist in der Gruppe der NTX < 14 Jahre Patienten mit einer instabilen NT Funktion eine höhere Häufigkeit gegenüber Langzeittransplantierten. Die Häufigkeitsverteilung der extrazellulären TLR 4 Rezeptoren deutet für die NTX < 14 Jahre Patienten mit einer instabilen NT Funktion eine höhere Dichte auf den CD14+CD16++ Monozyten. Der Koeffizient $p \leq 0{,}064$ nach Mann-Whitney zeigt, dass in der Gruppe der NTX < 14 instabilen Patienten die CD14+CD16++ Monozyten tendenziell eine höhere extrazelluläre TLR 4 Rezeptordichte aufweisen. Dies kann sich auf das Langzeitüberleben des Transplantates negativ auswirken, da diese auf Endotoxin als Stimulus stärker reagieren können (Tab.). Wir gehen von der Annahme aus, dass eine ausgewogene Calcium-Phosphat-Homöostase in Kombination mit einer niedrigen TRL 4 Expression auf CD14+CD16++ exprimierenden zirkulierenden Blutmonozyten, eine für die langfristige Transplantatfunktion günstige Konstellation darstellen.

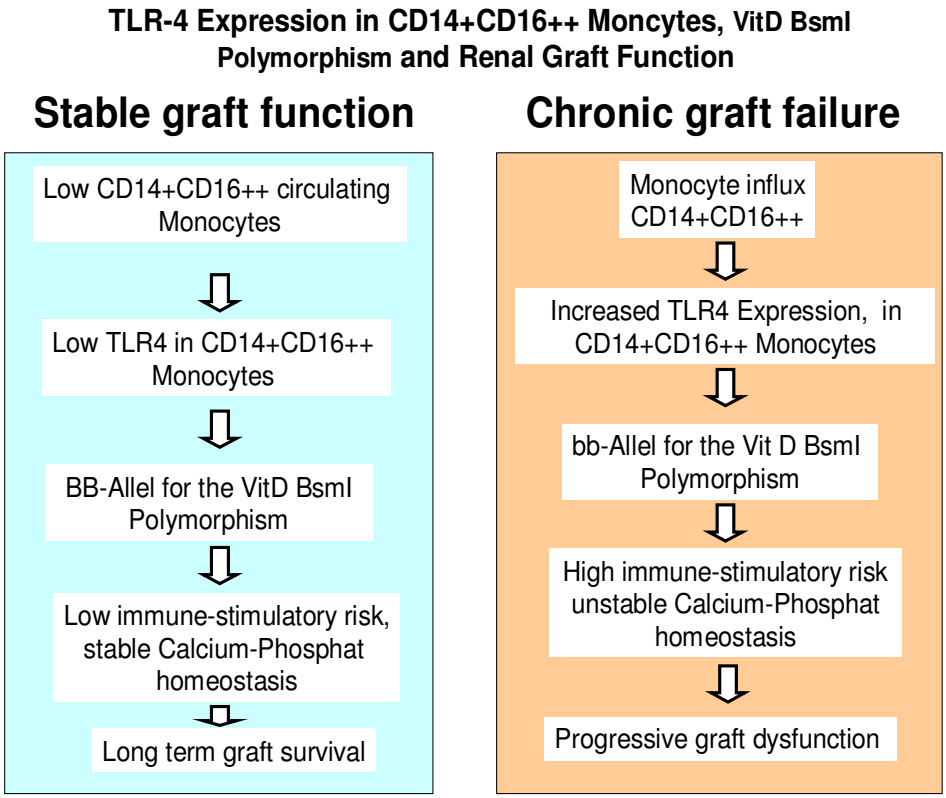


Abbildung 57: Effekt zwischen VitD BsmI Polymorphismus und TLR 4 Expression in CD14+CD16++ Blutmonozyten.

15. Zusammenfassung

Die progressive chronische Transplantatdysfunktion nach Nierentransplantation mündet in den kompletten Verlust des Organs und führt wieder zur lebenserhaltenden Nierenersatztherapie durch Dialyse. Verbesserte Möglichkeiten in der Spender/Empfänger Vorauswahl, z.B. über Histokompatibilitätsanalysen, Präsenz präformierter Antikörper, Art der renalen Grunderkrankung des Empfängers, vor Transplantation, wie auch verbesserte Immunsuppressiva bzw. immunmodulierende Pharmaka, können das Risiko einer Transplantatdysfunktion verringern. Ungeachtet verbesserter organerhaltender Maßnahmen hat sich per se das Transplantatüberleben in den letzten 10-15 Jahren nicht wesentlich verlängert. Auch die angenähert „individualisierte“ und durch Blutspiegelbestimmungen „optimierte“ Immunpression ist, wie unsere früheren Analysen ergaben, nicht in der Lage, den proinflammatorischen Status von NTX Patienten vollständig zu unterdrücken. Die maßgeblichen Zielstrukturen, die im Verlauf einer chronischen Dysfunktion betroffen werden, sind Glomeruli, Tubuli und das Interstitium mit Gefäßen, Fibroblasten, Makrophagen, dendritische Zellen. Histologisch betrachtet kommt es zur Glomerulosklerose, Tubulusatrophie und interstitieller Fibrosierungen. Die daraus resultierenden klinischen Anzeichen, die auf eine Dysfunktion des Transplantates deuten, sind eine verstärkte Proteinurie und ein (langsam progredienter) Anstieg harnpflichtiger Stoffe im Serum.

Aus vorausgegangenen Studien der Arbeitsgruppe um Scherberich et al. ist bekannt, dass die zelluläre Phänotypie peripherer Blutmonozyten bei Nierentransplantierten ausschlaggebend für die gute Funktion des Transplantates ist. Das histologische Bild der zellulären Infiltration eines Nierentransplantates während einer akuten Abstoßungsreaktion prägen nicht ausschließlich Monozyten / Makrophagen, sondern auch T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und NK–Zellen. Jedoch hat die Infiltration mit T-Lymphozyten keinen ausschlaggebenden Effekt auf den Verlauf einer akuten Abstoßungsreaktion, im Vergleich zur monozytären Infiltration des Transplantates (Girlanda R. 2008). Die verstärkte Infiltration des Nierentransplantates mit CD14+CD16+ Monozyten verstärkt die Abstoßung des Organs und kann als Surrogatparameter für den klinischen Verlauf des Transplantates herangezogen werden (Estner H., Scherberich J.E. 2004). Ziel unserer aktuellen Studie war die Untersuchung immunologischer Parameter die eine Verlaufsprognose bezüglich einer guten und stabilen Organfunktion erlauben. Wir fokussierten hierfür unsere immunologischen Analysen sowohl an Langzeitransplantierten (NT Funktion > 14 Jahre) als auch an Nierentransplantierten mit einer instabilen Organfunktion. Wir untersuchten das Verhalten funktioneller Zellmarker CD14, CD16, HLA-DR, TLR 2 und TLR 4 auf verschiedenen Monozytensubpopulationen. Darüber hinaus untersuchten wir die molekulargenetischen Grundlagen Langzeittransplantierter (NTX > 14 Jahre) gegenüber einer instabilen Transplantatgruppe, bezogen auf der molekular-genetischen Phänotypie sowohl für pro- als auch antiinflammatorischer Zytokine und des Vitamin D Rezeptors.

Wir untersuchten 130 nierentransplantierte Patienten bezüglich ihrer klinischen-chemischen Blutparameter und Ihrer Proteinausscheidung im Urin über einen Zeitraum von drei Jahren. Aus dem Gesamtkollektiv an Nierentransplantierten wurde über einen „Algorithmus“ eine Subgruppe an Patienten definiert, die klinisch vor einer chronischen Transplantatdysfunktion standen, oder sich schon bereits im Status einer Transplantatdysfunktion befanden (NTX < 14 Jahre Patienten mit einer instabilen NT Funktion). Daneben bestimmten wir aus dem Gesamtkollektiv eine Patientengruppe mit einem Transplantatalter (Alter nach Organtransplantation) von über 14 Jahren. In diesen beiden Patientengruppen sowie in allen weiteren NTX-Subgruppen untersuchten wir die zellimmunologische Phänotypie auf drei Monozytenpopulationen des peripheren Blutes (CD14++, CD14++CD16+, CD14+CD16++[CD14dim/CD16++]). Monozytenzellen können sowohl als Ziel- und Effektorzellen der chronischen Transplantatdysfunktion betrachtet werden. Unserer aktuelle Fragestellung beschäftigte sich unter anderem, ob zellspezifische monozytäre immunologische Merkmale als potenzielle „Surrogatmarker“ für den Verlauf einer Transplantatdysfunktion herangezogen werden können.

Untersucht wurden auf den CD14++, CD14+CD16+ und CD14+CD16++(CD14dimCD16++) Monozyten die Gesamtexpression des CD14 und CD16 Differenzierungsmarkers, die HLA-DR Antigenpräsentation, sowie die TLR 2 und TLR 4 (intrazellulär und extrazellulär) Expression. CD14 ist ein Oberflächendifferenzierungsmarker der auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) vorkommt. Charakteristisch für den CD14 Marker ist das Fehlen einer transmembranen Domäne und seine besondere, über einen GPI-Anker vermittelte Befestigung auf der Zelloberfläche. CD14 existiert neben seiner membrangebundenen Form (mCD14) auch in einer löslichen Form (sCD14). Der Differenzierungsmarker CD14 ist an der Erkennung des Endotoxins LPS maßgeblich beteiligt. Durch das komplette Fehlen einer transmembranären Signaltransduktion braucht es weiterer Oberflächenrezeptoren für die Signaltransduktion. Solche Rezeptoren sind Toll-Like Rezeptoren. CD16 ist ein weiterer Differenzierungsmarker auf der Oberfläche immunologisch aktiver Zellen. CD16 ist für die Erkennung von monomären IgG und polymeren IgG Komplexen verantwortlich. Untersuchungen der Monozytenpopulationen konnten in der Vergangenheit eine Monozytensubpopulation ausmachen, die eine sehr niedrige CD14 und eine hohe CD16 Expression auf ihrer Oberfläche aufwiesen.

Toll-Like Rezeptoren sind Transmembranproteine, die sich an der Erkennung einer Vielzahl pathogener Oberflächenmuster (PAMP) beteiligen. Zu den bekanntesten Vertretern pathogener Muster gehören der Ligand LPS (Lipopolysaccharid, Endotoxin) gramnegativer Bakterien, PGA (Peptidoglykan) und LTA (Lipoteichonsäure) grampositiver Bakterien. Toll-Like Rezeptoren lösen über eine intrazelluläre Signaltransduktions-Kaskade unter teilweiser Vermittlung von NFkappaB eine (proentzündliche) Immunantwort aus. TLR Rezeptoren modulieren zudem nach wiederholter Stimulation die Immunantwort, die bis zur Immuntoleranz geht.

HLA Antigene sind Glykoproteine, die an der Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen durch das Immunsystem beteiligt sind. HLA Antigene der Klasse II sind von allen Antigenen hauptsächlich an der Histokompatibilität der Nierentransplantate beteiligt. Eine Übereinstimmung der HLA DR Antigene zwischen Spender und Empfänger, korreliert mit einem langen Transplantatüberleben.

Wir bestimmten in unserer Studie die genetische Prädisposition Nierentransplantierter bezüglich der genetischen Eigenschaft für insgesamt vier Zytokine. Die vier untersuchten Zytokine waren IL-4, IL-10 aus der Gruppe der anti-inflammatorischen Zytokine sowie IFN-γ und GM-CSF aus der Gruppe der proinflammatorischen Zytokine. Die Regulation von Zytokinen geschieht u.a. auf genetischer Ebene. Polymorphismen im Genotypus verändern die Bindung transkriptioneller Faktoren und verändern so die Genaktivität. Die Balance pro-und antiinflammatorischer Zytokine modulieren auch das Kurz- oder Langzeitüberleben eines Nierentransplantates. Die von uns untersuchten Polymorphismen waren IL 4 -590 C/T, IL 10 -1082 G/A, IFN γ -874 T/A, GM-CSF -677 C/A.

Von den bisher bekannten Polymorphismen des Vitamin D Rezeptors untersuchten wir im Zusammenhang mit der Organtransplantation den VDR-BsmI Polymorphismus. Nierentransplantierte unterliegen einer veränderten Calcium und Phosphathomöostase. In der Regel wirkt noch ein sekundärer Hyperparathyreoidismus nach. Der molekular - genetische Phänotypus des VDR BsmI BB Allel im Genom Nierentransplantierte zeigt eine mögliche positive Auswirkung. Unsere aktuelle Studie vermutete einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Phänotypus des VDR BsmI Polymorphismus und einer guten und stabilen Organfunktion (NTX > 14 Jahre), in Kombination mit der immunologischen Ausprägung auf CD14+CD16++ exprimierenden Blutmonozyten.

Untersuchungsaufbau

Wir untersuchten 130 Nierentransplantierte, darunter 82 männliche und 48 weibliche Patienten. Das mittlere Alter aller Patienten betrug 60 +/-12,8 Jahre. Das

Durchschnittsalter aller Nierentransplantate lag bei 11 +/- 5,6 Jahren. Primäres Kriterium für die Einteilung unserer Patienten war das Transplantatalter (Alter nach Organtransplantation) zu Beginn der Studie. Mithilfe dieses Unterscheidungsmerkmales unterteilten wir unsere NTX-Patienten in vier Hauptgruppen. Die Gruppen bezogen sich auf ein Transplantatalter von 1-4 Jahren, 5-8 Jahren, 9-13 Jahren und über mehr als 14 Jahren. Nach dieser Einteilung der Patienten erfolgte die Evaluierung klinischer und laborchemischer Daten. Dazu gehörten die ursprüngliche Grunderkrankung der Nieren, die zum Verlust der eigenen Nierenfunktion führte, die immunsuppressive Medikation in der Erhaltungsphase nach Transplantation, die klinischen Ereignisse sowie die Begleiterkrankungen nach Transplantation. Alle Patienten wurden in einem regelmäßigen „Recall“ auf ihre klinisch-chemischen Blutparameter und ihre Proteinausscheidung im Harn über die Jahre hin evaluiert. Diese regelmäßige Kontrollen dienten als weiteres Einteilungskriterium in NTX Patienten mit einem *guten* Transplantatverlauf und in NTX Patienten mit einem *instabilen* Transplantatverlauf. Diese Gruppen (guter Verlauf, instabiler Verlauf) wurden sowohl auf zellimmunologische monozytäre Merkmale als auch auf ihre Ausprägung der oben beschriebenen genetischen Polymorphismen hin untersucht.
Anhand dieser beider Kriterien (Transplantatalter, Transplantatverlauf) bestimmten wir zwei Gruppen an Patienten, eine Patientengruppe von 27 Nierentransplantierten mit einem Transplantatalter von >14 Jahren sowie eine zweite Patientengruppe von 24 Nierentransplantierten mit einer instabilen Transplantatfunktion. Die zweite Gruppe Nierentransplantierter mit einer instabilen Organfunktion wiesen (erwartungsgemäß) innerhalb eines Jahres eine Verschlechterung der klinisch erhobenen Parameter (Routine-Laborblutparameter, Zunahme der Proteinurie) auf. Als Kontrollkollektive dienten uns 16 gesunde Probanden, 90 niereninsuffiziente Patienten, die nicht hämodialysiert wurden sowie 49 Patienten unter chronischer Hämodialyse. Diese drei Kontrollkollektive wurden ebenfalls auf zellimmunologische Merkmale ihrer Blutmonozyten untersucht und mit den NTX-Patienten verglichen. Im Zusammenhang mit den molekulargenetischen Analysen gingen zusätzlich 96 gesunde Probanden untersucht. Dies war notwendig geworden, da die von uns ermittelten Häufigkeiten für den IL 4 -590 C/T und IFN γ -874 T/A Polymorphismus Diskrepanzen mit den in der Literatur ermittelten Häufigkeiten aufwiesen.

Ergebnisse

1. Ein zunehmendes Transplantatalter (Alter nach Organtransplantation) ist nicht mit einer verminderten Funktion des Organs gleich zu setzen.
2. Um den Verlauf der Blutparameter und der Proteinurie über die Jahre zu beobachten, ist die Einteilung der NTX-Patienten aufgrund ihres Transplantatalters und nach ihren klinischen Verlauf (Blutparameter, Proteinurie) ausschlaggebend.
3. Aufgrund einer Verschlechterung der Blutparameter und der Proteinurie steigt in der Gruppe der NTX mit einem Transplantatalter von 5 – 8 Jahren und 9 – 13 Jahren der Anteil an Patienten mit einer Dysfunktion des Transplantates.
4. Langzeittransplantierte (NTX>14 Jahre) weisen gegenüber Kurzzeittransplantierten (NTX 1-4) signifikante Veränderungen auf, was die Gesamteiweißausscheidung und die Albuminurie betrifft. Es zeigen sich jedoch in diesem Vergleich keine Veränderungen in der Ausscheidung des alpha1 Mikroglobulin (U) im Harn. Es muss offenbar bei Langzeittransplantierten nicht zwingend zu einer interstitiellen Fibrosierung des Transplantates gekommen sein.
5. Patienten mit einem Transplantatalter von 5–8 Jahren und 9–13 und einer instabilen Organfunktion zeigen eine Verdoppelung des Serumkreatinin, des Albumin im Harn und des alpha-1-Mikroglobulin im Harn gegenüber Patienten mit dem gleichen Transplantatalter und einer guten „stabiler“ Funktion.
6. Mit zunehmendem Transplantatalter und Verschlechterung der NT-Funktion weisen die instabilen TX Patienten eine geringere Serumcalciumkonzentration gegenüber NT Patienten mit einer guten NT Funktion und einem hohen Transplantatalter (NT > 14 Jahre).
7. NTX Patienten mit einer Einfachimmunsuppression in Kombination mit einem Glucokortikoid zeigen das beste Transplantatüberleben, gefolgt von Patienten mit

einer zweifachen Immunsuppression. Das schlechteste Transplantatüberleben hatten NTX Patienten mit einer Kombination aus zwei Immunsuppressiva und einem Glucokortikoid, wie auch Patienten mit einer einfachen Immunsuppression.

8. NTX Patienten haben eine verminderte monozytäre CD14 Expression gegenüber allen anderen Vergleichskollektiven (Gesunde, niereninsuffiziente Patienten, Hämodialysepatienten).
9. Nierentransplantierte, Hämodialysepatienten und Niereninsuffiziente haben gegenüber Gesunden eine verminderte HLA DR Antigenpräsentation. Insgesamt zeigen hier NTX Patienten konstant niedrigere HLA DR Antigene auf der Monozytenoberfläche.
10. Langzeittransplantierte Patienten haben eine niedrigere Expression des TLR 2 Rezeptors auf Monozyten. Die Expression des TLR 2 Rezeptors, bei Nierentransplantierten mit einer instabilen NT Funktion ist erhöht.
11. Die Verteilung des intrazellulären TLR 4 Rezeptors ist bei Langzeittransplantierten erniedrigt. Dagegen ist die intrazelluläre Expression des TLR 4 Rezeptors bei Nierentransplantierten mit einer instabilen Funktion erhöht. Die höchste intrazelluläre TLR 4 Expression weisen Hämodialysepatienten auf.
12. Nierentransplantierte mit hoher Expression des TLR 4 Rezeptors auf CD14++ Monozyten weisen in ihrem Genotyp für den IL4-590 C/T Polymorphismus das T-Allel („high producer“) auf, dass Hinweis auf eine reaktive antiinflammatorische humorale Immunantwort geben kann.
13. Nierentransplantierte mit hoher Expression für den intrazellulären TLR 4 Rezeptor auf CD14++CD16+ Monozyten haben im Genom für den IL4 -590 C/T Polymorphismus das T-Allel. Nierentransplantierte mit instabiler Organfunktion haben gegenüber Langzeittransplantierten signifikant höhere CD 14++CD16+ Monozyten. Molekulargenetische Ursache für eine erhöhte Anzahl pro-inflammatorischer Monozyten kann eine reaktive IL 4 Produktion sein.
14. Nierentransplantierte Patienten mit niedriger extrazellulärer TLR 4 Ausprägung auf den CD16++ Monozyten weisen in ihrem Genom für den IL10 -1082 G/A Polymorphismus häufiger das G-Allel („high producer“) auf. Die Häufigkeit des IL 10 1082 G –Allels ist bei langzeittransplantierten Patienten größer gegenüber instabilen Nierentransplantierten. Eine hohe IL-10 Produktion ist offenbar, für eine stabile Organfunktion nach Transplantation vorteilhaft.
15. Eine erhöhte TLR 2 Expression auf CD14+CD16++ Monozyten nierentransplantierter Patienten korreliert mit einer vermehrten Häufigkeit des T-Allels („high producer“) für den IFN γ-874 T/A Polymorphismus. Eine stimulierte IFN γ Produktion kann bei Nierentransplantierten zu einer progredienten Makrophageninfiltration in das Organ führen. Das Risiko einer Abstoßungsreaktion ist dadurch erhöht. Unsere Untersuchung zeigt eine signifikante Häufigkeit des T-Allels („high producer“) in der Gruppe der Nierentransplantierten mit instabiler Organfunktion, gegenüber Langzeittransplantierten.
16. Für den GM-CSF -677 C/A Polymorphismus findet sich bei Nierentransplantierten ein statistischer Zusammenhang zwischen dem C-Allel und einer niedrigen TLR 4 intrazellulären Expression auf CD14++, CD14++CD16+ und CD14+CD16++ Monozyten. Langzeittransplantierte haben in ihrem Genom, gegenüber instabilen Nierentransplantierten häufiger das C-Allel.
17. Die genetische Untersuchung unseres NTX Kollektives bezüglich des VDR BsmI Polymorphismus ergibt eine Korrelation zwischen einer erhöhten extrazellulären TLR 4 Expression der CD14+CD16++ Monozyten und dem Auftreten des VDR BsmI bb-Allel. Nierentransplantierte mit instabiler NT Funktion (NTX < 14 i) weisen in ihrem Genotyp häufiger das bb-Allel für diesen VDR-BsmI Polymorphismus auf. Das bb-Allel für den VDR-BsmI Polymorphismus bei NTX Patienten führt, nach vorbekannten klinischen Daten, zum Verlust an Knochenmasse, und kann eine Hyperkalziämie und einen sekundären Hyperparathyreoidismus begünstigen.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse belegen, dass durch differenzierte Analysen monozytärer funktionell relevanter Antigene, im Kontext mit Routineparametern, bei Nierentransplantierten eine Risikostratifizierung bezüglich der Transplantatprognose möglich ist.

Teile der Arbeit wurden vorab als Abstracts und Posterpräsentationen veröffentlicht:

- Kongr. der Ges. Nephrologie, Sept. 2008, Tübingen
- Kongr. der Ges. für Nephrologie, Sept. 2009, Göttingen
- Tagung der Eur. Macrophage and Dendritic Cell Soc. (EMDS) Regensburg 2009
- Kongress der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Sept. 2011, Berlin

Farmakiotis A, Scherberich JE: Toll-like receptor 2 (TLR2) Expression of Monocytes in Kidney Allograft-Dysfunction. Nieren-& Hochdruckkrankheiten 37, 522-523 (2008)

Scherberich, JE, **Farmakiotis A**: Risk stratification and cellular immueresponse after short- and long term renal transplantation. Nieren- & Hochdruckkrankheiten 38; 524 (2009)

Scherberich JE, **Farmakiotis A:** Antigen pattern (CD14, CD16, HLA-DR, TLR2, TLR4) of peripheral blood monocytes subsets after short and long term kidney transplantation (ext. abstr.). EMDS (Eur. Macroph. Dendr. Cell Soc.) Regensburg, Band p 94, 2009

Scherberich JE, Rosskopf S, Estner H, **Farmakiotis A**, Guder WG, Hofmann W: Parameter der Transplantatdysfunktion korrelieren mit dem Anstieg zirkulierender Blutmonozyten des CD14+CD16+ HLA-DR+ Phänotyps. (Abstr.) DGfN Mitt. 3; 141 (2011)

Risikostratifizierung und zelluläre Immunantwort nach Kurz- und Langzeit Nierentransplantation

Risk stratification and cellular immune responsiveness after short- and long term renal transplantation J. E. Scherberich; A. Farmakiotis
Nephrologie & Klinische Immunologie, München-Harlaching, LMU, München,

Purpose: To elucidate potential risk profiles defining the clinical outcome in patients after short-and long term kidney transplantation, we assessed various biochemical and immunological parameters, including those of antigen-presenting cells.

Methods: 130 renal transplant patients (TXP) were divided into subgroups according to the time after grafting (I: 1-4 years, II: 5-8 years, III: 9-13 years, IV: >14 years), and defined as functional ”stable” or “unstable” by an algorithm including serum creatinine, change of creatinine within time, urine protein excretion pattern, monocyte expression of HLA-DR and toll-like-receptor (TLR) antigens, as analysed by flow cytometry.

Results: TXP of groups I-III with unstable graft function doubled serum creatinine within one year ($p<0.0001$), increased urine albumin and alpha-1-micro- globulin excretion (<0.001), and reduced Ca++ serum concentration. In all TXP monocyte expression of CD14 and HLA-DR was low compared with normal controls, patients with chronic renal failure, and those under chronic hemodialysis treatment. In vitro activated TLR of cultured monocytes secreted cytokines at an increased rate (Lambert, Scherberich et al.). Long term TXP revealed low grade, stable albuminuria and alpha-1 micro- globulin excretion, and lower TLR2 & TLR4 profiles of monocytes than unstable TXP within groups I-IV ($p<0.01$).

Conclusion: TXP at risk which develop chronic kidney allograft dysfunction can be selected from stable TXP due to changes of conventional biochemical and nontraditional immunological parameters. Down regulation of TLR2 and TLR4 monocyte expression was associated with prolonged renal allograft survival, thus indicating a protective role of innate immunity under these circumstances.

Abbas A.K., Murphy K.M., Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. Nature 1996; 383 (6603): 787-93

Adams D. O. Molecular interactions in macrophage activation. Immunol. Today 1989; 10: 33–35.

Agarwal S.K., Dash S.C., Tiwari S.C., Saxena S., Mehta S., Guleria S., Dwivedi S.N., Mehra N.K. Results of conversion from triple-drug to double-drug therapy in living related renal transplantation. Transplantation 1995; 59(1): 27-31.

Akdis C. J. A., Akdis M, Faith a, Blaser K. A molecular basis for T cell suppression by IL-10: CD28-associated IL-10 receptor inhibits CD28 tyrosine phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase binding. FASEB J 2000; 14(12) : 1666-8

Akira S. The role of IL-18 in innate immunity. Curr. Opin. Immunol.2000; 12: 59–63.

Alachkar N, Rabb H, Jaar BG. Urionary Biomarkers in Akute Kidney Transplant Dysfunction. Nephron Clin Pract. 2011; c173-c181

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter P. Molecular Biology of the Cell. New York, Garland Publishing. 2000

Alexopoulou L., Holt A.C., Medzhitov R., Flavell R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NK-kB by Toll-like receptor 3. Nature 2001; 413: 732–738.

Alison A., Almquist S., Müller C. In vitro immunsuppressive effects of mycopheloci acid and ester prodrug. Transplant. Proc. 1991; 2: 10-14

Allavena P.L., Longoni D., Bernasconi S., Stoppacciaro A., Ruco L., Mantovani A. IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. Eur J Immunol 1998; 28(1): 359-69

Almartine E., Berthoux P., Mariat C., Cambazard F., Berthoux F. Interleukin-10 Promoter Polymorphisms and Susceptibility to Skin Squamous Cell Carcinoma After Renal Transplantation J. Invest. Dermatol. 2003; 120: 99-103

Almond M.K., Kwan J.T.C., Evans K., Cunningham J. Loss of regional bone mineral density in the first 12 months following renal transplantation. Nephron. 1994; 66: 52-57

Almond P.S., Matas A., Gillingham K., et al: Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients. Transplantation 1993; 55: 75

Amer H., Fidler ME, Myslak M et al.: Proteinuria after kidney transplatation, relationship to allograft histology and survival. Am J Transplant 2007;(7): 2748-2756

Ancuta P., Weiss L., Haeffner-Cavaillon N. CD14+CD16++ cells derived in vitro from peripheral blood monocytes exhibit phenotypic and functional dendritic cell-like characteristics. Eur. J. Immunol.2000; 30:1872-83.

Anderson K.V. Toll signaling pathways in the innate immune response. Current Opinion in Immunology 2000; 12: 13–19

Anderson P., Caligiuri M. , O'Brien C. , Manley T., Ritz J. and Schlossman S.F. Fc-y receptor type III (CD16) is included in the ı NK receptor complex expressed by human natural killer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990; 87: 2274

Andres A., Morales J.M., Praga M., Campo C., Lahera V., Garcia-Robles R., Rodicio J.L., Ruilope L.M. L-arginine reverses the antinatriuretic effect of cyclosporin in renal transplant patients. Nephrol. Dial. Transplant. 1997; 12 (7): 1437-1440

Anegon I., Cuturi MC., Trinchieri G. and Perussia B. Interaction of Fc receptor (CD16) ligands induces transcription of interleukin 2 receptor (CD25) and lymphokine genes and expression of their products in human natural killer cells. J. Exp.Med 1988; 167: 452

Asderakis A., Sankaran D., Dyer P., Johnson R.W., Pravica V., Sinnott P.J., Hutchinson I.V. 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; 71: 674-677

Ayoub G., Terasaki P. HLA-DR matching in multicenter singletyping laboratory data. Transplantation 1982; 33: 515-517

Azarpira N, Sagheb MM, Geramizadeh B, Darai M Vitamin D receptor genotypes and kidney allograft rejection. Mol Biol Rep. 2009; 36(8):2387-92

Azarpira N., Aghdaie M.H., Geramizadeh B., Behzadi S., Nikeghbalian S., Sagheb F., Rahsaz M., Behzad-Behbahanie A., Ayatollahi M., Darai M., Azarpira M.R., Benihashemie M., Tabei S.Z. Cytokine gene polymorphisms in renal transplant recipients. Exp. Clin. Transplant. 2006; 4 (2): 528-31.

Bach E.A., Aguet M., Schreiber R.D. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. Annu Rev Immunol. 1997; 15: 563-91.

Baer P.C., Scherberich J.E., , Bereiter-Hahn J. Induction of RANTES, HLA-DR, and intracellular adhesion molecule-1 on highly purified distal tubular cells from human kidney. Transplantation 2000; 69(11): 2456-2459

Baker A.R., McDonnell D.P., Hughes M., Crisp T.M., Mangelsdorf D.J., Haussler M.R., Pike J.W., Shine J., O'Malley B.W. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988; 85: 3294–3298.

Barsony J. and McKoy W. Molybdate increases intracellular 3,5-guanosine cyclic monophosphate and stabilizes vitamin D receptor association with tubulin-containing filaments. J Biol Chem 1992; 267: 24457–24465

Bartlett N.W., Murine interferon lambdas (type III interferons)exhibit potent antiviral activity in vivo in a poxvirus infection model. Journal of General Virology 2005; 86: 1589–1596

Basadona G.P, Matas A.J., Gillingham K.J., et al. Early versus late acute renal allograft rejection: impact on chronic rejection. Transplantation 1993; 55: 993

Bazil V., Baudys M., Hilgert I., Stefanova I., Low M.G., Zbrozek J., Horejsi V. Structural relationship between the soluble and membrane-bound forms of human monocyte surface glycoprotein CD14. Mol Immunol 1989; 26: 657-662.

Bazil V., Horejsi V., Hilgert I. The workshop myeloid panel antibodies recognizing the 53-kDa molecular weight monocyte antigen (CD14). In: McMichael AJ. ed. Leucocyte Typing III, White Cell Differentiation Antigens. Oxford Univ. Press: Oxford, 1986; 611-613.

Bazil, V., Strominger, J.L. Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes. J. Immunol. 1991; 147: 1567-1574

Beato M., Herrlich P. and Schutz G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. Cell 1995; 83(6): 851-7.

Beekhuizen H., Blokland I., Corsel Furth R. CD14 contributes to the adherence of human monocytes to cytokine-stimulated endothelial cells. J Immunol 1991; 147 : 3761-3767.

Belvin M.P., Anderson K.V. A conserved signalling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway. Ann Rev Cell Dev Biol 1996; 12: 2443-2450

Beretta L., Gabbay M., Berger R., Hanash S.M., Sonenberg N. Expression of the protein kinase PKR in modulated by IRF-1 and is reduced in 5q- associated leukemias. Oncogene 1996; 12: 1593–1596.

Bernard A., Boumsell L., Dausset J., Milstein C., Schlossman S.F. Leucocyte typing. Human

leucocyte differentiation antigens detected by monoclonal antibodies . Specification- Classification-Nomenclature. Springer Verlag, New York 1984a; 82: 404-410, 424-433,

Bestard O, Cruzado JM, Franquesa MI, Grinyo JM. Biomarkers in renal transplantattion. Curr Opin Organ Transplant 2010; 15: 467-473

Betz M., Haensch G.M., Rauterberg E.W., Bommer J., Ritz E., Cuprimmoniun membranes stimulates Interleukin I release and arachidonic acid metabolism in monocytes in the absence of complement. Kidney Int 1988; 34: 437-442

Beutler B.C. The biology of cachectin/TNF-a primary mediator of the host response. Annu Rev Immunol 1989; 7: 625-55

Bigler R.D., Khoo M., Lund-Katz S., Scerbo L. and Esfahani M. Identification of low density lipoprotein as a regulator of Fc receptor-mediated phagocytosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990; 87: 4981

Birkenmaier C., Hong Y.S., Horn J.K. Modulation of the endotoxin receptor (CD14) in septic patients. J Trauma 1992; 32: 473-479.

Bittar M.N., Khasati N.H., Deiraniya A.K., Yonan N. Interleukin-4 C-590T Polymorphism Has No Role in Coronary Artery Bypass Surgery. Asian Cardiov. Thorac. Ann. 2007; 15(3): 214-17

Black R. K. S., Sleath P., Greenstreet T., Virca G.D., March C., Kupper T. The proteolytic activation of interleukin-1 beta. Agents Actions 1991; Suppl.35:85-9

Boehm U., Klamnp T., Groot M. and Howard, J. C. Cellular responses to interferon-γ . Annu. Rev. Immunol. 1997; 15: 749–795

Bogdan C. and Nathan C. Modulation of macrophage function by transforming growth factor 8, interleukin-4, and Interleukin-10. Ann. NY Acad. Sci. 1993; 685:713-739

Bonecchi R., Bianchi G., Bordignon P. P., D'Ambrosio D., Lang R., Borsatti A., Sozzani, S., Allavena P., Gray P. A., Mantovani A., and Sinigaglia, F. J. Exp. Med. 1998; 187: 129–134

Brandt S.J., Peters W.P., Atwater S.K., Kurtzberg J., Borowitz M.J., Jones R.B., Shpall E. J., Bast R.C.Jr., Gilbert C.J. and Oette D.H. Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on hematopoietic reconstitution after high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. N Engl J Med 1988; 318: 869-876.

Braudeau C., Ashton-Chess J., Giral M., Dugast E., Louis S., Pallier A., Braud C., Moreau A., Renaudin K., Soulillou JP., Brouard S. Contrasted blood and intragraft toll-like receptor 4 mRNA profiles in operational tolerance versus chronic rejection in kidney transplant recipients. Transplantation 2008; 86(1):130-6

Braun W.E. Renal transplantation: Basic concepts and evolution of therapy. J. Clin. Aphersesis 2003; 18: 141-152

Brightbill H.D., Libraty D.H., Krutzik S.R., Yang R.B., Belisle J.T., Bleharski J.R., Maitland M, Norgard M.V., Plevy S.E., Smale S.T. et al.: Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through Toll-like receptors. Science 1999; 285: 732-736.

Brown A.J., Dusso A, and Slatopolsky E. Vitamin D. Am J Physiol Renal Physiol 1999; 277: F157–F175

Brown A.J., Zhong M., Finch J., Ritter C. and Slatopolsky E. The roles of calcium and 1,25-dihydroxy Vitamin D3 in the regulation of vitamin D receptor expression by rat parathyroid glands. Endocrinology 1995; 136: 1419–1425

Brugger W., Reinhardt D., Galanos C., Andreesen R. Inhibition of in vitro differentiation of human monocytes to macrophages by lipopolysaccharide (LPS): phenotypic and functional analysis. Int Immunol 1991; 3: 221-227.

Budde K., Waiser J., Neumayer H.H . The diagnostic value of GM-CSF and IL-6 determinations in patients after renal transplantation. Transpl. Inter.1994; 7 Suppl 1: 97-101

Bühl A., Zöffel P. SPSS 12 Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows Pearson Studium, 9. Auflage.

Byrd-Leifer C.A., Block E.F., Takeda K., Akira S., Ding A.: The role of MyD88 and TLR4 in the LPS-mimetic activity of Taxol. Eur J Immunol 2001; 31: 2448-2457.

Callard R.G. The Cytokine FactsBook. San Diego, Academic Press Inc. 1994

Calzada-Wack J.C., Frankenberger M., Ziegler-Heitbrock HWL.Interleukin-10drives human monocytes to CD16 positive macrophages. J. Inflamm. 1996; 46: 78-85.

Calzada-Wack J.C., Ziegler-Heitbrock H.W. Interleukin-10 drives human monocytes to CD16 positive macrophages. J. Inflamm. 1996; 46(2): 78-85.

Campbell P.M. Pathology of acute rejection in the renal allograft ASHI 2004; 3: 86-90

Campos M.A., Almeida I.C., Takeuchi O., Akira S., Valente E.P., Procopio DO, Travassos L.R., Smith J.A., Golenbock D.T., Gazzinelli RT: Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. J Immunol 2001;167: 416-423.

Cantin E., Tanamachi B., Openshaw H. Role for gamma interferon in control of herpes simplex virus type 1 reactivation. J. Virol. 1999; 73: 3418–3423.

Cardella C.J. , Davies P., and Allison A.C. Immune complexes induce selective release of lysosomal hydrolases from macrophages. Nature 1974; 247:46

Carr P.D., Gustin S.E., Church A.P., Murphy J.M., Ford S.C., Mann D.A., Woltring D. M., Walker I., Ollis D.L. and Young I.G. Structure of the complete extracellular domain of the common beta subunit of the human GM-CSF, IL-3, and IL-5 receptors reveals a novel dimer configuration. Cell 2001; 104: 291-300.

Carson-Jurica M. A., Schrader W.T., O'Malley B.W. Steroid receptor family: structure and functions. Endocr Rev 1990; 11(2): 201-20.

Cartwright N.H., Demaine A.G., McGonigle R.J. et al. Cytokine secretion in mixed lymphocyte culture: a prognostic indicator of renal allograft rejection in addition to HLA mismatching. Transpl. Immunol. 2000; 8: 109-114.

Cecka J.M., Terasaki P.I. The UNOS scientific renal transplant registry. United Network for Organ Sharing. Clin.Transpl. 1995; 1

Chan S., und V.N. Reinhold. Detailed structural characterization of Lipid A: Electrospray ionization coupled with tandem mass spectrometry. Anal. Biochem. 1994; 218: 63-73

Chenchanna-Merzhäuser M. Immunhistologische Analysen zur Expression glomerulärer und tubulointerstitieller Proteine im Rahmen der strukturellen Adaptation des menschlichen Nephrons bei chronischem Nierenversagen, Inaugural-Dissertation, J.W. Goethe-Universität, FB Humanmedizin, 2006

Chertow G.M., Milford E.L., Mackenzie H.S., Brenner B.M. Antigen-independent determinants of cadaveric kidney transplant failure. JAMA 1996; 276: 1732 Clin Transplant 2003; 337-86.

Chomarat P., Rissoan M.C., Banchereau J., MiossecP. Interferon gamma inhibits interleukin 10 production by monocytes. J. Exp. Med 1993; 177: 523-527

Christofaro P., Opal S.M. Role of Toll-like receptors in infection and immunity: clinical implications. Drugs. 2006; 66(1): 15-29. Review.

Clarkson S.B., Ory P.A. Developmentally regulated IgG Fc receptors on cultured human monocytes J. Exp. Med. 1988; 167: 408-417

Cleveland M. G., Gorham J. D., Murphy T. L., Tuomanen E., and Murphy K. M. Infect. Immun. 1996; 64: 1906–1912

Cohen L., Henzel W.J., Baeuerle P.A. IKAP is a scaffold protein of the IkappaB kinase complex. Nature 1998; 395: 292-296.

Colvin RB, Hirohashi T, Farris AB et al. Emerging role of B cells in chronic allograft dysfunction. Kidney Int. 2010; Suppl. 119, S 13- S 17

Crapper R.M., Vairo G., Hamilton I., Clark-Lewis I., Schroeder J.W. Stimulation of bone marrow-derived and peritoneal macrophages by a T lymphocyte-derived hemopoietic growth factor,persisting cell-stimulating factor. Blood 1985; 66: 859

Crossley M., Whitelaw E., Perkins A., Williams G., Fujiwara Y., Orkin S.H. Isolation and characterization of the cDNA encoding BKLF/TEF-2, a major CACCC-box-binding protein in erythroid cells and selected other cells. Mol Cell Biol 1996; 16: 1695-705.

Cundy T., Kanis J.A:, Heyen G., Morris P.J., Oliver D.O. Calcium metabolism and hyperparathyreoidism after renal transplantation. Q. J. Med. 1983; 205: 67-68

D´Andrea An., Ma X., Aste-Amezaga M., Paganin C., Trinchieri G. Stimulatory and Inhibitory Effects of Interleukin (IL)-4 and ID13 on the Production of Cytokines by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Priming for ID12 and Tumor Necrosis Factor-α Production J Exp Med 1995; 181: 537-546

Da Silva Correia J., Soldau K., Christen U., Tobias P.S., Ulevitch R.J. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. Transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. J Biol Chem 2001; 276: 21129-21135.

Dallman M.J. Cytokines as mediators of organ graft rejection and tolerance. Curr Opin Immunol. 1993; 5: 788-793

D'Andrea A., Ma X., Aste-Amezaga M., Paganin C., Trinchieri G. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production.J. Exp. Med. 1995; 181: 537-46.

Daniel V., Pasker S., Reiss U. et al. Preliminary evidence that monitoring of plasma granulocyte-macrophage colony-stimulating factor may be helpful to differentiate between infection and rejection in renal transplant patients. Transplant. Proc. 1992; 24: 2770-2.

De Groot K., Kuklik K.a, Bröcker V., Schwarz A., Gwinner W., Kreipe H., Haller H., Fliser D, Mengel M. Toll-Like Receptor 2 and Renal Allograft Function. Am J Nephrol 2008;28:583–588

De Waal Malefyt R.A.J., Bennett B., Figdor C.G., De Vries J.E. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. J. Exp. Med.,1991; 174 (5): 1209-20.

De Waal Malefyt R.Y.H., De Vries J.E.. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. J Immunol 1993; 150(11): 4754-65

De Waal Malefyt R.Y.H., Figdor C.G. and De Vries J.E. Effects of interleukin-4 on monocyte functions: comparison to interleukin-13. Res. Immunol. 1993; 144: 629-633.

De Waal Malefyt, R.Y.H., Figdor C.G., Huijbens R., Mohan S., Peterson B., Bennett J. Culpepper W., Dang G. andJ.E. De Vries. Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. J. Immunol. 1993; 151: 6370-6381.

Debets J.M.H., van de Winkel J.G.J., Ceuppens J.L., Dieteren I.E.M. and Buurman WA. Cross-linking of both Fc'yRI and Fc'yRII induces secretion of tumor necrosis factor by human monocytes, requiring high affinity Fc-FcıR interactions. J. Immunol. 1990; 144: 1304

Defrance T., Vanbervliet B., Pene J., Banchereau J. Human recombinant IL-4 induces activated B lymphocytes to produce IgG and IgM. J Immunol 1988; 141: 2000-5.

Defrance T., Vanbervliet B., Pene J., Banchereau J. Human recombinant IL-4 induces activated B lymphocytes to produce IgG and IgM. J. Immunol. 1988; 141: 2000-5.

Deng J.-F., Geng L., Qian Y.-G., Li H., Wang Y., Xie H.-Y., Feng X.-W. and Zheng S. The Role of Toll-Like Receptors 2 and 4 in Acute Allograft Rejection After Liver Transplantation. Transplant. Proceed. 2007; 39: 3222–3224

Dentener M.A., Bazil V., Von Asmuth EJU, Ceska M., Buurman W.A. Involvemcnt of CDI4 in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor, IL-6, and IL-8 release by human monocytes and alveolar macrophages. J Immunol 1993; 1511: 2885-2891.

Denton M.D., Magee C.C., Sayegh M.H. Immunsuppressive Strategies in transplantation. Lancet 1999; 353: 1083-1091

Deppisch R., Schmitt V., Bommer J, Hansch G.M., Ritz E., Rauterberg E.W. Fluid phase generation of terminal complement complex as a novel index of bioincompatibility. Kidney Int 1990; 37: 696-796

Dessing MC, Bemelman FJ, Claessen N et al. Intragraft Toll-like receptor profiling in acute renal allograft rejection. Nephrol Dial Transplant 2010; 25: 4087-4097

Devitt A., Moffatt O.D., Raykundalia C., Capra J.D., Simmons D.L., Gregory C.D. Human CD14 mediates recognition and phagozytosis of apoptotic cells. Nature 1995; 192 : 505-509

DeWaal M.R., Figdor C. and de Vries J.E. Effects of interleukin-4 on monocyte functions: comparison to interleukin-13. Res. Immunol. 1993; 144: 629-633.

DeWaal M.R.,Figdor C.G.,Huijbens R.,Mohan-Peterson S.,Bennett,B.,Culpepper J.,Dang,W., Zurawski G., and de Vries J.E. Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10. J. Immunol. 1993; 151: 6370-6381.

Di Donato J.A., Hayakawa M., Rothwarf D.M., Zandi E., Karin M. A cytokine responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. Nature 1997; 388: 548-554

Diederichs K., Boone,T. and Karplus P.A. Novel fold and putative receptor binding site of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Science 1991; 254:1779-1782.

Döbeli H., Gentz R., Jucker W., Garotta G., Hartmann D. W. and Hochuli E. Role of the C-terminal sequence on the biological activity of human immune interferon (IFN).
J. Biotechnol. 1988; 7: 199–216

Ducloux D, Deschamps M, Yannaraki M, Ferrand C et al. Relevance if Toll-like receptor-4 polymorphisms in renal transplantation. Kidney Int. 2005; 67: 2454-2461

Dusso A., Brown A.J., Slatposky E. Vitamin D. Am J Renal Physiol 2005; 289: F8-F28

Ealick S.E., Cook W.J., Vijay-Kumar S., Carson M., Nagabhushan T.L., Trotta P.P. and Bugg C.E. Three-dimensional structure of recombinant human interferon-γ. Science 1991; 252: 698–702

Ebner S., Ratzinger G., Krosbacher B., Schmuth M., Weiss A., Reider D., Kroczek R.A., Herold M., Heufler C., Fritsch P., Romani N. Production of IL-12 by human monocytederived dendritic cells is optimal when the stimulus is given at the onset of maturation, and is further enhanced by IL-4. J Immunol 2001; 166:633-41.

Epplen,C., Jackel,S., Santos,E.J., D'Souza,M., Poehlau,D., Dotzauer,B., Sindern,E., Haupts,M., Rude,K.P., Weber,F., Stover,J., Poser,S., Gehler,W., Malin,J.P., Przuntek,H., and Epplen,J.T. Genetic predisposition to multiple sclerosis as revealed by immunoprinting. Ann. Neurol. 1997; 41: 341-352.

Eugui E., Almquist S., Müller C., Lymphocyte-selective cytostatic and immunsuppressive effects of

mycophenolic acid in vitro: role of desoxyguanose nucleoitide depletion. Scan J Immun 1991; 33: 161-173

Faraco J.H., Morrison N.A., Baker A., Shine J., Frossard P.M. ApaI dimorphism at the human vitamin D receptor gene locus. Nucleic Acids Res. 1989; 17: 2150.

Farmakiotis A. Scherberich J.E.. Toll-like receptor 2 (TLR2) expression of monocytes in kidney allograft dysfunction. Nieren & Hochdruckkrankh. 2008; 37: 522-523

Feehally J., Harris K.P., Bennett S.E., Walls J. Is chronic renal transplant rejection a non-immunological phenomenon? Lancet 1986; 2: 486

Fellstrom B, Holdaas H, Jardine AG, et al: Risk factors for reaching renal endpoints in the Assessment of Lescol in Renal Transplantation Trial. Transplantation 2005; 79: 205-212

Fernandez E., Fibla J., Betriu A., Piulats J.M., Almirall J., Montliu J. Association between vitamin D receptor gene polymorphism and relative hyperparathyreoidism in patients with chronic allograft failure. J Am Soc Nephrol 1997; 81: 1546-1552

Fiorentini P, Musso M, Penco S, Giuffrida R, Pistoia V, Garre C, et al. Characterization of a distal 5′-flanking region (–2010/–630) of human GM-CSF. Biochem Biophys Res Commun 1995; 214: 1015-22

Fiorentino D.F, Mosmann T.R., Howard M., O'garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J Immunol. 1991; 147(11): 3815-22.

Fiorentino D.F., Z. A., Mosmann Tr, Howard M, O'garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J Immunol 1991; 147(11): 3815-22

Fitzgerald K.A., Palsson-McDermot E.M., Bowie A.G., Jefferies C.A., Mansell A.S., Brady G., Brint B., Dunne A., Gray P., Harte M.T. et al. Mal (MyD88-adapter-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. Nature 2001; 413: 78-83.

Frankenberger M., Sternsdorf T., Pechumer H., Pforte A., Ziegler-Heitbrock HWL. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. Blood. 1996; 87(1):373-7.

Frey E.A., Miller D.S., Jahr T.G., Sundan A., Bazil V., Espcvik T., Finlay B.B., Wright S.D. Soluble CDI4 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. J Exp Med 1992; 176: 1665-1671.

Fukao T., Frucht D.M., Yap G., Gadina M., O'Shea J.J., Koyasu S. Inducible expression of Stat4 in dendritic cells and macrophages and its critical role in innate and adaptive immune responses. J. Immunol. 2001; 166: 4446–4455

Fukao T., Matsuda S., Koyasu S. Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells. J. Immunol. 2000; 164: 64–71.

Gabriel H., Urhausen A., Brechtel L., Müller H-J. and Kindermann W. Alterations of regular and mature monocytes are distinct, and dependent of intensity and duration of exercise. Eur. J. Appl. Physiol. 1994; 69: 179-181

Gao S.Z., Schroeder J.S., Alderman E.L. et al. Clinical and laboratory correlates of accelerated coronary artery disease in the cardiac transplant patient. Circulation 1987; 76: 56

Gärtner H.V., Eigentler Th., Pathomorpholgie der Transplantatabstoßungsreaktion. Nieren-und Hochdruckkrankheiten 2003; 32(1): 28-36

Gessani S., Testa U., Varano B., DiMarzio P., Borghi P., Conti L., Barberi T., Tritarelli E., Martucci R., Seripa D., Peschle C., Belardelli F. Enhanced production of LPS-induced cytokines during differentiation of human monocytces to macrophages-Role of LPS receptors. J Immunol 1993; 151: 3758-3766.

Gjertson D.W. Look-up survival tables for renal transplantation. Clin Transplant 2003; 337-86.

Gjertson D.W. Survival trends in long-term first cadaver-donor kidney transplants, in Clinical Transplants 1990, edited by Terasaki PI, Cecka JM, Los Angeles, UCLA Tissue Typing Laboratory, 1991; 225-235

Goldblum S.E., Brann T.W., Ding X., Pugin J., Tobias P.S. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein and soluble CD14 function as accessory molecules for LPS-induced changes in endothelial barrier function in vitro. J Clin Invest 1994; 93: 692-702

Goldstein R.D. Toll-like receptors and acute allograft rejection. Transpl. Immun. 2006; 17: 11-15

Goyert S.M., Ferrero E. Biochemical analysis of myeloid antigens and cDNA expression of gp55 (CD14). In: McMichael AJ. ed.Leucocyte Typing III, White Cell Differentiation Antigens. Oxford Univ. Press: Oxford, 1986; 613-619.

Goyert S.M., Ferrero E., Rettig W.J., Yenamandra A.K., Obata F.,LeBeau M.M. The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors. Science 1988; 239: 497-500.

Griffin J.D., Schlossman S.F. Expression of myeloid differentiation antigens in acute myeloblastic leukemia. In: Bernard L,Boumsell J, Daussct C, Milstein C, Schlossman SF, eds. Leucocyte Typing, Human Leucocyte Differentiation Antigens Detected by Monoclonal Antibodies. New York: Springer-Verlag, 1984; 404-410.

Grotz W.H., Mundiger F.A., Gugel B., Exner V., Kirste C., Schollmeyer P.J. Bone fracture and osteodensitometry with dual energy X-ray absorptiometry in kidney transplant recipients. Transplantation 1994; 58: 912-915

Groux H.B.M., De Vries J.E., Roncarolo M.G.. Interleukin-10 induces a long-term antigenspecific anergic state in human CD4+ T cells. J Exp Med 1996; 184(1): 19-29

Grzesiek S., Döbeli H., Gentz R., Garotta G., Labhardt A. M. and Bax A. 1H, 13C, and 15N NMR backbone assignments and secondary structure of human interferon-γ . Biochemistry 1992; 31: 8180–8190

Gulanikar A.C., MacDonald A.S., Sungurtekin U., Belitsky P. The incidence and impact of early rejection episodes on graft outcome in recipients of first cadaver kidney transplants.

Gupta, D., Kirkland, T. N., Viriyakosol, S., and Dziarski, R. J. Biol. Chem. 1996; 271: 23310–23316

Guyre P.M., Campbell A.S., Kniffin W. and Fanger M.W. Monocytes and polymorphonuclear neutrophils of patients with streptococcal pharygitis express increased numbers of type I IgG Fc receptors. J. Clin. Invest. 1990; 86: 1892

Halimi JM, Laouad I, Buchler M, et al: Early lowgrade proteinuria: Causes, short-term evolution and longterm consequences in renal transplantation.Am J Transplant 2005; 5:2281-2288,

Hamilton J.A., Piccoli D.S., Cebon J. et al. Cytokine regulation of colony-stimulating factor (CSF) production in cultured human synovial fibroblasts. II. Similarities and differences in the control of interleukin-1 induction of granulocyte-macrophage CSF and granulocyte-CSF production. Blood 1992; 79: 1413-9.

Hammond-Kosack K.E., Jones J.D. Resistance gene-dependet plant defense responses. Plant Cell 1996; 8: 1773-1791

Han J., Mathison J.C., Ulevitch R.J., Tobias P.S. Lipopolysaccharide (LPS) binding protein, truncated at Ile-197, binds LPS but does not transfer LPS to CD14. J Biol Chem 1994; 269: 8172-8175.

Hansen P.B., Kjaersgaard E., Johnsen H.E., Grain J., Pedersen M., Nikolajsen K., Hansen N.E. Different membrane expression of CD1 lb and CDI4 on blood neutrophils following in vivo administration of growth factors. Br J Haemat 1993; 85: 50-56.

Hariharan S., Johnson C.P., Bresnahan B.A., Taranto S. E., McIntosh M. J., Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. N. Engl. J. Med. 2000; 342: 605–612.

Hariharan S., McBride M.A., Bennett L.E., Cohen E.P. Risk factors for renal allograft survival from older cadaver donors. Transplantation 1997; 64: 1748

Hart P.H, Bonder C.S., Balogh J., Dickensheets H.L., Donnely R.P., Finlay-Jones J.J. Differential responses of human monocytes and macrophages to IL-4 and IL-13. J Leukoc Biol. 1999; 66(4): 575-8

Hattor Y., Kasai K., Akimoto K. and Thiemermann C. Biochem.Biophys. Res. Commun. 1997; 233: 375–379

Hayashi F., Smith K. D., Ozinsky A., Hawn T. R., Yi E. C., Goodlett D. R., Eng J. K., Akira S., Underhill D. M., Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. Nature 2001; 410: 1099–1103.

Hayry P., Mennander A., Yilmaz S., et al. Towards understanding the pathophysiology of chronic rejection. Clin.Investig. 1992; 70(9): 780-790. Transplantation 1992; 53: 323

Hayry P., Mennander A., Yilmaz S., Ustinov J., Räisanen A., Miettinen A., Lautenschlager I., Lemström K., Bruggeman C.A., Paavonen T. Towards understanding the pathophysiology of chronic rejection. Clin.Investig. 1992; 70(9): 780-790.

Haziot A., Chen S., Ferrero E., Low M.G., Silber R., Goyert S.M. The monocyte differentiation antigen, CD14 is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. J. Immunol. 1988; 141: 547-552

Heimbeck J, Hofer TPJ, Eder C, et al. Standardised single platform assay for human monocyte subpopulations. Cytometry 2010; 77A, 823

Heinmeyer T., Wingender E., Reuter I., Hermjakob H., Kel A.E., Kel O.V., Ignatieva E.V., Anako E.A., Podkolodnaya O.A., Kolpakov F.A., Podkolodny N.L., Kolchanov N.A. Databaseson transcriptional regulation: TRANSFAC,TRRD and COMPEL. Nucleic Acids Res. 1998; 26: 264

Hemmi H., Kaisho T., Takeuchi O., Saio S., Sanjo S., Hoshino K., Horiuchi T., Tomizawa H., Takeda, K., Akira, S. Small antiviral compounds activate immune cells via TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. Nat. Immunol. 2002; 3: 196–200.

Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K.,Wagner H., Takeda K., Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature 2000; 408: 740–745.

Hewison M, Freeman L, Hughes SV, Evans KN, Bland R, Eliopoulos AG, Kilby MD, Moss PA, Chakraverty R. Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte

Hibbs M.L., Selvaraj P., Carpen 0., Springer T.A., Kuster H., Jouvin M.-H.E. and Kinet, J.-P. Mechanisms for regulating expression of membrane isoforms of Fc-yRIII (CD16). Science 1989; 246: 1608

Hirst M., and Feldman D. Glucocorticoid regulation of 1,25(OH)2vitamin D3 receptors: divergent effects on mouse and rat intestine. Endocrinology 1982; 111: 1400–1402

Hochrein H., Shortman K., Vremec D., Scott B., Hertzog P., O'Keeffe M. Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets. J. Immunol. 2001; 166: 5448–5455.

Horng T., Barton G. M., Flavell R. A., Medzhitov R. The adaptor molecule TIRAP provides signaling specificity for Toll-like receptors. Nature 2002; 420: 329–333.

Horng T., Barton G.M., Medzhitov R. TIRAP, an adapter molecule in the Toll signaling pathway. Nat Immunol 2001; 2: 835-841

Huang S., Hendriks W., Althage A., Hemmi S., Bluethmann H., Kamijo R., Vilcek J., Zinkernagel R. M., Aguet,M. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. Science 1993; 259: 1742–1745.

Hüser N., Matevossian E., Schmidbauer P., Assfalg V., Scherberich J.E., Stangl M. et al. Calculated withdrawl of low-dose immunosuppression based on a detailed immunological monitoring after kidney transplantation between mocygotic twins. Transpl Immunol 2009; 22: 38 – 43

Huizinga T.W.J., De Haas M., Kleijer M., Nuijens J.H., Roos D. and Von dem Borne A.E.G.Kr. Soluble Fc-y receptor III in human plasma originates from release by neutrophils. J.Clin. Invest. 1990; 86: 416

Huizinga T.W.J., Schwiebert E.M., Wardwell K., and Guyre P.M. In vivo prednisone decreases FcRIII

Hultmark D. Makrophage differentiation marker MyD88 is a member of the Toll/IL-1 receptor family. Biochem. Biophys Res Commun 1994; 199: 144-146

Hustmyer F.G., Peacock M., Hui S., Johnston C., Christian J. Bone mineral density in relation to polymorphism at the vitamin D receptor gene locus. J. Clin. Invest. 1994; 94: 2130-2134

Hutchinson I.V., Turner D., Sankaran D., Awad M., Pravica V, Sinnott P. Cytokine genotypes in allograft rejection: guidelines for immunosuppression. Transplant. Proc. 1998; 30: 3991-3992

Ishida T., Mizushima S. Azuma S., Kobayashi N., Tojo T., Suzuki K., Aizawa S., Watanabe T., Mosialos G., Kief E. et. al. Identification of Traf6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signalling from an amino-terminal domain of the CD 40 cytoplasmic region. J Biol Chem 1996; 271: 28745-28748

Jabara H.H., Fu S.M., Geha R.S., Vercelli D. CD40 and IgE: synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin-4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B cells. J. Exp. Med. 1990; 172: 1861-4.

Jones B.W., Means T.K., Heldwein K.A., Keen M.A., Hill P.J., Belisle J.T., Fenton M.J. Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. J Leukoc Biol 2001; 69: 1036-1044.

Joss A. M., Faith A., Blaser K, Akdis Ca. IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. Eur J Immunol 2000; 30(n.6): 1683-90..

Julian B.A., Laskow D.A., Dubovsky J., Dubovsky E.V., Curtis J.J., Quarles L.D. Rapid loss of vertebral mineral density after renal transplantation. N Engl J Med 1991; 325: 544 -550

Kaisho T., Takeuchi O., Kawai T., Hoshino K., Akira S. Endotoxin induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. J Immunol 2001; 166: 5688-5694.

Kaminski ER, Kaminski A, Bending M et al. In vitro cytokine profiles and their relevance to rejection following renal transplantation. Transplantation 1995; 60: 703-706.

Karow T., Lang R. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. F. Hansen, 2000

Kasiske B.L. Clinical correlates to chronic renal allograft rejection. Kidney Int. Suppl. 1997; 63: 71

Kato S, Chmielski M., Honda H., Pecoits-Filho et al. Aspects of immune dysfunction in end-stage disease. Clin J. Am.Soc.Nephrol. 2008; 3: 1526-1533

Kawai T., Adachi O., Ogawa T., Takeda K., Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. Immunity 1999; 11: 115-122.

Kawashima T., Noguchi E., Arinami T., Yamakawa K., Kobayashi H., Nakagawa F., Otsuka, Hamaguchi H. Linkage and association of an interleukin-4 gene polymorphism with atopic dermatitis in Japanese families.J. Med. Genet. 1998; 35: 502–504

Kielian T.L., Blecha F. CD14 and other recognition molecules for lipopolysaccharide: a review.

Immunopharmacology 1995; 29: 187-205

Kim J.M., Copeland N.G., Jenkins N.A., Khan T.A., Moore K.W. Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. J. Immunol. 1992; 148 (11): 3618-23

Kino T., Hatanaka H., Hashimoto M. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation, and physicochemical and biological characteristics. J. Antibiot. (Tokyo) 1987; 40(9): 1249–1255

Kirschning C.J., Wesche H., Ayres M., Rothe M., Human Toll like Receptor 2 confers to responsiveness to bacterial lipopolysaccharide J Exp Med 1998; 188(11): 2091-2097

Kirschning C.J., Wesche H., Ayres M.T., Rothe M. Human Toll-like Receptor 2 confers Responsiveness to Bacterial Lipopolysaccharide J. Exp. Med. 1998; 188(11): 2091-2097

Klaus G.G.B., Bijsterbosch M.K., O'Garra A., Harnett M.M. and Rigley, K.P. Receptor signalling and crosstalk in B lymphocytes. Immunol. Rev. 1987; 99: 19

Knol G.A. Proteinuria in Kidney Transplat Recipients: Prevalance, Prognosis, and Evidence-Based Management. Am J of Kidney Diseases 2009; 6 (54): 1131-1144

Kobayashi M., Fitz L., Ryan M., Hewick R.M., Clark S.C., Chan S., Loudon R., Sherman F., Perussia B. and Trinchieri G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes.J. Exp. Med. 1989; 170: 827-845

Kopp E.B., Medzhitov R. The Toll-receptor family control of the innate immunity. Current Opin Immunol 1999; 11: 13-19

Koskinen P.K. The association of the induction of vascular cell adhesion molecule-1 with cytomegalovirus antigenemia in human heart allografts. Transplantation 1993; 56: 1103

Kubin M., Chow J.M. and Trinchieri G. Differential regulation of interleukin-12 (IL-12), tumor necrosis factor-a, IL-4 and IL-13 Prime PBMC for IL-12 and TNF-α production
and IL-13 production in human myeloid leukemia cell lines and peripheral blood mononuclear cells. Blood. 1993; 83: 1847-1855.

Kurosaki T. and Ravetch J.V. A single amino acid in the glycosyl phosphatidylinositol attachment domain determines the membrane topology of Fc-yRIII. Nature 1989; 342: 805

Kurt-Jones E.A., Popova L., Kwinn L., Haynes L.M., Jones L.P., Tripp R.A., Walsh E.E., Freeman M.W., Golenbock D.T., Anderson L.J. et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. Nat Immunol 2000; 1: 398-401.

Labuda M., Fujiwara T.M., Ross M.V., Morgan K., Garcia-Heras J., Ledbetter D.H., Hughes M.R., Glorieux F.H. Two hereditary defects related to vitamin D metabolism map to the same region of human chromosome 12q13– 14. J. Bone Miner. 1992; 7: 1447– 1453

Land W., Messmer K. The impact of ischemia/reperfusion injury on specific and non-specific early and late chronic events after organ transplantation. Transplantation Reviews 1998; 10: 108

Landmann R., Fisscher A.E., Obrecht J.P. Interferon- 7 and interleukin-4 down-regulate soluble CDI4 release in human monocytcs and macrophages. J Leukoc Biol 1992; 52: 323-330

Landmann R., Wesp M., Obrecht J.P. Cytokine regulation of the myeloid glycoprotein CD14. Pathobiology 1990; 59: 131-135

Landolfo S., Cofano F., Giovarelli M., Prat M., Cavallo G., Forni G. Inhibition of interferongamma may suppress allograft reactivity by T lymphocytes in vitro and in vivo. Science 1985; 229: 176-9.

Lanier L.L., Cwirla S., Yu G., Testi R. and Phillips J.H. Membrane anchoring of a human IgG Fc receptor (CD16) determined by a single amino acid. Science 1989; 246: 1611

Lanier L.L., Yu G. , and Phillips, J.H. Co-association of CD3ı with a receptor (CD16) for IgG Fc on

human natural killer cells. 1989; Nature 342: 803

Laude-Sharp M., Caroff M., Simard L., Pusineri C., Kazatchkine M.D., Haeffner-Cavaillon N. Induction of Il-1 during hemodialysis; transmembrane passage of intact endotoxins. Kidney Int. 1990; 38:1089-1094

Lauener R.P., Goyert S.M., Geha R.S., Vercelli D. Interleukin 4 down-regulates the expression of CD14 in normal human monocytes. Eur J Immunol 1990a; 20: 2375-2381.

Lavin PJ, Laing ME, O'Kelly P, Moloney FJ, Gopinathan D, Aradi AA, Shields DC, Murphy GM, Conlon PJ. Improved renal allograft survival with vitamin D receptor polymorphism. Ren Fail. 2007; 29(7):785-9.

Le Beau M.M., Westbrook C.A., Diaz M.O., Larson R.A., Rowley J.D., Gasson J.C., Golde D.W. and Sherr C. J. Evidence for the involvement of GM-CSF and FMS in the deletion (5q) in myeloid disorders. Science 1986; 231: 984-987

Lee H., Clark B., Stoves J., Newstead C.G. Influence of recipient and donor IL-1a, IL-4, and TNFa genotyps on the incidence of acute renal allograft rejection. J Clin Pathol 2004; 57: 101-103

Lee J.D. Kato K., Tobias P.S., Kirkland T.N., Ulevitch R.J. Transfection of CD14 into 70Z/3 cells dramatically enhances the sensitivity to complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. J Exp Med 1992; 175: 1697-1705.

Lee J.D., Kravchenko V., Kirkland T.N., Han J., Mackman N., Moriarty A., Leturcq D., Tobias P.S., Ulevitch R.J. Glycosylphosphatidylinositol-anchored or integral membrane forms of CD14 mediate identical cellular responses to endotoxin. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 9930-9934.

Lee SB, Kalluri R. Mechanistic connection between inflammation and fibrosis; in: Chronic renal allograft dysfunction (CAD) : new frontiers. Kidney Int. 2010; Suppl. 11; S 22-S 26

Leemans J.C., Stokman G., Claessen N., Rouschop K.M.,Teske G.W.D., Kirschning C.J., Akira S., van der Poll T., Weening J. and Florquin S. Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. The Journal of Clinical Investigation 2005; 115 (10): 2894-2903

Lenhoff S., Olofsson T. Effects of immunosuppressive drugs and antibiotics on GM-CSF and G-CSF secretion in vitro by monocytes, T lymphocytes and endothelial cells. Br. J. Haematol.1996; 95: 33-8.

Letterio J.J. TGF-beta: a critical modulator of immune cell function. Clin Immunol Immunopathol 1997; 84(3): 244-50

Leukocyte typing VII, Oxford University Press 2002

Levashina E.A., Langley E., Green C., Gubb D., Ashburner M.,□Hoffmann J.A., Reichhart J.M. Constitutive activation of Toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient Drosophila. Science 1999; 285: 1917-1919.

Lieschke G.J. and Burgess A. W. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony- stimulating factor (1). N Engl J Med 1992b. 327: 28-35.

Lieschke G.J. and Burgess A.W. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony- stimulating factor (2). N Engl J Med 1992; 327: 99-106.

Ling L., Cao Z., Goeddel D.V. NF-kappaB inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser- 176 Proc Nat Acad Sci 1998; 95: 3792-3797

Littman B.H., Dastvan F.F., Carlson P.L., Sanders K.M. Regulation of monocyte/macrophage C2 production and HLA-DR expression by II.-4 (BSF-1) and IFN g J. Immunol. 1989; 142: 520-525.

Li-Weber M., Laur O., Davydov I.V., Hu C., Salgame P. and Krammer P.H. What controls tissue-specific expression of the IL-4 gene? Immunobiology 1997; 198: 170–178.

Loebe M., Schuler S., Zais O., Warnecke H., Fleck E., Hetzer R. Role of cytomegalovirus infection in the development of coronary artery disease in the transplanted heart. J.Heart Transplant 1990; 9: 707

Lomaga M.A., Yeh W.C., Sarosi I., Duncan G.S., Furlonger C., Ho A., Morony S., Cappareli C., Van G., Kaufman S. interleukin-1, CD40, and LPS signaling TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective Genes & Dev. 1999; 13: 1015-1024

London N.J., Farmery S.M.,Will E.J., Davison A.M., Lodge J.P. Risk of neoplasia in renal transplant patients. Lancet 1995; 346: 403-406

Lonnemann G., Behme T.C., Lenzner B. et. al, Permeability of dialyzer membranes to TNFa inducing substances derived from water bacteria. Kidney Int. 1992; 42: 61-68

Lord K.A., Hoffman.Liebermann B., Liebermann B. Nucleotide sequenz and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myleoid differentiation primary response gene induced by IL-6. Oncogene 1990; 5: 1095-1097

Lortat-Jacob H., Kleinman H.K. and Grimaud J.A. High affinity binding of interferon-γ to a basement membrane complex (Matrigel). J. Clin. Invest.1991; 87: 878–883

Loucaidou M., Stichbury J.L., Borrows S.E., , Marshall A.G., McLean T., Cairns T., Griffith M., Hakim N., Palmer A. Cytokine Polymorphisms Do Not Influence Acute Rejection in Renal Transplantation Under Tacrolimus-Based Immunosuppression. Transplantation Proceedings 2005; 37: 1760–1761

Low M.G. Biochemistry of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane protein anchors. Biochem. J. 1987; 244: 1-13

Lowry S.F. Cytokine mediators of immunity and inflammation. Arch Surg, 1993; 128(11): 1235-41

Lu B., Ebensperger C., Dembic Z., Wang Y., Kvatyuk M., Lu T., Coffman R. L., Pestka S., Rothman, P. B. (1998) Targeted disruption of the interferon-gamma receptor 2 gene results in severe immune defects in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. 1998; 95: 8233–8238.

Lue K.-H., Lauener R.P., Winchester R.J., Geha R.S., Vercelli D. Engagement of CDI4 on human monocytes terminates T cell proliferation by delivering a negative signal to T cells. J Immunol 1991; 147: 1134-1138.

Lundin A.C., Söderkvist P., Eriksson B., Bergman-Jungeström M., Wingren S.Association of breast cancer progression with a vitamin D receptor gene polymorphism. South-East Sweden Breast Cancer Group. Cancer Res. 1999 15; 59(10): 2332-4

Lung J. M., Alexopoulou L., Sato A., Karow M., Adams M. C., Gale N. W., Iwasaki A., Flavell, R. A. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. Proc. Natl. Acad. Sci. 2004; 101: 5598–5603

Macdonald K.P.A., Quinn C., Thomas G.J., Thomas R. Resistance of rheumatoid synovial dendritic cells to the immunosuppressive effects of IL-10. J Immunol 1999; 163(10): 5599-607

Magge C.C., Pascual M. Update in renal transplantation. Arch. Int. Med.2004; 164(13): 1373-1378

Malinin N.L., Boldin M.P. Kovalenko A.V., Wallach D.: MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD 95 and IL-1. Nature 1997; 385: 540-544

Maliszewski C.R., Ball E.D., Graziano R.F., Fanger M.W. Isolation and characterization of My23, a myeloid cell-derived antigen reactive with the monoclonal antibody AML-2-23. J Immunol 1985; 135: 1929-1936.

Mangelsdorf D.J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schutz G., Umesono K., Blumberg B. P., Kastner M., Mark P, Chambon P. The nuclear receptor superfamily: the second decade. Cell 1995; 83(6): 835-9.

Mannon RB. Immune monitoring and biomarkers to predict chronic allograft dysfunction. Kidney Int. 2010; Suppl. 119: S 59-65

Martin T.R., Mongovin S.M., Tobias P.S., Mathison J.C., Moriarty A.M., Leturcq D.J., Ulevitch R.J. The CD14 differentiation antigen mediates the development of endotoxin responsiveness during differentiation of mononuclear phagocytes. J Leukoc
Biol 1994; 56: 1-9.

Mathison J.C., Tobias P.S., Wolfson R., Ulevitch R.J. Plasma lipopolysaccharide (LPS)-binding protein- A key component in macrophage recognition of Gram-negative LPS. J Immunol 1992; 149: 200-206.

Mazzarella G., Petillo O., Margarucci S., Calabrese C., Peluso G. Role of monocyte / macrophage population in immune response. Monaldi Arch. Chest. Dis.1998; 53(1): 92-96

Means T.K., Jones B.W., Schromm A.B., Shurtleff B.A., Smith J.A., Keane J., Golenbock D.T., Vogel S.N., Fenton M.J. Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on Mycobacterium tuberculosis induced macrophage responses. J Immunol 2001; 166: 4074-4082.

Medzhitov R., Hurlburt P.P., Janeway C.A. Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature 1997; 388(24): 394-397

Medzhitov R., Janeway C.A. Jr.: Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. Cell 1997; 91: 295-298

Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Koop E., Stadlen A., Chen C., Ghosh S., Janeway C.A. Jr. MyD88 is an adaptor protein in signaling pathways. Moll Cell 1998; 2: 253-258

Meier-Kriesche H.U., Schold J.D., Srinivas T.R., Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over
the most recent era. Am. J. Transplant. 2004; 4(3): 378-83.

Mercurio F., Zhu H., Murray B.W., Shevchenko A., Bennet B.L. Li J., Young D.B., Barbarosa M., Mann M., Manning et. al. IKK-1 and IKK-2: cytokine activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation . Scince 1997; 278: 860-866

Merion R.M., White D.J., Thiru S., Evans D.B., Calne R.Y. Cyclosporine: five years' experience in cadaveric renal transplantation. N. Engl. J. Med. 1984; 310(3):148-154.

Metcalf D, Merchav S: Effects of GM-CSF deprivation on precursors of granulocytes and macrophages. I Cell Physiol 1982; 112: 41

Metcalf D. The Hemopoietic Colony Stimulating Factors. Amsterdam, Elsevier, 1984

Metcalf D. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colonystimulating factors. Blood 1986; 67(2): 257-67

Metcalf D., Burgess A.W. Clonal analysis of progenitor cell commitment to granulocyte or macrophage production. I Cell Physiol 1982; 111: 275

Methe H., Zimmer E., Grimm C, Nabauer M and Koglin J. Evidence for a Role of Toll-Like Receptor 4 in Development of Chronic Allograft Rejection after Cardiac Transplantation.
Transplantation 2004; 78: 1324-1331

Meurs E., Chong K., Galabru J., Thomas N.S., Kerr I.M., Williams B.R., Hovanessian A.G. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. Cell 1990; 62: 379–390.

Middleton PG, Cullup H, Dickinson AM, Norden J, Jackson GH, Taylor PR, Cavet J. Vitamin D receptor gene polymorphism associates with graft-versus-host disease and survival in HLA-matched sibling allogeneic bone marrow transplantation Bone Marrow Transplant. 2002; 30(4): 223-8.

Miura Y., Shimazu R., Miyake K., Akashi S., Ogata H., Yamashita Y., Miura Y., Kimoto M. RP 105 is

associated with MD-1 and transmits an activation signal in human B cells. Blood 1998; 92: 2815-2822

Miyake K., Shimazu R., Akashi S. Ogata H., Yashimata Y, Narisawa Y., Kimoto M. Mouse MD-1, a molecule that is physically associated with RP 105 and positively regulates the expression. J Immunol 1998; 161: 1348-1353

Miyake K., Yamashita Y., Ogata M., Sudo T., Kimoto M. RP 105, a novel B cell surface molecule implicated in B cell activation, is a member of the leucine rich repeat protein family. J immunol 1995; 154: 3333-3340

Molina I.J. and Huber B.T. Regulation ofmacrophage activation markers by IL-4 and IFN-3' is subpopulation-specific. Cell. Immunol. 1991; 134: 241-248.

Moore K.W., Coffman R.l, O'garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu Rev Immunol 2001; 19: 683-765

Moore K.W., Fiorentino D.F., Trounstine M.l., Khan T.A., Mosmann T.R. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRFI. Science 1990; 248: 1230-4.

Moors M.A., Li L., Mizel S.B. Activation of interleukin-1 receptor associated kinase by Gram-negative flagellin. Infect Immun 2001; 69: 4424-4429.

Morrison D.C., Ryan J.L. Endotoxins and disease mechanisms. Ann Rev Med 1987; 38: 417-432.

Morrison N.A., Qi J.C., Tokita A., Kelly P.J., Crofts L., Nguyen T.V., Sambrook P.N., Eisman J.A. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. Nature 1994; 367, 284– 287.

Morrison N.A., Yeoman R., Kelly P.J., Eisman J.A. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992; 89: 6665–6669.

Mukaida N., Ishikawa Y., Matsushima K. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. J Leukoc Biol. 1994; 56(5) 554-8

Muller U., Steinhoff U., Reis L.F., Hemmi S., Pavlovic J., Zinkernagel R.M., Aguet M. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. Science 1994; 264: 1918–1921

Murphy L.C. and P. Watson. Steroid receptors in human breast tumorigenesis and breast cancer progression. Biomedecine & Pharmacotherapy 2002; 56(2): 65-77.

Muzio M., Natoli G., Saccani S., Levrero M., Mantovani A. The human Toll signalling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor associated factor 6 (TRAF 6). J Exp Med 1998; 187: 2097-2101

Muzio M., Polntarutti N., Bosisio D., Prahladan M.K., Mantovani A. Toll like receptor family (TLT) and signalling pathway. Eur. Cytokine Netw. 2000; 11: 489-490.

Nakano H., Shindo M., Sakon S., Nishinaka S. Mihara M., Yagita H., Okumura K.: Differential regulation of lkappaB Kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappa B inducing kinase and mitogen activated protein Kinase / ERK kinase kinase-1
Acad Sci 1998; 95: 3537-3542

Nathan C.F., Murray H.W., Wiebe M.E. and Rubin B.Y. Identification of interferon-3' as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. J. Exp. Med. 1983; 158: 670-689.

Niedermeier M, Reich B, Rodrigez Gomez M et al.: CD14+ T cells control the differentiation of Gr1 monocytes ubnto fibrocytes. Proc Nat Acad Sci 2009; 106 17892-17897

Nockher W. Scherberich J.E. Expression and release of the monocyte lipopolysaccharide receptor antigen CD 14 are suppressed by glucocorticoids in vivo and in vitro. J. Immunol. 1997; 158(3):

1345

Nockher W.A, Scherberich J.E. Expanded CD14+ CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. Infect. Immun. 1998; 66(6): 2782-90.

Nockher W.A, Wigand, R., Schoeppe, W., Scherberich J.E.: Elevated levels of soluble CD14 in serum of patients with systemic lupus erythematosus. Clin Exp Immunol. 1994; 96: 15

Nockher W.A., Bergmann L, Scherberich J.E.: Increased soluble CD14 serum levels and altered CD14 expression of peripheral blood monocytes in HIV Patients. Clin Exp Immunol 1994; 98: 369-374

Nockher W.A., Scherberich JE. Monocyte cell-surface CD14 expression and soluble CD14 antigen in hemodialysis: evidence for chronic exposure to LPS. Kidney Int. 1995; 48: 1469-76

Nockher W.A., Wiemer J., Scherberich J.E. Haemodialysis monocytopenia: differential sequestration kinetics of CD14+CD16+ and CD14++ blood monocyte subset. Clin. Exp. Immunol. 2001; 123(1): 49-55,

Noguchi E., Shibasaki M., Arinami T., Takeda K., Yokouchi Y., Kawashima T., Yanagi H., Matsui A., Hamaguchi H. Association of asthma and the interleukin-4 promoter gene in Japanese. Clin. Exp.Allergy 1998; 28: 449–453.

Nogueira E, Salomao R, Brunialti MK et al. Expression of TLR-4 and-2 in peripheral mononuclear cells in renal transplant patients with TLR-4 gene polymorphism. Int Immunopharmacol 2010; 10: 1481-85

Ohashi K., Burkart V., Flohe S., Kolb H. Heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the Toll-like receptor-4 complex. J Immunol 2000; 164: 558-561.

O'Herrin JK, Hullett DA, Heisey DM, Sollinger HW, Becker BN A retrospective evaluation of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) and its potential effects on renal allograft function. Am J Nephrol. 2002; 22(5-6): 515-20

Okamura Y., Watari M., Jerud E.S., Young D.W., Ishizaka S.T., Rose J., Chow J.C., Strauss JF The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. J Biol Chem 2001;
276: 10229-10233.

Olson N.C., Salzer W.L., McCall C.E. Biochemical, physiological, and clinical aspects of endotoxemia. Mol. Aspects Med. 1988; 1: 511

Opelz G. Critical evaluation of the association of acute with chronic graft rejection in kidney and heart transplant recipients. The Collaborative Transplant Study. Transplant Proc. 1997; 29 : 73

Oppenheim J.J. Cytokines: past, present, and future. Int J Hematol 2001; 74(1): 3-8

Pabst M.J., Johnston R.B. Jr. Increased production of superoxide anion by macrophages exposed in vitro to muramyldipeptide or lipopolysaccharide. J Exp Med 1980; 151: 101-114.

Palmer S.M., Burch L.H., Mir S., Smith S.R., Kuo P.C., Herczyk W.F.,Reinsmoen N.L., Schwartz D.A. Donor polymorphisms in Toll-like receptor-4 influence the development of rejection after renal transplantation. Clin Transplant 2006; 20: 30-36

Pantoja M. Molecular and biochemical studies of the maternal pathway required for embryonic dorsoventral polarity in Drosophila melanogaster [PhD Thesis]. Berkeley: University of California; 1997

Park JH, Kok HJ. Persistent proteinuria as a prognostic factor for determing long-term graft survival in renal transplant recipients. Transpl Proc 2000;32: 1924

Pascual M., Theruvath T., Kawai T., Tolkoff-Rubin N., Cosimi A.B. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. N. Eng.l J. Med. 2002 Feb. 21; 346(8): 580-90.

Passlick B., Flieger D., Ziegler-Heitbrock H.W.L. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. Blood 1989; 74: 2527-2534

Patel S.R. Ke H.Q., Vanholder R., Koenig R.J., Hsu C.H. Inhibition of Calcitriol Receptor Binding to Vitamin D Response Elements by Uremic Toxins. J Clin Invest 1995; 96: 50-59

Patel S.R., Koenig R.J. and Hsu C.H. Effect of Schiff base formation on the function of the calcitriol receptor. Kidney Int 1996; 50: 1539–1545

Paul L.C, Fellstrom B. Chronic vascular rejection of the heart and the kidney-have rational treatment options emerged? Transplantation 1992; 53(6): 1169-1179

Paul L.C. Chronic renal transplant loss. Kidney Int 1995; 47 (6): 1491-1499

Paul L.C. Immunologic risk factors for chronic renal allograft dysfunction. Transplantation 2001; 71(11 Suppl.): 17-23

Paul L.C., Fellstrom B. Chronic vascular rejection of the heart and the kidney-have rational treatment options emerged ? Transplantation 1992; 53(6): 1169-1179

Peltz G.A., Grundy H.O., Lebo R.V., Yssel H., Barsh G.S. and Moore K.W. Human Fc-yRIII: Cloning, expression,and identification of the chromosomal locus of two Fc receptors
for IgG. Proc. NatI. Acad. Sci. 1989; 86: 1013

Perera P.Y., Mayadas T.N., Takeuchi O., Akira S., Zaks-Zilberman M., Goyert S.M, Vogel S.N. CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol inducible gene expression. J Immunol 2001; 166: 574-581.

Pestka S, Zoon K.C., Samuel C.E. Interferons and their actions. Annu Rev Biochem 1987; 56: 727-77

Pestka S. et al. The interferon gamma (IFN-gamma) receptor: a paradigm for the multichain cytokine receptor. Cytokine Growth Factor Rev. 1997; 8(3): 189-206

Peters J.H., Ruppert J., Giesler R.K, Najar H.M., Xu H. Differentiation of human monocytes into CD14 negative accessory cells: do dendritic cells derive from the monocytic lineage? Pathobiology. 1991; 59: 122-126.

Piergiorgio M., Sindici C., Canella G., Miotti V., Risaliti A., Gropouzo M., Di Loreto P.L., Bresadola F., Mioni G. Persistent secondary hyperparathyroidism after renal transplantation Kidney Int 1998; 54: 1704-1713

Pirsch J.D., D´Alessandro A.M., Sollinger H.W. et. al The effect of donor age, recipient age, and HLA match on immunologic graft survival in cadaver renal transplant recipients.
Transplantation 1992; 53: 55-59

Poole K.L., Gibbs P.J., Evans P.R., Sadek S.A., Howell W.M. Influence of patient and donor cytokine genotypes on renal allograft rejection: evidence rom a single center study Transpl Immunol 2001; 8: 259-265

Praloran V. Structure, biosynthesis and biological roles of monocyte-macrophage colony stimulating factor (CSF-1 or M-CSF). Nouv Rev Fr Hematol 1991; 33(4): 323-33

Pravica V., Asderakis A., Perrey C., Hajeer A., Sinnott P.J., Hutchinson I.V. In vitro production of IFN-g correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-g gene. Eur J Immunogenet 1999; 26: 1-3

Pravica V., Perrey C., Steven A., Lee J.H., Hutchinson I.V. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. Hum. Immunol. 2000; 61: 863-866

Pulendran B., Palucka K., Banchereau J. Sensing pathogens and tuning immune responses. Science 2001; 293: 253-256.

Racusen L.C., Regele H. The pathology of chronic allograft dysfuntion. In: Chronic renal allograft dysfuntion. new frontiers. Kidney Int., Suppl. 119; 2010, S 27- S 32

Racz A. and Barsony J. Hormone-dependent translocation of vitamin D receptors is linked to transactivation. J Biol Chem 1999; 274: 19352–19360

Raetz CRH, Ulevitch R.J., Wright S.D., Sibley C.H., Ding A., Nathan C.F. Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. FASEB J 1991; 5: 2652-2660.

Randow F., Docke W.D., Bundschuh D.S., Hartung T.S., Wendel A. and Volk H.D. In vitro prevention and reversal of lipopolysaccharide desensitization by IFN-γ, IL-12, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. J. Immunol. 1997; 158: 2911

Rao K.V., Kasiske B.L., Odlund M.D., Ney A.L., Andersen R.C. Influence of cadaver donor age on posttransplant renal function and graft outcome. Transplantation 1990; 49: 91

Ravetch J.V. and Anderson C.L. Fc3'R family: proteins, transcripts, and genes. In Fc Receptors and the Action of Antibodies. H. Metzger, editor. American Society for Microbiology (ASM) 1989; 211-235.

Ravetch J.V. and Perussia B. Alternative membrane forms of Fc"γ"/RIII (CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. J. Exp. Med. 1989; 170: 481

Ravetch J.V., and Kinet J.P. Fc Receptors. Annu. Rev. Immunol.1991; 9: 457.

Read M.A., Cordle S.R., Vcach R.A., Carlisle C.D., Hawiger J. Cellfree pool of CDI4 mediates activation of transcription factor NF-kB by lipopolysaccharide in human endothelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 9887-9891.

Read S.P.F. CD4(+) regulatory T cells. Curr Opin Immunol 2001; 13(6): 644-9

Redaelli CA, Wagner M, Günter-Duwe D, Tian YH, Stahel PF, Mazzucchelli L, Schmid RA, Schilling MK.1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 shows strong and additive immunomodulatory effects with cyclosporine A in rat renal allotransplants. Kidney Int. 2002 Jan;61(1):288-96

Reinke P., Fietze E., Docke W.D., Kern F., Ewert R., Volk H.D. Late acute rejection in long-term renal allograft recipients. Diagnostic and predictive value of circulating activated T cells. Transplantation 1994; 58: 35

Reuss E., Fimmers R., Kruger A., Becker,C., Rittner,C., and Hohler,T. Differential regulation of interleukin-10 production by genetic and environmental factors-a twin study. Genes Immun.2002; 3: 407-413.

Rietschel E.T., T. Kirikae, F.U. Schade, U. Mamat, G. Schmidt, H. Loppnow, A.J. Ulmer, U. Zahringer, U. Seydel, F. Padowa, M. Schreier, und H. Brade. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. FASEB 1994; 8: 217-225

Roberts J.P., Wolfe R.A., Bragg-Grasham J.L., Rush S.H., Wynn J.J., Distant D.A., Ashby V.B., Held P.J., Port F.K. Effect of changing the priority for HLA matching on the rates and outcomes of kidney transplantation in minority groups. N Engl J Med. 2004; 350(6): 545-51.

Rodriguez D.S., Jankowska-Gan E., Haynes L.D., Leverson G., Munoz A., Heisey D., Sollinger H.W., Burlingham W.J. Immune regulation and graft survival in kidney transplant recipients are both enhanced by human leukocyte matching. Am J Transpl 2004; 4(4): 537-43

Romani N., Reider D., Heuer M., Ebner S., Kampgen E., Eibl B., Niederwieser D., Schuler G. Generation of mature dendritic cells from human blood: an improved method with special regard to clinical applicability. J Immunol Methods 1996; 196: 137-51.

Rosenberg A.S., Finbloom D.S., Maniero T.G., Van der Meide P.H., Singer A. Specific prolongation

of MHC class II disparate skin allografts by in vivo administration of anti-IFN-gamma monoclonal antibody. J. Immunol. 1990; 144: 4648-50.

Rosenwasser L.J., Klemm D.J., Dresback J.K., Inamura H., Mascali J.J., Klinnert M., Borish L. Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. Clin. Exp. Allergy 1995; 25 (Suppl. 2): 74–78.

Rothe F.G., Gabriel H., Kovacs E., Klucken J., Stöhr J., Kindermann W., Schmitz G. Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia. Arterioscler. Thromb. Vasc. Cell Biol. 1996; 16: 1437-1447

Rousset F., Defrance T., Peronne C., Vezzio N., Hsu. C.H., Kastelein R., Moore K.W., Banchereau J. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. Proc Natl Acad Sci 1992; 89(5): 1890-3

Rouzer C.A., Scott W.A., Hamill A.L. and Cohn Z.A. Dynamics of leukotriene C production by macrophages. J. Exp. Med. 1980; 152: 1236

Rouzer C.A., Scott W.A., Kempe J. and Cohn Z.A. Prostaglandin synthesis by macrophages requires a specific receptor-ligand interaction. Proc. Natl. Acad. Sci. 1980; 77: 4279

Ruggiero M.,Pacini S., Aterini S., Fallai C., Ruggiero C., Pacini P. Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with metastatic breast cancer. Oncol. Res. 1998; 10 (1): 43-6.

Sadir R., Forest E. and Lortat-Jacob H. The heparan sulfate binding sequence of interferon-γ increased the on rate of the interferon-γ –interferon-γ receptor complex formation. J. Biol. Chem. 1998; 273: 10919–10925

Safinia N., Afali B., Atalar K., Lombardi G., Lechler R.I. T-cell alloimmunity and chronic allograft dysfunction. Kidney Int., Suppl. 119; 2010, S 2-S 12

Saionji K., Ohsaka A. Expansion of CD14+CD16+ blood monocytes in patients with chronic renal failure undergoing dialysis : possible involvement of macrophage colony-stimulating factor. Acta Haematol. 2001; 105(1): 21-26

Sallusto F., Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. J Exp Med 1994; 179: 1109-18

Salmon J.E. and Cronstein B.N. Fc-y receptor-mediated functions in neutrophils are modulated by adenosine receptor occupancy. J. Immunol. 1990; 145: 2235

Sankaran D., Asderakis A., Ashraf S., Roberts I.S., Short I.S., Dyer P.A., Sinnot P.J., Hutchinson I.V. Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation. Kidney Int. 1999; 56 (1): 281-8

Sasu S., LaVerda D., Qureshi N., Golenbock D.T., Beasley D. Chlamydia pneumoniae and chlamydial heat shock protein 60 stimulate proliferation of human vascular smooth muscle cells via Toll-like receptor 4 and p44/p42 mitogen-activated protein kinase activation. Circ Res 2001; 89: 244-250.

Scallon B.J., Scigliano E., Freedman V.H., Miedel M.C., Pan Y.-C.E, Unkeless J.C., Koch J.P. A human immunoglobulin G receptor exists in both polypeptide anchored and phosphatidylinositol-glycan-anchored forms. Proc. Natl. Acad. Sci. 1989; 86: 5079.

Scherbeirich J.E. Urinary proteins of tubular origin: basic immunochemical and clinical aspects. Am. J. Nephrol. 1990; 10, Suppl 1: 43 - 51

Scherberich J.E, Lissner, R, Kachel H.G., Scheuermann E. Immunglobulin-Subklassen Defizienz und veränderte monozytäre LPS-Rezeptor(CD14)-Expression bei Nierentransplantatempfängern. Be-ziehung zu chronischen Harnwegsinfekten. Nieren-& Hochdruckkrankh. 1991; 25: 545-48

Scherberich J.E. Bedeutung von Toll-like-Rezeptoren bei Harnwegsinfekten. Nieren & Hochdruck-

krankh. 2008; 47: 9- 17

Scherberich J.E. Proinflammatory blood monocytes: main effector and target cells in systemic and renal disease; background and therapeutic implications. Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. 2003; 41(10): 459-464

Scherberich J.E. Toll-like Rezeptoren und ihre Bedeutung bei Harnwegsinfektionen. Nieren- & Hochdruckkrankh 2008; 37: 522-533

Scherberich J.E., Chenchanna-Merzhäuser M, Länger F. Influx of monocytes, soluble CD14 and growth related factors in chronic progressive renal disease (abstr). Frühjahrstag. Dtsch Ges. Immunologie, Band 52, Jena 1996

Scherberich J.E., Estner H., Segerer W. Impact of different immunosuppressive regimens on antigen presenting blood cells in kidney transplant patients. Kidney Blood Press Res. 2004; 27(3): 177-180

Scherberich J.E., Farmakiotis A. Antigen Pattern (CD14, CD16, HLA-DR, TLR2, TLR4) of peripheral blood monocyte subsets after short-and longterm kidney transplantation (abstr.) EMDS (Europ Macroph & Dendrit Cell Soc, Kongressband (Univ.Regensburg),p 94; 2009

Scherberich J.E., Farmakiotis A. Risk stratification and cellular immune responsiveness after short and long-term renal transplantation. Nieren & Hochdruckkrankh 2009; 38: 524

Scherberich J.E., Hartinger A. Impact of toll-like-receptor signalling on urinary tract infection. Int J Antimicrob Agents 2008; S 1, S9-S14

Scherberich J.E., Kellermeyer M., Ried C., Hartinger A. 1-alpha-calcidol modulates major human monocyte antigens and toll-like receptors TLR 2 and TLR 4 in vitro. Eur. J. Med. Res. 2005; 10(4): 179-182

Scherberich J.E., Mondorf A.W., Fassbinder, W., Koch K.M. Tubular histuria and serumproteinuria following human kidney allotransplantation. Proc. Europ. Dial. Transplant. Ass. 1977; 13: 159-167

Scherberich J.E., Nockher W.A. Blood monocyte phenotypes and soluble endotoxin receptor CD14 in systemic inflammatory diseases and patients with chronic renal failure. Nephrol Dial. Transplant. 2000; 15 (5): 574-8.

Scherberich J.E., Nockher W.A. Expanded CD14+ CD16+ Monocyte Subpopulation in Patients with Acute and Chronic Infections Undergoing Hemodialysis. Infect and Immun. 1998; 66: 2782–2790

Scherberich J.E., Wiemer J., Herzig C., Fischer P. Isolation and partial characterization of angiotensinase A and aminopeptidase M from urine and human kidney by lectin affinity chromatography and high performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 1990; 521(2): 279-289

Scherberich J.E., Wiemer J., Schoeppe W. Biochemical and immunological properties of urinary angiotensinase A and dipeptidylaminopeptidase IV. Their use as markers in patients with renal cell injury. Eur.J. Clin. Chem. Biochem. 1992; 30(10): 663-8

Scherberich J.E., Wolf G, Albers C, Mowack A, Stuckhardt U, Schoeppe W: Glomerular and tubular membrane antigens reflecting cellular adaptation in human renal failure. Kidney Int 36 (Suppl. 27) 33-51 (1989)

Scherberich J.E.,, Mondorf A.W.: Nephrotoxic potential of anti-infective drugs as assessed by tissue-specific proteinuria of renal antigens. Int J Clin Pharmacol Ther. 1998; 36: 152-158

Schindler H., Lutz M. B., Röllinghoff M., Bogdan C. The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. J. Immunol. 2001; 166: 3075–3082

Schneider D., Hudson K.L., Lin T.-Y., Anderson K.V. Dominant and recessive mutations define functional domains of Toll, a transmembrane protein required for dorsal–ventral polarity in the Drosophila embryo. Genes Dev 1991; 5: 797-807.

Schreiber, S. L., and G. R. Crabtree. The mechanisms of action of cyclosporin A and FK506. Immunol. Today 1992; 13: 136–142

Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A. Interferon-γ an overview of signals, mechanisms and functions. Journal of Leukocyte Biology 2004; 75: 163-189

Schromm A.B., Lien E., Henneke P., Chow J.C., Yoshimura A., Heine H., Latz E., Monks B.G., Schwartz D.A., Miyake K. et al. Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin induced signaling. J Exp Med 2001; 194: 79-88.

Schütt C., Schilling T., Grunwald U., Schonfeld W., Kruger C. Endotoxin-neutralizing capacity of soluble CD14. Res Immunol 1992; 143: 71-78.

Schumann R.R., Leong S.R., Flaggs G.W., Gray P.W., Wright S.D., Mathison J.C., Tobias P.S., Ulevitch R.J. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. Science 1990; 249: 1429-1431

Schwandner R., Dziarski R., Wesche H., Rothe M., Kirschning C. Peptidoglycan- and Lipoteichoic Acid-induced Cell Activation Is Mediated by Toll-like Receptor 2. J. Biol. Chem. 1999; 274(25): 17406-17409

Seghal S.N. Rapamune: Mechanism of action immunsupprssive effect results from blockade of signal transduction and inhibtion of cell cycle progression. Clin. Biochem. 1998; 31: 335-340

Sehner, M. Expression monozytärer Ziel-und Effektorantigene unter Einfluss verschiedener Pharmaka und Lipoproteine: in vitro Analysen zu den Funktionsmarkern CD14(Endotoxinrezeptor), CD16 (Fc-gammaIII R), HLA-DR und Toll-like Receptor 2 und 4 (TLR2/TLR4). Inauguraldissertation, LMU Publ. 12. Mai 2010

Sen G.C. Viruses and interferons. Annu. Rev. Microbiol. 2001; 55: 255–281

Sen J., Goltz J.S., Stevens L., Stein D. Spatially restricted expression of pipe in the Drosophila egg chamber defines embryonic dorsal–ventral polarity. Cell 1998; 95: 471-481.

Sester U., Sester M., Heine G., Laul H. Girndt M., Kohler H. Strong depletion of CD14(+)CD16(+) monocytes during hemodialysis treatment. Nephrol. Dial. Transplant. 2001; 16(7): 1402-1408
Setoguchi M., Nasu N., Yoshida S., Higuchi Y., Akizuki S., Yamamoto S. Mouse and human CD14 (myeloid cell-specific leucine-rich glycoprotein): primary structure deduced from cDNA clones. Biochim Biophys Acta 1989; 1008: 213-222.

Shimazu R., Akashi S., Ogata H., Nagai Y., Fukudome K., Miyake K., Kimoto M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. J Exp Med 1999; 189: 1777-1782.

Sica A., Tan T.H., Rice N., Kretzsschmar M., Ghosh P., Young H.A. The c-rel protooncogene product c-Rel but not NF-kB binds to the intronic region of the human interferon-g gene at a site related to and interferon-stimulable response element. Proc Natl Acad Sci 1992; 89: 1740

Siedlar M., Frankenberger M., Ziegler-Heitbrock W.L.H., Belge K.U. The m-DC8-positive leukocytes are a subpopulation of the CD14+Cd16+ monocytes. Immunobiology 2000; 202(1): 11-17

Simmons D. and B. Teed. The Fc3~ receptor of natural killer cells is a phospholipid-linked membrane protein. Nature 1988; 333:568.

Simmons D.L., Tan S., Tenen D.G., Nicholson-Weller A., Seed B. Monocyte antigen CD 14 is a phospholipid anchored membran protein. Blood 1989; 73: 284-289

Smith C.L., Onate S.A., Tsai M.J. and O'Malley B.W. CREB binding protein acts synergistically with steroid receptor coactivator-1 to enhance steroid receptor-dependent transcription. Proc Natl Acad Sci 1996; 93: 8884–8888

Smith K.A. Interleukin-2: inception, impact, and implications. Science 1988; 240: 1169-76

Smith P.D., Sufl'rendini A.F., Allen J.B., Wahl L.M., Parrillo J.E., Wahl S.M. Endotoxin administration to humans primes alveolar macrophages for increased production of inflammatory mediators. J Clin Immunol 1994; 14: 141-148.

Song H.Y., Regnier C.H., Kirschning C.J., Goeddel D.V., Rothe M. Tumor necrosis factor (TNF) mediated kinase cascades: bifurcation of nuclear factor kappaB and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2. Proc Nat. Acad Sci 1997; 94: 9792-9796

Spencer E., Jiang J., Chen Z.J. Signal-induced ubiquitination of IkB by the F-box protein Slimb/βTrCP. Genes Dev 1999; 13: 284-294.

Stanley I.R., Burgess A.W. GM-CSF stimulates the synthesis of membrane and nuclear proteins in murine neutrophils. J Cell Biochem 1983; 23: 241

Stefano G.B., Christensen V.B., Tonnesen E., Liu Y., Hughes T.K. Jr. and Bilfinger T. V. Interleukin-10 stimulation of endogenous nitric oxide release from human saphenous veins diminishes immunocyte adherence. J Cardiovasc. Pharmacol. 1997; 30(1): 90-5.

Stefanova I., Horejsi V., Ansotegui I.J., Knapp W., Stockinger H. GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases. Science 1991; 254: 1016-1019.

Strominger J.L., Re F. Toll-like Receptor 2 (TLR2) and TLR4 Differentially Activate Human Dendritic Cells. The J Biol Chem 2001; 276(40): 37692-37699

Sudan A., Ryan L., Brinch L., Espevik T., Waage A. The involvement of CD14 in stimulation of TNF production from peripheral mononuclear cells isolated from PNH Patients. Scand. J. Immunol. 1995; 41: 603-608

Sumrani N., Cacciarelli T.V., Georgi B., Daskalakis P., Miles A.M., Goldberg K., Hong J.H., Sommer B.G. Contribution of acute rejection to renal allograft loss from chronic rejection. Transplant. Proc. 1993; 25(3): 2259-60.

Tacke F, Randolph GJ. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. Immunobiology 2006; 211, 609-618

Taga K.M.H., Tosato G. Human interleukin-10 can directly inhibit T-cell growth. Blood 1993; 81(11): 2964-71

Takahashi E., Hori T., Sutherland G.R. Mapping of the human type II collagen gene (COL2A1) proximal to fra(12) (q13.1) by nonisotopic in situ hybridization. Cytogenet. Cell Genet. 1990; 54: 84–85

Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S. Toll-like receptors. Ann. Rev. Immunol. 2003; 21: 335–376.

Takeuchi A, Reddy GS, Kobayashi T, Okano T, Park J, Sharma S. Nuclear factor of activated T cells (NFAT) as a molecular target for 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3-mediated effects. J Immunol. 1998 Jan 1;160(1):209-18.

Takeuchi O., Kawai T., Muhlradt P. F., Radolf J. D., Zychlinsky A., Takeda K., Akira S. Discrimination of bacterial lipoproproteins by Toll-like receptor 6. Int. Immunol. 2001; 13: 933–940.

Takeuchi O., Sato S., Horiuchi T., Hoshino K., Dong Z., Modlin R. L., Akira S. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial proteins. J. Immunol. 2002; 169: 10–14.

Tax W.J.M. and van de Winkel J.G.J. Human Fcy receptor II: a standby receptor activated by proteolysis? Immunol. Today 1990; 11: 308

Taymans S.E., Pack S., Pak E., Orban Z., Barsony J., Zhuang Z., Stratakis, C.A. The human vitamin D receptor gene (VDR) is localized to region 12cen– q12 by fluorescent in situ hybridization and radiation hybrid mapping: genetic and physical VDR map. J. Bone Miner. Res. 1992; 14: 1163–

1166.

Te Velde A.A., Huijbens R.J., De Vries J.E., Figdor C.G. IL-10 stimulates monocyte Fc gamma R surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibodydependentcellular cytotoxicity by IFN-gamma, IL-4, and IL-10. J Immunol 1992; 149(12): 4048-52

Te Velde A.A., Huijbens R.J.F., De Vries J.E. and Figdor C.G. IL-4 decreases Fc-yR membrane expression and Fc-yRmediated cytotoxic activity of human monocytes. J. Immunol. 1990; 144: 3046

Terasaki P.I., Cecka J.M., Gjertson D.W., Takemoto S. High survival rates of kidney trans- plants from spousal and living unrelated donors. N.Engl.J.Med. 1995; 333: 333

Thiel D.J., Walter R.L., Le Du M.H., D´Arcy A., Chene C. Fountoulakis M., Garotta G., Winkler F.K. Ealick S.E. Observation of an unexpected third receptor molecule in the crystal structure of human interferon-□□receptor complex. Structure 2000; 8: 927–936

Thiel G., Bock A., Spondlin M., Brunner F.P., Mihatsch M., Rufli T., Landmann J. Long-term benefits and risks of cyclosporin A (sandimmun)-an analysis at 10years. Transplant. Proc.1994;26(5):2493-8.

Tiegs G., Barsig J., Matiba B., Uhlig S. Wendel A., Potentiation by Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor of Lipopolysaccharide Toxicity in Mice Te Am J of Invest 1994; 93: 2616-2622

Tilney N.L., Whitley W.D., Diamond J.R., Kupiec W.J., Adams D.H. Chronic rejection-an undefined conundrum. Transplantation 1991; 52: 389

Tobias P.S., Mathison J., Mintz D., Lee J-D, Kravchenko V., Kato K., Pugin J., Ulevitch R.J. Participation of lipopolysaccharide binding protein in lipopolysaccharide-dependent macrophage activation. Am J Respir Cell Mol Biol 1992; 7: 239-245.

Tobias P.S., Soldau K., Ulevitch R.J. Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. J Biol Chem 1989; 264: 10867-10871.

Todd R.F., Bhan A.K., Kabawat S.E., Schlossman S.F. Human myelomonocytic differentiation antigens defined by monoclonal antibodies. In: Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C, Schlossman SF, eds. Leucocyte Typing, Human Leucocyte Differentiation Antigens Detected by Monoclonal Antibodies. New York: Springer-Verlag, 1984; 424-433.

Torres A., Machado M, Cocepcion M.T., Martin N., Lorenzo V., Hernandez V., Rodriguez A.P., De Bonis E. Influence of vitamin D receptor genotype on bone mass changes after renal transplantation. Kidney Int. 1996; 50: 1726-1733

Trinchieri G. Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin-12. Int Rev Immunol 1998; 13(3-4): 365-96

Trowsdale J., Hanson I., Mockridge I., Beck S., Townsend A., Kelly A. Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. Nature 1990; 348: 741–744.

Tsan M.F., Gao B. Endogenous ligands of Toll-like Receptors J Leukocyte Biol 2004; 76: 514-518

Tsaur I, Gasser M, Aviles B, Lutz J, Lutz L, Grimm M, et al. Donor antigen-specific regulatory T-cell function affects outcome in kidney transplant recipients. Kidney Int. 2011; 79, 1005-1012

Tullius S.G., Tilney N.L. Both alloantigen-dependent and -independent factors influence chronic allograft rejection. Transplantation 1995; 59:313

Turner D.M., Williams D.M., Sankaran D., Lazarus M., Sinnott P.J., Hutchinson I.V. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. Eur. J. Immunogenet. 1997; 24: 1-8.

Uitterlinden A.G., Fang Y., Van Meurs J.B., Pols H.A., Van Leeuwen J.P. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. Gene 2004; 338(2): 143-156

Uitterlinden A.G., Fang Y., Van Meurs J.B., Van Leeuwen H. and Pols H.A. Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to vitamin D-related disease states. J Steroid Biochem Mol Biol 2004; 89: 187–193

Ulevitch R.J., Tobias P.S. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. Annu Rev Immunol 1995; 13: 437-457.

Ulrich C., Heine G.H., Gerhart M.K., Köhler H., Girndt M. Proinflammatory CD14+CD16+ Monocytes are associated with subclinical atherosclerosis in renal transplant patients.
Am. J. Transpl. 2008; 8: 103-110

Underhill D.M., Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. Current Opinion Immunology 2002; 14: 103–110

Underhill D.M., Ozinsky A., Hajjar A.M., Stevens A., Wilson C.B., Bassetti M., Aderem A. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. Nature 1999; 401: 811-815.

Unkeless J.C., Scigliano E. and Freedman V.H. Structure and function of human and murine receptors for IgG. Ann. Rev. Immunol.1988; 6: 251.

Ureña P., Herbelin A., Zingraff J. et al. Permeability of cellulosic and non-cellulosic membranes to endotoxin subunits and cytokine production during in-vitro haemodialysis. Nephrol. Dial. Transplant. 1992; 7: 16–28

Vabulas R.M., Ahmad-Nejad P., da Costa C., Miethke T., Kirschning C.J., Hacker H., Wagner H. Endocytosed hsp60s use Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. J Biol Chem 2001; 276: 31332-31339

Vadhan-Raj S., Keating M., LeMaistre A., Hittelman W. N., McCredie K., Trujillo J. M., Broxmeyer H. E., Henney C. and Gutterman J. U. Effects of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with myelodysplastic syndromes. N Engl J Med 1987; 317: 1545-1552.

Vadiveloo P. K., Stanton H. R., Cochran F. W. and Hamilton J. A. Interleukin-4 inhibits human smooth muscle cell proliferation. Artery 1994; 21(3): 161-81.

Van de Winkel J.G.J., Van Ommen R., Huizinga T.W.J. De Raad M.A.H, Tuijnman W.B., Groenen PiTA., Capel P.J.A., Koene R.A. and Tax W.J.M. Proteolysis induces increased binding affinity of the monocyte type II FcR for human IgG. J. Immunol. 1989; 143: 571

van Etten E, Mathieu C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts. J Steroid Biochem Mol Biol. 2005 Oct;97(1-2):93-101

Van Voorhis W.C., Steinman R.M., Hair L.S., Luban J., Witmer M.D., Koide S., Cohn Z.A. Specific antimononuclear phagocyte monoclonal antibodies. Application to the purification of dendritic cells and the tissue localization of macrophages. J Exp Med 1983; 158: 126-145.

Vieira P., Dang M.N., Johnson K.E., Kastelein R., Fiorentino D.F., Devries J.E., Roncarolo M.G., Mosmann T.R., Moore K.W. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRFI. Proc Natl Acad Sci 1991; 88(4): 1172-6

Vilcek J., Novel interferons. Nature Immunology 2003; 4: 8-9

Viriyakosol S., Tobias P.S., Kitchens R.L., Kirkland T.N. MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. J Biol Chem 2001; 276: 38044-38051.

Von Asmuth E.J., Dentener M.A., Bazil B., Bomna M.G., Leuwenberg J.F.M, Buurman W.A. Anti-CD 14 antibodies reduce responses of cultured human endothelial cells to endotoxin.
Immunology 1993; 80: 78-83.

Vreugdenhil A.C., Snoek A.M., Van`t Veer C., Greve J.W., Buurman W.A. LPS-binding protein circulates in association with apoB-containing lipoproteins and enhanced endotoxin –LDL/VLDL

interaction. J.Clin. Invest. 2001; 107(2): 225-234

Wan Y., Freeswick, P.D., Khemlani, L.s., Kispert, P.H., Wang, S.C., Su, G.L., Billiar, T.R. Role of lipopolysacchride (LPS), interleukin-1, interleukin-5, tumor necrosis factor, and dexamethasone in regulation of LPS-binding protein expression in normal hepatocytes and hepatocytes from LPS-treated rats. Infect. Immun. 1995; 63(7): 2435-2442

Wang E., Aghajanian C., Spriggs D.R. Posttranscriptional regulation of protein expression in human epithelial carcinoma cells by adenine-uridine-rich elements in the 3'-untranslated region of tumor necrosis factor-alpha messenger RNA. Cancer Res 1997; 57(23): 5426-33

Waßmuth R: Einführung in das HLA System. Ecomed Verlagsgesellschaft AG & Co.KG, Landsberg, Deutschland (1995)
Weinstein S.L., June C.H., DeFranco A.L. Lipopolysaccharide induced protein tyrosine phosphorylation in human macrophages is mediated by CD14. J Immunol 1993; 151: 3829-3838.

Welch G.R., Wong H.L. and Wahl S.M. Selective induction of Fc-yRIII on human monocytes by transforming growth factor J. Immunol. 1990; 144: 3444

Welsh J., Wietzke J.A., Zinser G.M., Byrne B., Smith K., Narvaez C.J. Vitamin D-3 receptor as a target for breast cancer prevention. J. Nutr. 2003; 133 (Suppl. 7): 2425-2433.

Wesche H., Henzel W., Shilinglaw W., Li S., Cao Z. MyD88: An Adapter that Recruits IRAK to the IL-1 Receptor Complex. Immunity 1997; 7: 837-847

Wieser M., Bonifer R., Oster W., Lindemann A., Mertelsmann R. and F. Herrmann Interleukin-4 induces secretion of CSF for granulocytes and CSF for macrophages by peripheral blood monocytes. Blood. 1989; 73: 1105-1108.

Willems F., Delville J.P., Gerard C., Delvaux A., Velu T., De Boer M., Goldman M. Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. Eur J Immunol 1994; 24(4): 1007-9

Williams M.J., Rodriguez A., Kimbrell D.A., Eldon E.D. The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in Drosophila host defense. EMBO J 1997; 16:6120-6130.

Windsor W.T., Tsarbopoulos A., Zhang R., Durkin J., Baldwin S., Paliwal S., Mui P.W., Pramanik B., Trotta P.P. et al. Disulfide bond assignments and secondary structure analysis of human and murine interleukin 10. Biochemistry 1993; 32(34): 8807-15

Wong G.G., Witek J.S., Temple P.A., Wilkens K.M., Leary A.C., Luxenberg D.P., Jones S.S., Brown E.L., Kay R.M., Orr E.C. and et al. Human GM-CSF: molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins. Science 1985; 228: 810-815.

Woronicz J.D., Gao X., Cao Z., Rothe M., Goeddel D.V. IkappaB kinase beta: NF.kappaB activation and complex formation with I kappaB kinase –alpha and NIK. Science 1997; 278: 866-869

Worthen G.S., Avdi N., Vukajlovich S., Tobias P.S. Neutrophil adherence induced by lipopolysaccharide in vitro. J Clin Invest 1992; 90: 2526-2535.

Wright S.D. CDl4 and immune response to lipopolysaccharide. Science 1991b; 252: 1321-1322.

Wright S.D., Detmers P.A., Aida Y., Adamowski R., Anderson D.C., Chad Z., Kabbash L.G., Pabst M.J. CD 18-deficient cells respond to lipopolysaccharide in vitro. J Immunol 1990; 144: 2566-2571.

Wright S.D., Ramos R.A., Hermanowski-Vosatka A., Rockwell P., Detmers P.A. Activation of the adhesive capacity of CR3 on neutrophils by endotoxin: dependance on lipopolysaccharide binding protein and CD14. J Exp Med 1991; 173: 1281-1286.

Wright S.D., Ramos R.A., Patel M., Miller D.S. Septin: A factor in plasma that opsonizes lipopolysaccharide-bearing particles for recognition by CD14 on phagocytes. J Exp Med 1992; 176: 719-727.

Wurfel M.M., Hailman E. and Wright S.D. Soluble CD14 acts as a shuttle in the neutralization of lipopolysaccharide (LPS) by LPS-binding protein and reconstituted high density lipoprotein. J. Exp. Med. 1995 181:1743–1754.

Wurfel M.M., Kunitake S.T., Lichenstein H., Kane J.P. and S.D. Wright. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. J. Exp. Med. 1994; 180: 1025–1035

Wurfel M.M., Monks B.G., Ingalls R., Dedrick R.L., Delude R., Zhou D., Lamping N., Schuhmann R., Thieringer R., Fenton M., Wright S.D., Golenbock D. Targeted Deletion of the LPS-Binding Protein Gene leads to profound suppression of LPS responses ex vivo, whereas in vivo responses remain intact. J Exp Med 1997; 186: 2051-2056

Wynn T.A., IL- 13 effector functions. Ann Rev Immunol 2003; 21: 425-456

Xu J., Lucas R., Schuhmann M., Kühnle S., Meergans T., Barreiros A.P., Lohse A.W., Otto G., Wendel A. GM-CSF Restores Innate, But Not Adaptive, Immune Responses in Glucocorticoid-Immunosuppressed Human Blood in vitro. J. Immunol. 2003; 171: 938–947

Yamamoto H., Miyamoto K., Li B., Taketani Y., Kitano M., Inoue Y., Morita K., Pike J.W., Takeda E. The caudal-related homeodomain protein Cdx-2 regulates vitamin D receptor gene expression in the small intestine. J. Bone Miner. Res. 1999; 14: 240– 247.

Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Hoshino K., Kaisho T., Sanjo H., Takeuchi O., Sugiyama M., Okabe M., Takeda K., Akira S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. Science 2003; 301: 640–643.

Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Sanjo H., Uematsu S., Kaisho T., Hoshino, K., Takeuchi, O., Kobayashi, M., Fujita, T., Takeda, K., Akira, S. Essential role for TIRAP in activation of the signaling cascade shared by TLR2 and TLR4. Nature 2002; 420: 324–329.

Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Uematsu S., Hoshino K., Kaisho T., Takeuchi O., Takeda, K., Akira, S. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. Nat. Immunol. 2003; 4: 1144–1150

Yamamoto M., Sato S., Mori K., Hishino K., Takeuchi O., Takeda K., Akira S. Cutting edge: a novel Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-γ promoter in the Tolllike receptor signaling. J. Immunol. 2002; 169: 6668–6672.

Yamaoka S., Courtois G., Bessia C., Whiteside S.T., Weil R., Agou F., Kirk H.E., Kay R.J., Israel A. A complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. Cell 1998; 93: 1231-1240

Yang R. B., Mark M. R., Gray A., Huang A., Xie M. H., Zhang M., Goddard A., Wood W. I., Gurney, A. L., and Godowski, P. J. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular ignalling. Nature 1998; 395: 284–288

Yang, R.B., Mark, M.R., Gurney, A.L., and Godowski, P.J. Signaling events induced by lipopolysaccharide-activated toll-like receptor 2. J. Immunol. 1999; 163: 639–643.

Yasui K., Becker E.L., Sha'afi R.I. Lipopolysaccharide and serum cause the translocation of G-protein to the membrane and prime neutrophils via CD14. Biochem Biophys Res Comm 1992; 183: 1280-1286.

Ye W.Z., Reis A.F., Velho G. Identification of a novel Tru9I polymorphism in the human vitamin D receptor gene. J. Hum. Genet. 2000; 45: 56– 57.

Yoshimura A., Lien E., Ingalls R.R., Tuomanen E., Dziarski R., Golenbock D. Cutting Edge: Recognition of Gram-Positive Bacterial Cell Wall Components by the Innate Immune System Occurs Via Toll-Like Receptor 2. J. Immunol., 1999; 163: 1–5.

Zandi E., Rothwarf D.M., Delhase M., HayakawaM., Karin M. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and

NF-kappaB activation. Cell 1997; 91: 243-252

Zhang Y., Doerfler M., Lee T. C., Guillemin B., Rom W. N. (1993) Mechanisms of stimulation of interleukin-1 and tumor necrosis factor by Mycobacterium tuberculosis components. J. Clin. Invest. 1993; 91: 2076–2083.

Ziegler-Heitbrock H.W.L. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+CD16+ subpopulation. Immunol. Today. 1996; 17(9): 424-8.

Ziegler-Heitbrock H.W.L., Fingerle G., Ströbel M., Schraut W., Stelter F., Schütt C., Passlick B., Pforte A. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. Eur. J. Immunol. 1993; 23: 2053-8.

Ziegler-Heitbrock H.W.L., Schraut W., Wendelgaß P., Strobel M., Sternsdorf T., Weber C., Aepfelbacher M., Ehlers M., Schütt C., Haas J.G. Distinct patterns of differentiation induced in the monocytic cell line Mono Mac 6. J. Leukoc. Biol. 1994; 55: 73-80

Ziegler-Heitbrock HWL, Ancuta P, Crowe S, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. Blood 2010; 116; 74-80

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. med. J. E. Scherberich, der mir das Thema zu dieser Dissertation überlassen hat und für die hervorragende Zusammenarbeit während dieser Zeit.

Weiterhin danke ich Professor Dr. med. Peter Lose und dessen Mitarbeitern im Labor des Instituts für klinische Chemie, LMU-Klinikum Grosshadern, für Ihre Unterstützung, Bereitstellung von Reagenzien und Geduld während der Anfertigung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Michael Fischereder und Mitarbeitern, LMU Standort Innenstadt, Poliklinik München, Pettenkoferstr. 8, für seine Mithilfe bei den molekularbiologischen Analysen.

Herrn Dipl.-Phys. Nikolaos Tsolas danke ich sehr für seine Erläuterungen und unermüdliche Hilfe während der statistischen Auswertung der z.T. komplexen Datensätze der Arbeit.

Lebenslauf:

Persönliche Daten:

Name, Vorname:	Farmakiotis, Apostolos
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Familienstand:	Ledig

Schulbildung:

1982-1988 Besuch der griechischen Grundschule in München
1988-1991 Besuch des griechischen Gymnasiums in München
1991-1994 Besuch des griechischen Lyzeums in München

Hochschulausbildung:

Beginn des Studiums der Zahnheilkunde an der Ludwig-Maximilians-Universität München im März 1995
Naturwissenschaftliche Vorprüfung im März 1996
Zahnärztliche Vorprüfung im September 1997
Zahnärztliche Prüfung im August 2000 und Approbation im Februar 2001

Wehrdienst:

Wehrdienst zwischen 2001- 2002