

Aus der Medizinischen Poliklinik - Campus Innenstadt  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Komm. Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke)

**Prävalenz der verzögerten Funktion von Nierentransplantaten  
(delayed graft function, DGF) und Prädiktion mittels demografischer  
und genetischer Marker**

---

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

vorgelegt  
von Georg Dieplinger  
aus Freilassing

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Michael Fischereeder

Mitberichterstatter:

Priv. Doz. Dr. Raphaela Waidelich

Prof. Dr. Walter Samtleben

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 19.2.2009

Meiner Familie, besonders meiner Mutter Gabriele

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Definition der DGF	2
1.2 Inzidenz und Relevanz der DGF	4
1.3 Pathophysiologie der DGF	6
1.3.1 IschämieReperfusionsschaden	6
1.3.2 Rolle des angeborenen und adaptiven Immunsystems	10
1.4 Risikofaktoren für DGF	12
1.4.1 Spender assoziierte Risikofaktoren	12
1.4.2 Risikofaktoren im Rahmen der Transplantation	13
1.4.3 Empfänger assoziierte Risikofaktoren	13
1.4.4 Immunologische Risikofaktoren	14
1.5 Quantifizieren des Risikos anhand eines DGF-Scores	14
1.6 Genetik der DGF	15
1.6.1 Allgemeines	15
1.6.2 Einfluss des Empfängers	15
1.6.3 Einfluss des Spenders	16
1.6.4 Analyse des Auftretens einer DGF in der untersuchten Kohorte auf konkordantes Verhalten der Nieren eines Spenders	16
1.6.5 Auswahl und Beschreibung der Polymorphismen	17
1.6.5.1 Glutathion-S-Transferase M1 (GSTM1): Enzymfunktion, zugehöriges Gen und Polymorphismus	17
1.6.5.2 Toll-like Rezeptor 4 (TLR4): Enzymfunktion, zugehöriges Gen und Polymorphismus	20
1.6.5.3 Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): Enzymfunktion, zugehöriges Gen und Polymorphismus	21
<b>2 Fragestellung und Zielsetzung</b>	<b>24</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>25</b>
3.1 Studiendesign	25
3.2 Patientenkollektiv	26
3.3 Der modifizierte DGF-Score	27
3.4 Konkordanzanalyse	29
3.5 Untersuchung der Spenderpolymorphismen	30

## Einleitung

3.5.1	Molekularbiologische Methoden	30
3.5.1.1	Grundsätzliche Vorgehensweise	30
3.5.1.2	Isolierung genomischer DNA	31
3.5.1.3	Die Polymerasekettenreaktion (PCR)	32
3.5.1.4	Die Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus Analyse	34
3.5.1.5	Agaroseelektrophorese	35
3.5.2	Typisierung der Polymorphismen	36
3.5.2.1	Polymorphismus und Deletion im GSTM1-Gen	36
3.5.2.2	Polymorphismen im TLR4-Gen	39
3.5.2.3	Polymorphismus im MCP1-Gen	42
3.6	Statistische Auswertung	43
3.6.1	Allgemeine Voraussetzungen und Vorgehensweise	43
3.6.2	Deskriptive Analyse des Gesamtkollektivs	43
3.6.3	Hypothesen generierende Statistik	43
3.6.3.1	Konkordanzanalyse	43
3.6.3.2	Einfluß der Spendervariablen auf die Entstehung einer DGF	43
3.6.3.3	Auswirkung einer DGF auf Variablen nach der Transplantation	44
3.6.4	Signifikanzniveau	44
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
4.1	Beschreibung der Spender	45
4.2	Beschreibung der Empfänger	45
4.3	Häufigkeit der DGF	46
4.4	Ergebnis der Konkordanzanalyse	47
4.5	Auswirkungen der DGF auf das Studienkollektiv	48
4.6	Der modifizierte DGF-Score	49
4.7	Einfluss verschiedener Faktoren auf Entwicklung einer DGF	52
4.8	Ergebnisse und Auswertung der Genotypisierung der Spender	54
4.8.1	Allgemeine Vorbemerkungen	54
4.8.2	Polymorphismus im GSTM1-Gen	54
4.8.3	Polymorphismen im TLR4-Gen	58
4.8.3.1	A896G Mutation (Asp299Gly) im TLR4-Gen	58
4.8.3.2	C1196T Mutation (Thr399Ile) im TLR4-Gen	60
4.8.4	Polymorphismus im MCP1-Gen	61
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>63</b>

## Einleitung

5.1	Beschreibung der Studienpopulation	63
5.2	Häufigkeit der DGF in der Studienpopulation	63
5.3	Relevanz der DGF für die Studienpopulation	63
5.4	Ermittelte Punktwerte und Verifizierung des modifizierten DGF-Scores am Studienkollektiv	65
5.5	Einfluss verschiedener demographischer Faktoren auf die Entwicklung einer DGF am Studienkollektiv	66
5.6	Individuelles Risiko für die Entstehung einer DGF	67
5.7	Genotypisierung des Spenders	68
5.7.1	Relevanz der Genetik des Spenders	68
5.7.2	Konkordantes Verhalten der Nieren in der untersuchten Kohorte	69
5.7.3	Aufbau und Ausgangspunkte des genetischen Teils der Studie	69
5.7.4	Bewertung der Ergebnisse der Genotypisierung im <i>GSTM1</i> -Gen	70
5.7.4.1	Vergleich der <i>GSTM1</i> Genotypfrequenz der Studienpopulation	70
5.7.4.2	Einfluss des <i>GSTM1</i> Genotyps auf DGF	70
5.7.4.3	Signifikanter Einfluss des <i>GSTM1</i> * <i>B</i> Allels auf DGF im Studienkollektiv	71
5.7.5	Bewertung der Ergebnisse der Genotypisierung im <i>TLR4</i> -Gen	72
5.7.6	Bewertung der Ergebnisse der Genotypisierung im <i>MCP1</i> -Gen	73
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>77</b>
7.1	Materialien und Geräte	77
7.1.1	DNA-Isolierung	77
7.1.2	Polymerasekettenreaktion	77
7.1.3	Namen und Sequenzen der verwendeten Primer	77
7.1.4	Restriktionsverdau	78
7.1.5	Agaroseelektrophorese	78
7.1.6	Geräte	79
7.2	Datenblatt Spender	80
7.3	Datenblatt Empfänger	81
7.4	Abkürzungsverzeichnis	82
7.5	Lebenslauf	84
7.6	Danksagung	85
7.7	Ehrenwörtliche Erklärung	86

Einleitung

**8 Literaturverzeichnis**

**87**

## 1 Einleitung

Im Jahr 2007 wurden in Deutschland 567 Nierentransplantationen nach Lebendspende durchgeführt (47). Die Lebendspende, der postmortalen Organspende den Erfolg betreffend eigentlich überlegen, ist oft aus vielerlei Gründen nicht möglich. So macht die postmortale Organspende mit 2340 Nierentransplantationen an 40 Kliniken im Jahr 2007 in Deutschland, aber auch weltweit, immer noch den Großteil der durchgeführten Nierentransplantationen aus (46).

Blickt man auf die Geschichte der postmortalen Nierentransplantation, so war die akute Abstoßungsreaktion mit ihren immunologischen Vorgängen die primäre klinische Herausforderung und bestimmender Faktor für den Erfolg einer Transplantation. Mit der Einführung moderner immunsuppressiver Behandlungsschemata konnte die Häufigkeit der akuten Abstoßungsreaktion aber auf weit unter 20% gesenkt werden (11, 74).

Der jährliche Funktionsverlust von Nierentransplantaten liegt weit über dem nicht transplantierten Nieren. Verursacht wird dieser zum einen durch Schäden im Rahmen der chronischen Transplantatnephropathie, einer schwerwiegenden, derzeit nicht adäquat therapierbaren Komplikation, die für einen großen Teil der Transplantatverluste auf längere Zeit verantwortlich ist (6).

Zum anderen gelten auch Insulte in der Frühphase der Transplantation als entscheidender Faktor bezüglich Lebensdauer und Funktion des Transplantats. Wie schon erwähnt war und ist immer noch die Kontrolle der immunologischen Vorgänge und die damit verbundene akute Abstoßungsreaktion wichtig für den Erfolg der Transplantation. Um diese einzudämmen, ist es von großer Bedeutung, dass sich Spender und Empfänger in immunologischer Sicht möglichst wenig unterscheiden. So ist z.B. das Abgleichen der Blutgruppe von Bedeutung; weiter wird bei Spendern und Empfängern eine Typisierung der HLA-Oberflächenantigene durchgeführt (15). Um für den Empfänger einen entsprechenden Spender zu finden ist es sinnvoll, einen möglichst großen Pool von Empfängern und Spendern zur Verfügung zu haben. So liegt es nahe, die Organe länderübergreifend zu verteilen. In Europa gewährleistet *Eurotransplant* die länderübergreifende Verteilung der Organe.

## Einleitung

Das aber bedeutet in vielen Fällen eine lange Transportzeit für das zu transplantierende Organ. Während dieser ist das Organ gewebsschädigender Ischämie ausgesetzt, da es an keinen Kreislauf angeschlossen ist. Der Zeitraum in dem das Organ nicht an den Blutkreislauf angeschlossen ist, wird als kalte Ischämiezeit (CIT) bezeichnet. Diese Zeit versucht man zu minimieren, um den Schaden im Transplantat möglichst gering zu halten. Bei der postmortalen Organspende erfolgt in der Zeit zwischen der Organentnahme beim hirntoten Spender und der Transplantation eine Konservierung des Organs durch Lagerung in gekühlter Flüssigkeit. Die Flüssigkeit kann nur die Toleranz des Organs gegen die in dieser Zeit bestehende Ischämie verlängern, eine vollständige Vermeidung der Schädigung des Transplantatgewebes ist aber nicht möglich. So führen die im Moment in Kauf genommenen langen Transportzeiten zu langen kalten Ischämiezeiten und somit zur ischämiebedingten Organschädigung.

Die Schäden in der Frühphase der Transplantation bewirken häufig eine (meist vorübergehende) Funktionseinschränkung des Transplantats. Diese Funktionseinschränkung, bezeichnet als verzögerte Transplantatfunktion (*delayed graft function*, DGF), stellt, während das Problem der akuten Abstoßungsreaktion in den Hintergrund rückt, eine immer wichtiger werdende Hürde für eine erfolgreiche Nierentransplantation dar. Die DGF ist in vielerlei Hinsicht für Ablauf und Erfolg einer Transplantation entscheidend.

### 1.1 Definition der DGF

Ein Problem bei der Untersuchung der DGF ist es, dass in den verschiedenen Arbeiten unterschiedliche Definitionen für die DGF verwendet werden. Ein kürzlich erschienenen Review zu diesem Thema weist auf die Notwendigkeit einer exakten allgemein gültigen Definition der DGF hin (127).

Folglich ist es für diese Arbeit wichtig, eine klare und schlüssige Definition zur Anwendung auf das hier untersuchte Studienkollektiv festzulegen. Grundsätzlich beschreibt der Begriff DGF einen Mangel an ausreichender Eigenfunktion einer transplantierten Niere, der dem Eingreifen in Form von Dialyse bedarf. So lautet auch die am häufigsten verwendete Definition: *DGF ist die Notwendigkeit einer Dialysebehandlung innerhalb der ersten 7 Tage nach Transplantation (39, 86)*. Diese Definition hat gewisse Schwächen. So muss man darauf achten, dass auch andere Indikationen, wie z.B. Hyperkaliämie, eine Dialysebehandlung in der ersten Woche

## Einleitung

nach sich ziehen können. Dennoch wurde für diese Arbeit diese Definition ausgewählt. Neben der Tatsache, dass sie die am häufigsten verwendete ist, sprechen noch weitere, im Folgenden erläuterte, Gründe für diese Definition. So stellt die Tatsache, ob eine Dialyse durchgeführt wurde oder nicht, obwohl die Entscheidung für eine Dialysebehandlung vom behandelnden Arzt oder den Kriterien in der jeweiligen Klinik abhängt, einen klar definierten Faktor in der Behandlung des Organempfängers dar. Auch geht die Dialysebehandlung erwiesenermaßen mit einer Steigerung der Morbidität einher. Das verleiht der Dialysebehandlung als Ausgangspunkt zur Definition der DGF besonderes Gewicht und macht sie dadurch geeignet. Zum Vergleich zeigt Tabelle 1-1 eine Auswahl von weiteren verwendeten Definitionen und erläutert deren jeweilige Problematik. Die klinischen Parameter, die hier zur Definition der DGF herangezogen werden, stehen ebenfalls mit der DGF in Verbindung. Wie stark diese klinischen Parameter aber durch die Entwicklung einer DGF beeinflusst werden ist noch unklar. So ist es schwierig, die jeweiligen Grenzwerte der klinischen Parameter in den Definitionen festzulegen, wohingegen die Tatsache, ob eine Dialysebehandlung durchgeführt wurde oder nicht einen harten Definitionsendpunkt darstellt.

**Tabelle 1-1 Alternative Definitionen der DGF**

<b>Alternative Definition der DGF</b>	<b>Problematik dieser Definition</b>
Anzahl der Tage, bis eine Kreatininclearance von über 10 mL/min erreicht wird. Berechnet wird nach der Gault-Cockcroft Formel, der Schwellenwert der minimalen Transplantatsfunktion (31).	Wird durch die Dialyse beeinflusst.
Serumkreatininwert von > 3 mg/dl am fünften Tag nach der Transplantation (48).	Ist abhängig von der Muskelmasse.
Notwendigkeit einer Dialysebehandlung innerhalb der ersten 72 Stunden nach Transplantation (44).	72 Stunden Dialysepause sind fast immer möglich.
Falls der Serumkreatininwert in der ersten Woche nach der Transplantation	Ist abhängig von der Restfunktion und vom Ausgangspunkt.

## Einleitung

an drei aufeinanderfolgenden Tagen steigt, unverändert bleibt oder um weniger als 10% pro Tag abfällt (10).	
Ein Anstieg des Serumkreatinins auf höhere Werte als vor der Transplantation oder eine Urinproduktion von <300 ml in den ersten 6 Stunden nach Transplantation trotz Diuretikabehandlung und adäquater Flüssigkeitszufuhr (33).	Welche klinische Relevanz hat dieser Wert?
Urinproduktion von weniger als einem Liter in den ersten 24 Stunden nach Transplantation oder ein Abfall des Serumkreatinins von weniger als 20 bis 30%, der sich in einer schlechten GFR zeigt (39)	Welche klinische Relevanz hat dieser Wert?

## 1.2 Inzidenz und Relevanz der DGF

In dieser Arbeit wurde an einem Studienkollektiv die Inzidenz der DGF berechnet. Um die ermittelte Rate zu bewerten ist es wichtig, diesen Wert im Bezug auf Inzidenzen, welche in anderen Kollektiven ermittelt wurden, einordnen zu können. Die Inzidenz der DGF aber variiert stark in anderen Arbeiten. Gründe hierfür könnten die unterschiedlichen Definitionen der DGF oder auch die verschiedenen Annahmekriterien für Spenderorgane in verschiedenen Transplantationszentren sein. Auch die Zusammensetzung der Spenderkollektive differiert in Punkten wie Alter, Geschlecht oder ethnischer Herkunft. Manche Kollektive beinhalten, im Gegensatz zu unserem Kollektiv, *non heart beating donors (NHBD)* und Lebendspender. Tabelle 1-2 listet einige Beispiele für DGF Raten in verschiedenen Arbeiten auf und erläutert die Besonderheiten des jeweils untersuchten Spenderkollektivs.

**Tabelle 1-2 DGF Inzidenzen**

<b>DGF Inzidenz</b>	<b>Beschreibung des Kollektivs</b>
15% bis 25% <i>Peeters et al. (85)</i>	Die in diesem <i>review</i> betrachteten

## Einleitung

		Kollektive enthalten teilweise <i>NHBD</i> .
22,7%	<i>Lebranchu et al. (62)</i>	Betrachtet 8950 Transplantationen und enthält keine Lebendspender.
20% bis 29%	<i>Halloran et al. (39)</i>	Fasst die DGF-Raten in verschiedenen Transplantationszentren in den USA zusammen. Es ist davon auszugehen, dass das betrachtete Kollektiv sowohl <i>heart beating donors (HBD)</i> , <i>NHBD</i> und Lebendspender enthält
ca 30%	<i>Sola et al. (106)</i>	Betrachtet 3365 Transplantationen an spanischen Transplantationszentren. Kollektiv enthält <i>NHBD</i> .

Obwohl der direkte Einfluss der DGF auf den Transplantatsverlust umstritten ist, haben viele Studien die DGF als prädisponierenden Faktor für akute Abstoßungsreaktion und eingeschränkte Überlebensdauer des Transplantats ausgemacht. Der exakte Zusammenhang zwischen DGF und akuter Abstoßungsreaktion bleibt kontrovers (51). Einige Studien weisen darauf hin, dass, wenn keine akute Abstoßungsreaktion besteht, die DGF keinen Einfluss auf die Lebensdauer des Transplantats hat (67, 118). Viele Arbeiten zeigen aber, dass DGF und akute Abstoßungsreaktion unabhängig voneinander sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen die Lebensdauer des Transplantats verschlechtern (18, 32, 49, 81, 89, 100, 101, 116). *Halloran et al.* z.B. stellen bei auftreten einer DGF ein schlechteres Transplantatüberleben (Tx-Überleben), ein schlechteres Empfänger-Überleben und eine schlechtere Tx-Funktion gemessen an der GFR fest (39). Der unabhängige Einfluss der DGF auf das Tx-Überleben ist wichtig, da er darauf hinweisen würde, dass selbst ein optimales Eindämmen der akuten Abstoßungsreaktion kein optimales Tx-Überleben gewährleisten könnte. Dafür spricht, dass, obwohl sich die Inzidenz der akuten Abstoßungsreaktion in den letzten Jahren drastisch verringert hat, die DGF Rate in den letzten zehn Jahren andererseits nur leicht zurückgegangen ist und sich auch das mittlere Tx-Überleben nur unwesentlich verbessert hat (11, 39, 72, 74).

Kommt es zur DGF, erfordert dies ein aufwändigeres Management des Patienten. So führen unter anderem anfallende Dialysebehandlungen, radiologische

## Einleitung

Untersuchungen, Nadelbiopsien und intensiveres immunsuppressives Medikamentenmonitoring zu einem diagnostischen und therapeutischen Mehraufwand. Das aufwendigere Patientenmanagement und die damit verbundene längere Hospitalisierung des Patienten treiben zusätzlich zur Morbidität die Kosten einer Transplantation in die Höhe (2, 68, 93). Eine retrospektive Studie zeigt, dass bei Patienten mit DGF, verglichen mit denen mit sofortiger Funktion des Transplantats, ein im Schnitt zehn Tage längerer Krankenhausaufenthalt vonnöten war (93).

Entwicklungen und Maßnahmen, die helfen die DGF zu verstehen und zu behandeln, bedeuten also nicht nur großen Benefit für den Patienten, sondern senken auch die Transplantationskosten.

### **1.3 Pathophysiologie der DGF**

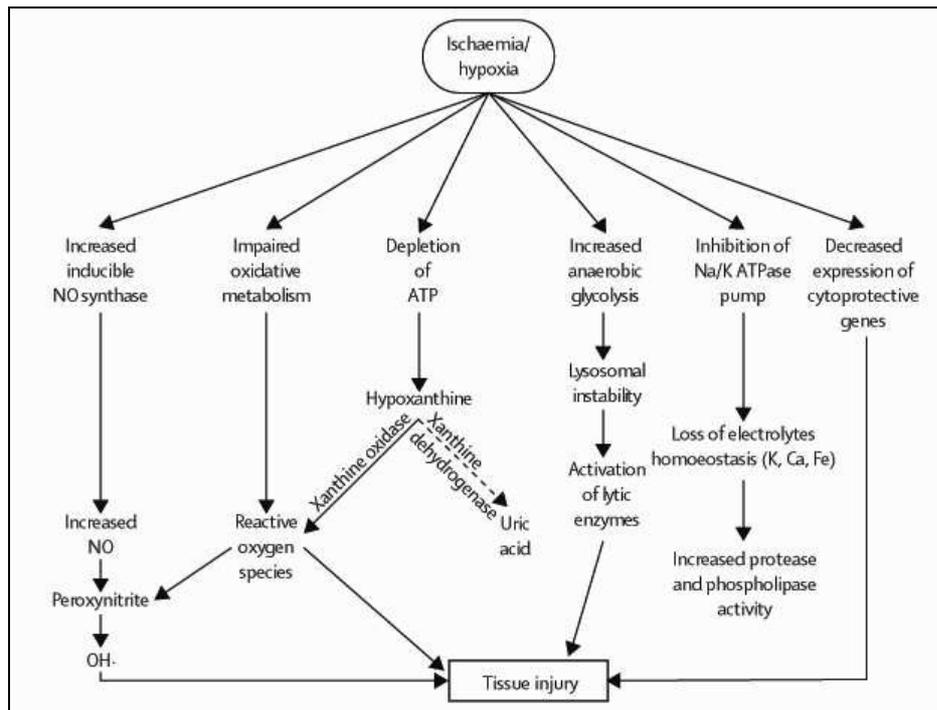
Im histologischen Schnitt zeigt sich bei der DGF das Bild einer akuten Tubularnekrose (ATN), die der ATN bei nicht transplantierten Nieren ähnelt. Die ATN bei transplantierten Nieren zeigt aber mehr tubuläre Zylinder, teilweise Nekrosen an Tubuluskreuzungen, weniger differenzierte und regenerierte Tubuli, mehr Kalziumoxalatkristalle und mehr Mikrokalzifikation (107).

#### **1.3.1 IschämieReperfusionsschaden**

Bisherige Erkenntnisse zeigen, dass für die Entstehung der DGF die Vorgänge und Mechanismen im Rahmen des Gewebeschadens durch Ischämie und Reperfusion eine entscheidende Rolle spielen. In den letzten Jahren hat sich das Verständnis dieses IschämieReperfusionsschadens insbesondere bei der Nierentransplantation stark verbessert (86).

Während der Zeit zwischen Organentnahme beim Spender und der Transplantation ist das Organ vom Blutfluss und somit von der Sauerstoffzufuhr abgeschnitten. In dieser Ischämiephase reichern sich schädliche Stoffwechselprodukte im Gewebe an. Die folgende Abbildung 1-1 zeigt eine Übersicht zellulärer Mechanismen der Gewebeschädigung.

## Einleitung



**Abbildung 1-1 nach Perico et al. (86) Mechanismen der biochemischen und molekularen Veränderungen in der Niere ausgelöst durch IschämieReperfusion.** Gestrichelte Linie zeigt das Ausbleiben des Stoffwechsels zur Umwandlung in Harnsäure. Übersetzung der dargestellten Begriffe: ischaemia = Ischämie; increased inducible NO Synthase = Anstieg der induzierbaren NO-Synthase; impaired oxidative metabolism = abgeschwächter oxidativer Stoffwechsel; depletion of ATP = vermehrter ATP Verbrauch; increased anaerobic glycolysis = Anstieg anaerober Glykolyse; inhibition of Na/K ATPase = Hemmung der Na/K ATPase; decreased expression of cytoprotective genes = verminderte Expression von zytoschutzenden Genen; lysosomal instability = lysosomale Instabilität; loss of electrolytes homeostasis = Verlust der Elektrolythomöostase; increased protease and phospholipase activity = erhöhte Aktivität der Proteasen und Phosphatasen; uric acid = Harnsäure; reactive oxygen species = reaktive Sauerstoffradikale; tissue injury = Gewebsschaden.

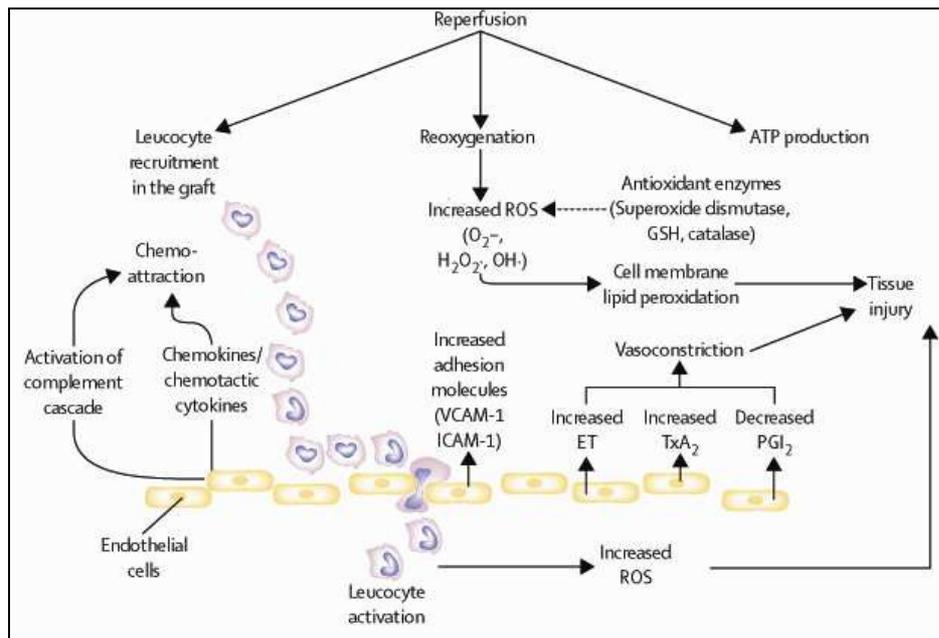
Die wichtigsten in Abbildung 1-1 veranschaulichten, durch die Hypoxie hervorgerufenen Veränderungen, sind vermehrter Abbau von ATP, die Hemmung der Na/K ATPase, vermehrte anaerobe Glykolyse und die Verhinderung des oxidativen Stoffwechsels (86). ATP wird zu Hypoxanthin abgebaut, was ohne Sauerstoff nicht weiter zu Harnsäure verstoffwechselt werden kann und so reaktive Sauerstoffradikale erzeugt (24). Die stark aktivierte anaerobe Glykolyse führt zur Anreicherung von Laktat, was den intrazellulären pH-Wert senkt und so zur lysosomalen Instabilität mit der Aktivierung lytischer Enzyme führt (86). Die Deaktivierung der Na/K ATPase stört die Elektrolythomöostase, was wiederum Proteasen und Phospholipasen aktiviert (86). Durch die Hemmung des oxidativen Stoffwechsels wird unter anderem die Bindung von Eisen an seine Trägerproteine gehemmt. Es kommt zur Erhöhung der

## Einleitung

intrazellulären Konzentration von freiem Eisen, welches ein starker Katalysator für Reaktionen ist, die die besonders schädlichen freien Sauerstoffradikale generieren (40). Das fördert auch die Entstehung anderer Radikale wie Stickstoffmonoxid (NO), welches zusammen mit Superoxidradikalen zu Peroxinitrit reagiert, was wiederum Proteine umwandeln und so degenerieren kann. Weiter greift NO das Zytoskelett an, was Verbindungen der Tubuluszellen lösen und zur Obstruktion im proximalen Tubulus führen kann. Auch wird bei Hypoxie in frisch isolierten proximalen Tubuli von Ratten die NO-Synthase aktiviert (102). Die meisten Versuche lassen vermuten, dass, obwohl die verstärkte Entstehung von NO durch die aktivierte NO-Synthase zur Vasodilatation führt und so den Schaden am Transplantat verringert, NO dennoch durch die Förderung des durch freie Radikale verursachten Schadens eine negative Rolle spielt (64, 80). Als Antwort auf die Ischämie im Gewebe werden auch zytoprotektive Mechanismen wie das Herunterfahren der Stoffwechselaktivität in Gang gesetzt. Viele Arbeiten bestätigen die vermehrte Transkription von Genen, deren Produkte zytoprotektiv oder mit der zellulären Regeneration in Verbindung stehen (9, 25). *Lemos et al.* zeigen, dass bei Nieren von Leichenspendern die Expression der Gene für die protektiven Faktoren HO-1, VEGF und Bcl-2 im Vergleich zu Nieren von Lebendspendern erniedrigt ist (63). Diese verminderte Expression könnte eine Fehlanpassung an den IschämieReperfusionsschaden bedeuten und so die Transplantatsfunktion negativ beeinflussen (63).

Bei der Implantation kommt es zur Wiederanlage des Blutflusses, die Reperfusionphase beginnt. Abbildung 1-2 zeigt die Vorgänge bei Reperfusion, welche im schon vorgeschädigten Nierengewebe ausgelöst werden und den Ischämieschaden weiter verstärken.

## Einleitung



**Abbildung 1-2 nach Perico et al. (86) Schematische Darstellung der Einwanderung der Leukozyten, der Aktivierung der Endothelzellen und der Entstehung von inflammatorischen und vasoaktiven Substanzen, welche die Gewebeschädigung nach Reperfusion fortsetzen.**

Gestrichelte Linie zeigt Hemmung an. Übersetzung der dargestellten Begriffe: ROS = reactive oxygen species = freie Sauerstoffradikale; GSH = glutathione = Glutathion;  $TxA_2$  = thromboxane = Thromboxan; ET = endothelin;  $PGI_2$  = prostacyclin = Prostaglandin<sub>2</sub>; reoxygenation = Reoxygenierung; leucocyte recruitment in the graft = Leukozyteneinwanderung in das Transplantat; activation of the complement cascade = Aktivierung des Komplementsystems; chemoattraction = chemotaktisch anziehend; increased adhesion molecules = Anstieg der Adhäsionsmoleküle; vasokonstriction = Vasokonstriktion; tissue injury = Gewebeschaden.

Verfolgt man den mittleren Weg in der Abbildung 1-2, so sieht man wie die Reperfusion zur Wiedererwärmung des Gewebes und so zum Wiedereinsetzen des oxidativen Stoffwechsels und erneuter Wiederaufnahme der ATP Produktion führt (86). Dadurch werden auch im ischämischen reperfundierten Gewebe hochreaktive schädliche Sauerstoffradikale in hoher Konzentration gebildet (40). Der Gewebsschaden entsteht dadurch, dass Superoxidanion ( $O_2^-$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) reagieren und hochreaktive zytotoxische Hydroxyradikale formen, welche zur Lipidperoxidierung der Zellmembran führen und so zu Gewebeschaden führen. Im Gewebe existieren radikalfangende Enzymsysteme, wie die für diese Arbeit bedeutenden Glutathion-S-Transferasen (GST), welche die Zellen unter normalen Umständen vor den freien Sauerstoffradikale schützen (24, 40). Während der Reperfusion aber kommt es durch die starke Anreicherung der Radikale zur Überlastung dieser Schutzmechanismen. Auf diese Weise werden

## Einleitung

durch die Sauerstoffradikale apoptotische Signalwege der Zellen aktiviert, welche in Zelltod und Gewebsuntergang münden (12).

### 1.3.2 Rolle des angeborenen und adaptiven Immunsystems

Nach der Transplantation potenzieren adaptive und angeborene Immunreaktionen den durch die freien Sauerstoffradikale ausgelösten Schaden.

Im Transplantatgewebe, vor allem in den Endothelzellen, werden im Rahmen der IschämieReperfusion verstärkt Chemokine exprimiert, die auf Leukozyten stark chemotaktisch anziehend wirken (siehe Abbildung 1-2 linker unterer Bereich) (23). Beispiele für die Vielzahl im Rahmen der IschämieReperfusion exprimierten Chemokine und Chemokinrezeptoren sind die Gruppen der ELR-CXC Chemokine und das auf neutrophile Granulozyten hochpotent chemotaktisch wirkende Chemokin Interleukin-8 (13, 21, 45, 58, 76, 99). Auch chemotaktisch wirksame Komponenten des Komplementsystems, wie z.B. C5a, führen zur Infiltration mit neutrophilen Granulozyten und somit zu verstärktem IschämieReperfusionsschaden (5, 119).

Seit der Entdeckung von speziellen, die angeborene Immunität mitvermittelnden Erkennungsmolekülen auf der Zelloberfläche, den sogenannten Toll-like Rezeptoren (TLR), blickt man mit neuem Interesse auf die angeborene Immunität (115). Grundsätzlich ist die zentrale Aufgabe der TLR die Erkennung Pathogen-assoziiertes molekularer Muster von mikrobiellen Strukturen. Nach Bindung des jeweiligen Liganden an den korrespondierenden TLR werden Abwehrreaktionen induziert, welche im weiteren Verlauf die Aktivierung von humoraler und zellulärer Immunität steuern. Durch die Aktivierung von TLR kommt es zur Ausschüttung von Zyto- bzw. Chemokinen, wodurch die Expression von im Rahmen von Entzündungsreaktionen auftretenden Membranproteinen gesteigert wird (115).

Der Tierversuch an Mäusen zeigt ebenso die Aktivierung des angeborenen Immunsystems bei renaler IschämieReperfusion (55). *Andrade et al.* ermitteln mit Hilfe von quantitativer real time PCR die Stärke der mRNA Expression der TLRs in Lungengewebsproben, die während der IschämieReperfusion bei menschlicher Lungentransplantation entnommen werden. In den hypotherm konservierten Proben korrelieren die Level der meisten TLR mit denen der Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 und IFN $\gamma$ ) (3). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass Entzündungsreaktionen im Spenderorgan Einfluss haben auf Expression und Aktivität der TLR und umgekehrt die verstärkte Expression und Aktivierung der TLR an der Regulierung der Zyto- und Chemokingenexpression beteiligt ist (73). In einer

## Einleitung

Arbeit über IschämieReperfusionsschaden im Myokard zeigen zwei Linien TLR4 defizienter Mäuse (C57/BL10 SCr und C3H/HeJ) signifikant kleinere infarzierte Stellen im Myokard als die Kontrolllinien (C57/BL10 ScSn und C3H/OuJ) (83). Bei den TLR4 defizienten Tieren zeigt sich auch eine geringere Infiltration mit Neutrophilen, weniger Lipidperoxidation und eine geringere Ablagerung von Komplementfaktoren im Myokard (83). Für diese Arbeit wichtige Ergebnisse zeigen Daten von *Wolfs et al.* (124). Hier wird anhand eines Mausmodells für renale IschämieReperfusion gezeigt, dass die Expression von TLR2 und TLR4 fünf Stunden nach Reperfusion in verschiedenen Zelltypen, die Nierenepithelzellen eingeschlossen, signifikant ansteigt (124). Dies sind nur Beispiele zahlreicher Arbeiten, die darauf hinweisen, dass TLRs und somit das angeborene Immunsystem am IschämieReperfusion-induzierten Organschaden durch ihre proinflammatorische Rolle beteiligt sind und so auch bei der Genese der DGF eine Rolle spielen könnten (73).

Neben den proinflammatorischen Zyto- und Chemokinen, welche während der Entstehung der Sauerstoffradikale und der Lipidperoxidation freigesetzt werden, fördert die verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche des transplantierten Organs die Einwanderung von Leukozyten in das Transplantatgewebe und somit die Aktivierung des adaptiven Immunsystems des Empfängers (108). Unter anderem vermitteln die Adhäsionsmoleküle ICAM1 und VCAM1 (siehe Abbildung 1-2) die Immobilisation der Empfängerleukozyten am Endothel des Transplantats und deren Diapedese durch die Gefäßwand ins Transplantatgewebe (82).

Die in das Transplantat einwandernden Leukozyten schütten zusätzliche Sauerstoffradikale aus und verstärken den am Transplantat entstandenen Schaden (40). Außerdem bilden die in das Transplantat geleiteten Leukozyten in den Tubuli und Gefäßen der transplantierten Niere ein charakteristisches Infiltrat (61). So werden durch sie im Transplantatgewebe Kapillaren blockiert, proteolytische Enzyme gebildet und immer mehr Chemokine freigesetzt (86). Hierzu gehören auch die durch das Endothel im Transplantat freigesetzten vasoaktiven Substanzen Endothelin und Thromboxan (siehe Abbildung 1-2 rechts unten). Sie wirken vasokonstriktorisch auf die Gefäße des Transplantats, weshalb der renovaskuläre Widerstand steigt und die GFR abnimmt (86). Es kommt zur Einengung der vasa recta, die Perfusion der

## Einleitung

peritubulären Kapillaren wird eingeschränkt und die Endothelpermeabilität wird weiter erhöht (8).

Das Resultat des komplexen Zusammenspiels zwischen freien Sauerstoffradikalen, Chemo- und Zytokinen, Komplementfaktoren, Adhäsionsrezeptoren und Leukozyten ist ein inflammatorischer Prozess, der das Transplantatgewebe stark schädigt und so mitverantwortlich für die Entstehung der DGF ist (86).

### **1.4 Risikofaktoren für DGF**

Grundsätzlich lassen sich zwei Gruppen von Risikofaktoren unterscheiden. Zum einen sind das gegebene und nicht modifizierbare Faktoren wie Alter oder Genetik des Spenders. Meist müssen diese als nicht änderbar hingenommen werden, ihre Kenntnis aber bringt Vorteile bei der Vorhersage und Risikoabwägung für das Entstehen einer DGF. Diesen stehen vor allem im Bereich des Transplantationsablaufs und Behandlungsmanagements der Organempfänger modifizierbare Faktoren gegenüber. Die Beeinflussung dieser modifizierbaren Risikofaktoren, verknüpft mit der Kenntnis der gegebenen Faktoren, ist der Ansatzpunkt, um eine drohende DGF abzumildern oder ganz zu verhindern.

#### **1.4.1 Spender assoziierte Risikofaktoren**

Beim Spender zählt das Alter zu den Hauptrisikofaktoren. So zeigt z.B. eine Studie, dass sich das Risiko für DGF verdoppelt, falls der Spender über 55 Jahre alt ist (39). Als Risikofaktor diskutiert werden auch Vorerkrankungen des Spenders wie Diabetes mellitus oder Hypertonie, weibliches Geschlecht und ein erhöhter BMI (85). Auch scheint die Todesursache des Spenders eine Rolle zu spielen. Sowohl ein cerebrovasculäres Ereignis, als auch Anoxie als Todesursache erhöhen das Risiko für DGF (51).

Ebenso ist die Unterscheidung der Spender in *heart beating* und *non heart beating* zu erwähnen. *Non heart beating* Spender haben eine höhere DGF Rate, was hier aber ohne Bedeutung ist, da es sich bei den von uns untersuchten Patienten nur um *heart beating* Spender handelt (43).

Der Einfluss der Genetik des Spenders und Empfängers auf das DGF Risiko wird in Kapitel 1.6 näher erläutert.

### **1.4.2 Risikofaktoren im Rahmen der Transplantation**

Der wohl wichtigste dieser Faktoren ist die kalte Ischämiezeit (CIT). Immer wieder wird bestätigt, dass mit der Dauer dieser auch das Risiko für DGF ansteigt (62). Daten aus dem „US Renal Data System Registry“ weisen z.B. auf eine 23 prozentige Risikoerhöhung für DGF für jede Erhöhung der CIT um sechs Stunden hin (81).

Viele Arbeiten versuchen auch einen Zusammenhang zwischen der Form der Organkonservierung und der DGF zu finden. Studienergebnisse deuten hier auf einen Nachteil der pulsatilen maschinellen Perfusion gegenüber der einfachen Lagerung in Konservierungsflüssigkeit (123). Für diese Arbeit ist das insofern unbedeutend, als bei keiner der Transplantationen eine pulsatile Perfusion durchgeführt wurde. Werden die Organe aber nur in Konservierungsflüssigkeit gelagert, kann auch der Typ der Flüssigkeit einen Einflussfaktor darstellen. In Europa, und somit bei den hier untersuchten Fällen, werden die Lösungen Histidin Tryptophan Ketoglutarat (HTK), University of Wisconsin Lösung (UW) und Eurocollins verwendet.

### **1.4.3 Empfänger assoziierte Risikofaktoren**

Neben vielen anderen diskutierten Faktoren scheinen Form und Dauer der Dialysebehandlung des Organempfängers in der Zeit vor der Transplantation eine Rolle zu spielen. So wirkt sich eine lange Dialysedauer vor der Transplantation negativ aus. Daten, die an einer großen Kohorte von 22776 Patienten erhoben wurden, zeigen auch eine geringere Inzidenz von DGF bei Patienten, die vor der Transplantation mit Peritonealdialyse anstatt Hämodialyse behandelt wurden (105).

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Art des eingesetzten immunsuppressiven Behandlungsregimes. Bei Auftreten oder Drohen einer DGF wird dieses im klinischen Alltag meist angepasst. So wird oft die Gabe von Calcineurininhibitoren reduziert oder verzögert. Alternativ werden neben Steroiden unter anderem Interleukin-2 Rezeptor Antikörper wie Basiliximab verabreicht. Dass sich das positiv auswirken könnte, zeigen Daten von *Fernandez et al.* (26). Außerdem gibt es Hinweise, dass die Behandlung mit dem mTor-Inhibitor Sirolimus zu einer höheren Rate an DGF führt (103). Auch *Smith et al.* beobachteten einen signifikanten Unterschied der DGF Inzidenz in der von ihnen untersuchten Studienpopulation: 25% Wahrscheinlichkeit für DGF in der Gruppe mit Sirolimus-Behandlung stehen 9% in der Gruppe, die nicht mit Sirolimus behandelt wurde, gegenüber. Auch die verabreichte Dosis an Sirolimus

## Einleitung

korreliert hier positiv mit der DGF Inzidenz (104). Andere Arbeiten zeigen, dass Sirolimus enthaltende Behandlungsregime im Vergleich zur Antikörperinduktion mit verzögerter Calcineurininhibitorgabe keine erhöhte DGF Inzidenz verursachen. Dennoch zeigt sich, dass sich bei Sirolimusgabe die Dauer einer eventuell auftretenden DGF Episode verlängert; das Ein-Jahres-Tx-Überleben verschlechtert sich jedoch nicht (69, 70). *Stallone et al.* ermitteln ähnliche Ergebnisse (110). Hier wurde eine Gruppe von Transplantatempfängern mit Basiliximab, MMF und hochdosiertem Cyclosporin behandelt und mit einer mit Basiliximab, Steroiden und niedrig dosiertem Sirolimus behandelten Gruppe verglichen. Auch hier waren die DGF Inzidenz der beiden Gruppen und die Ein-jahres-Transplantatsfunktion ähnlich und die Dauer der DGF in der Sirolimus Gruppe signifikant länger. Ebenso zeigte sich am Tiermodell eine schlechtere tubuläre Regeneration und eine verstärkte Toxizität auf das Transplantatsgewebe in Folge der Gabe von Sirolimus (29).

### **1.4.4 Immunologische Risikofaktoren**

Auch immunologische Variablen haben bekanntermaßen Einfluss auf die Entwicklung der DGF. Ein hohes HLA Mismatch zwischen Spender und Empfänger birgt auch ein erhöhtes DGF Risiko. Weiter wirkt es sich, aufgrund einer möglichen Sensibilisierung des Empfängers, negativ aus, wenn der Empfänger schon vorher ein Organ transplantiert oder vor der Transplantation eine Bluttransfusion bekommen hat (39). So ist die Allosensibilisierung des Empfängers, welche zur hyperakuten Abstoßungsreaktion führen kann, einer der Hauptrisikofaktoren, die die frühe Transplantatsfunktion beeinflussen. Eine Studie zeigt, dass fast alle Patienten (90%) mit mehr als 50% panel reactive antibodies (PRA) vor der Transplantation nach der Transplantation dialysiert werden mussten (77). Verglichen mit 45% bei 10-50% PRA und 27% bei unter 10% PRA ist das eine stark erhöhte Dialyserate (77).

### **1.5 Quantifizieren des Risikos anhand eines DGF-Scores**

Kennt man nun die aufgezählten Risikofaktoren, so besteht im klinischen Alltag dennoch das Problem, das Risiko für eine DGF im Vorfeld einer Transplantation nur schwer konkret abschätzen zu können. *Irish et al.* haben versucht, einen klinischen Punktescore zu erstellen, mit dem es möglich sein soll, das Wissen um die

## Einleitung

Risikofaktoren in eine direkte prozentuale Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer DGF zu übersetzen (51).

Dafür wurden Daten von fast 14000 Patienten aus dem „United States Renal Data System“ bezüglich der Risikofaktoren für DGF untersucht. Aus den sechzehn ermittelten unabhängigen Risikofaktoren von Spendern und Empfängern wurde ein Scoresystem erstellt, bei dem die Risikofaktoren bezogen auf ihre Einflusstärke mit unterschiedlichen Punktwerten eingehen. Der Score soll nun im klinischen Alltag genutzt werden können, um das individuelle DGF Risiko eines Patienten zu ermitteln, indem die aufaddierten Punkte direkt in einen prozentualen Risikowert übersetzt werden. Ziel ist es, anhand des durch den Score ermittelten DGF Risikos die Behandlungs- und Auswahlentscheidungen bei der Nierentransplantation zu erleichtern und zu verbessern (51).

## 1.6 Genetik der DGF

### 1.6.1 Allgemeines

Neben einer Vielzahl unterschiedlicher Faktoren spielen bezüglich Erfolg und Misserfolg einer Nierentransplantation bekanntermaßen auch die genetischen Variationen von Nierenspendern und -empfängern eine Rolle. Sie sind mit der Bestimmung der genetisch bedingten Blutgruppe und des HLA-Musters von Spender und Empfänger fester Bestandteil der Routinediagnostik bei der Nierentransplantation. Vieles spricht dafür, dass noch weitere von der Genetik abhängige Faktoren die Transplantation beeinflussen. Ein Beispiel hierfür ist, dass bei der Nierentransplantation eine starke spenderspezifische Variabilität der Ischämietoleranz beobachtet wird, die bisher nur unzulänglich erklärt ist. Es stellt sich die Frage, ob der Grund für diese unterschiedliche Ischämietoleranz in den Genen des Spenders zu finden ist.

### 1.6.2 Einfluss des Empfängers

Die meisten Untersuchungen erlauben nur die Untersuchung der Erbsubstanz des Empfängers, da üblicherweise die Erbsubstanz aus peripheren Blutzellen des Empfängers gewonnen und untersucht wird. So konnten an der DNA von Transplantatempfängern durchgeführte Studien z.B. eine Verbindung von Transplantationserfolg mit einer Mutation auf dem Gen des Chemokins MCP1

nachweisen (57). Ein weiteres Beispiel ist die Verbindung von Transplantatsverlust und genetisch bedingter Thrombophilie des Transplantatempfängers (27).

### **1.6.3 Einfluss des Spenders**

Ein Transplantat stellt bekanntermaßen ein Kompartiment des Organismus dar, in welchem Pathomechanismen im Gewebe des Spenders und des Empfängers eng miteinander verbunden sind. Folglich erscheint es schlüssig anzunehmen, dass auch die Reaktionen auf Insulte wie der für die Entstehung der DGF entscheidenden IschämieReperfusion nicht nur von der genetischen Prädisposition des Organempfängers, sondern auch von der des Organspenders moduliert werden.

Bekannt ist, dass die Entwicklung einer DGF in direktem Zusammenhang mit der Ischämietoleranz des Spenderorgans steht. Einfluss darauf haben die bekannten Faktoren wie Spenderalter und Dauer der Ischämie (49). Es lässt sich aber eine spenderspezifische Variabilität der Ischämietoleranz beobachten, die bisher nicht zufriedenstellend geklärt werden konnte. Den Hinweis, dass für diese Variabilität der genetische Hintergrund des Spenders verantwortlich sein könnte, geben Arbeiten, die zeigen, dass die Ischämietoleranz von der ethnischen Herkunft des Organspenders abhängt. So zeigt sich beispielsweise in den Arbeiten von *Swanson et al.* und *Cosio et al.*, dass Nieren von afroamerikanischen Spendern ein signifikant schlechteres Tx-Überleben aufweisen als Nieren von kaukasischen Spendern (17, 112). Das würde heißen, dass die genetischen Variationen des Spenders, welche durch eine Veränderung biochemischer Funktionen eine Veränderung der Ischämietoleranz bewirken, somit auch die Funktion von Organen nach der Transplantation beeinflussen.

Das führt zu der Hypothese, dass genetische Variationen des Spenders die Ischämietoleranz und somit auch IschämieReperfusionsschaden und Pathogenese der DGF beeinflussen.

### **1.6.4 Analyse des Auftretens einer DGF in der untersuchten Kohorte auf konkordantes Verhalten der Nieren eines Spenders**

Oft werden die Nieren eines Spenders zwei verschiedenen Empfängern transplantiert. Verhalten sich in der untersuchten Kohorte diese genetisch identischen Nieren konkordant bezüglich der Entwicklung einer DGF obwohl sie Unterschiedlichen Umweltfaktoren unterliegen, bietet das eine gute Möglichkeit grundsätzlichen einen Einfluss der genetischen Variabilität des Spenders abzuleiten.

### **1.6.5 Auswahl und Beschreibung der Polymorphismen**

Für diese Arbeit wurden die im Folgenden vorgestellten Polymorphismen ausgewählt, um neue vermutete Verbindungen zwischen genetischen Variationen des Spenders und der DGF herzustellen. Bei der Auswahl des den Polymorphismus enthaltenden Gens war zunächst wichtig, ob das entsprechende Genprodukt vielversprechend bezüglich der Einordnung in die Pathophysiologie der DGF erschien. Weiter stellte sich die Frage, ob das Gen im Nierengewebe auch ausreichend exprimiert und ob sich außerdem der Genotyp erwiesenermaßen im Phänotyp und somit in der biochemischen Funktion des Genprodukts niederschlägt.

Als Einzelnukleotidpolymorphismen (*SNP/single nucleotide polymorphisms*) bezeichnet man einzelne Nukleotidpositionen im Genom an denen mehr als nur eine Base vorkommen kann. SNP sind zahlreich über das gesamte Genom verteilt, wobei die Mehrzahl von ihnen biallelisch ist, d.h. es gibt zwei mögliche Allele. Sie unterscheiden sich von den selteneren Sequenzvariationen dadurch, dass die Frequenz des selteneren Allels mindestens 1 % beträgt. Ihre Häufigkeit hängt von der genomischen Region und der jeweiligen Population ab und wird auf durchschnittlich einen SNP pro 200 bis 600 Basen geschätzt. Das bedeutet eine sehr große Anzahl von SNP, von denen aber nur ein äußerst geringer Anteil wirklich relevant ist.

So liegt ein Teil dieser SNP auf kodierenden Regionen des Genoms und ist dadurch für genetische Assoziationsstudien interessanter. Von diesen sind besonders die SNP geeignet, die durch Veränderungen der kodierenden Sequenz des Genoms zum Aminosäureaustausch und damit zur Veränderung des exprimierten Proteins führen. Wenn SNP auf nicht kodierenden Regionen, dafür aber in regulierenden Bereichen des Genoms wie einer Promotorregion liegen, eignen sie sich ebenfalls gut für genetische Studien. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen handelte es sich entweder um kodierende Polymorphismen, welche zur Änderung der Aminosäuresequenz führen, oder um Polymorphismen im Bereich der Promotorregion.

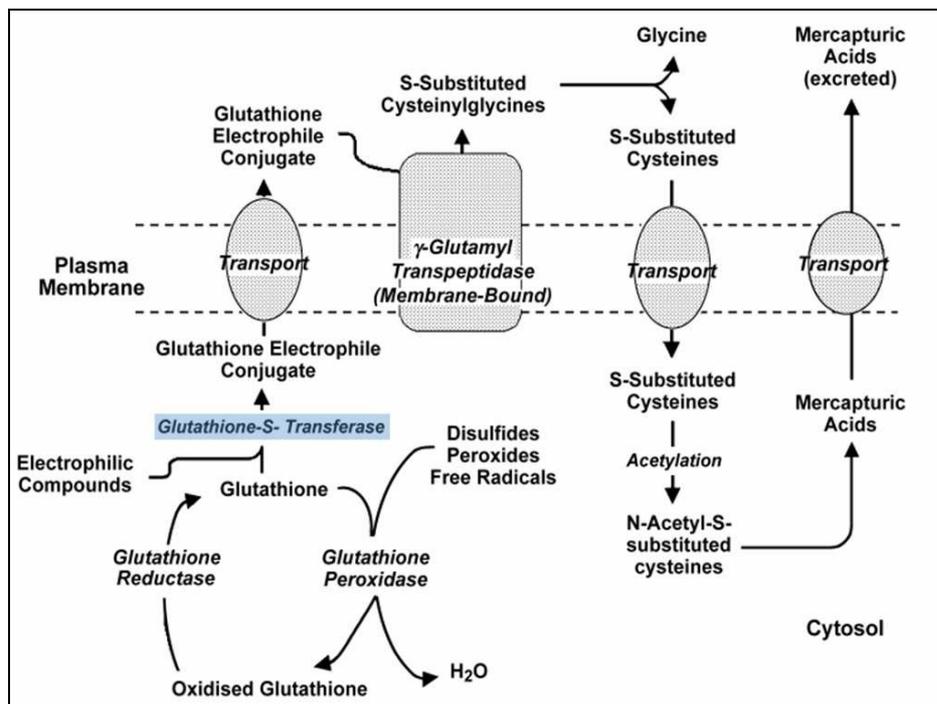
#### **1.6.5.1 Glutathion-S-Transferase M1 (GSTM1): Enzymfunktion, zugehöriges Gen und Polymorphismus**

Die GST sind eine Gruppe von dimeren Enzymen im zellulären Zytoplasma, welche die Konjugation von reduziertem Glutathion mit einer Vielzahl von elektrophilen Verbindungen katalysieren, was deren Ausscheidung über Galle und Urin ermöglicht

## Einleitung

(41). Es werden z.B. elektrophile Verbindungen, wie viele bekannte Karzinogene, aber auch Produkte oxidativen Stresses, wie oxidierte DNA oder Hydroxylipide konjugiert und somit unschädlich gemacht (41).

Abbildung 1-3 veranschaulicht an welcher Stelle im Stoffwechsel der Zelle die GST im Zytosol ansetzen.



**Abbildung 1-3 nach Jefferies et al. (53)** Blau unterlegt: GST; Übersetzung: glutathione = Glutathion; oxidised = oxidiert; electrophile compound s= elektrophile Verbindungen; conjugate = Verbindung; cytosol = Zytosol

Die Abbildung 1-3 blau unterlegte GST nutzt reduziertes Glutathion um elektrophile Verbindungen zu konjugieren. In der Folge können diese aus der Zelle geschleust, weiter abgebaut und so unschädlich gemacht werden.

Folglich spielen die GST eine wichtige Rolle in der Abwehr der Zelle gegen oxidativen Stress und chemisch-toxische Einflüsse.

Die menschlichen zytosolischen GST gehören einer Gruppe von sechzehn Genen an, die in acht verschiedene Klassen unterteilt werden (Alpha, Kappa, Mu, Pi, Sigma, Theta, Zeta, Omega) (41). Viele dieser Enzyme weisen Polymorphismen auf und die Existenz von Isoenzymen in den Unterklassen lässt verschiedene Reaktionen von einzelnen Individuen auf oxidativen Stress annehmen (109).

Auch bei der Entwicklung der DGF könnten die GST aufgrund ihrer Funktion der Kompensation des bei der Ischämie-Reperfusion entstehenden oxidativen Stresses

## Einleitung

eine entscheidende Rolle spielen. Eine Arbeit zeigt durch immunhistochemische Analyse in den proximalen und distalen Tubuli der Niere starke Expression der Mu Klasse der GST (19). Im Rahmen der Nierentransplantation wird eine verstärkte Ausscheidung der GST Untergruppen Alpha und Pi im Urin nach Transplantation beobachtet (87). Im Tierversuch weist eine mit der Verlängerung der Ischämiezeit korrelierende, abnehmende GST Aktivität auf vermehrten GST Verbrauch in der IschämieReperfusionphase hin (20).

Das für diese Arbeit ausgewählte GSTM1 wird im Nierengewebe exprimiert (41). GSTM1 gehört zur Mu Klasse der GST, welche auf Chromosom 1p13.3 liegt. Es werden hier fünf (GSTM1 - GSTM5) verschiedene Isoenzyme unterschieden (41). Für das Gen GSTM1 sind drei verschiedene Ausprägungen bekannt. Eine häufig vorkommende, als *GSTM1\*0* Deletion bezeichnete Gendeletion, umfasst das gesamte GSTM1 Gen (84). Bei einem großen Teil der Bevölkerung liegt ein als GSTM1 Null bezeichneter Genotyp vor, welcher homozygot für diese *GSTM1\*0* Deletion ist (84). Dieser weist eine geringere GSTM1 Enzymaktivität auf (59, 60). Wie häufig diese GSTM1 Null Variante ist, zeigt eine Metaanalyse von 30 Studien, bei der über 10000 Menschen miteinbezogen waren. GSTM1 Null wurde bei 53% (42% bis 62% in den einzelnen Studien) der Menschen mit kaukasischer Abstammung identifiziert, bei Menschen mit asiatischer Abstammung lag GSTM1 Null ähnlich oft vor, bei afroamerikanischer Abstammung war diese mit 27% (16% bis 36 % in den einzelnen Studien) seltener (30).

Liegt das GSTM1 Gen ohne die *GSTM1\*0* Deletion vor, existieren zwei Varianten, die Allele *GSTM1\*A* und *GSTM1\*B* (122). Es handelt sich hierbei um einen Einzelnukleotidpolymorphismus mit G (*GSTM1\*A* Allel ) oder C (*GSTM1\*B* Allel ) an der der Position 534 (122).

*GSTM1\*A* und *GSTM1\*B* führen zur Expression zweier verschiedener GSTM1 Varianten, die an Position 172 den Aminosäureaustausch von Lysin zu Asparagin aufweisen (22, 122). Ein Unterschied dieser beiden Varianten wurde bisher nicht nachgewiesen (122).

Aus verschiedenen Gründen erscheint GSTM1 im Zusammenhang mit der DGF besonders interessant. Über die biologischen Folgen der Polymorphismen der GST gibt es eine Vielzahl von Arbeiten. Sie werden als Risikofaktoren für verschiedene Krebsarten, aber auch für Krankheiten wie Multiple Sklerose oder Asthma diskutiert (109). Der GSTM1 Genotyp beeinflusst die Enzymaktivität von GSTM1. So zeigen

## Einleitung

Untersuchungen am Blut von Patienten mit adenosquamösem Karzinom der Mundhöhle eine niedrigere GSTM1 Enzymaktivität bei homozygoten Trägern der *GSTM1\*0* Deletion gegenüber den Patienten, die zumindest eines oder beide der zwei Wildtypallele *GSTM1\*A* oder *GSTM1\*B* tragen (37).

Die GSTM1 Null Variante wurde am häufigsten als Risikofaktor nachgewiesen (41). Die Datenlage aber ist kontrovers. So zeigen z.B. Studien, dass Patienten mit dem GSTM1 Null Genotyp ein erhöhtes Lungenkrebsrisiko haben (91, 111). Ebenso stellte sich heraus, dass der GSTM1 Null Genotyp ein unabhängiger Risikofaktor für adenosquamöse Karzinome der Mundhöhle ist (14). *Parl et al.* aber haben in einem Review von 500 epidemiologischen Studien die GSTM1 Null Genotyp nicht wie erwartet als konstanten unabhängigen Risikofaktor für Krebserkrankungen nachweisen können (84).

Neben einer für diese Arbeit vermuteten Assoziation des GSTM1 Null Genotyps mit der DGF gibt es auch Hinweise der Bedeutung der *GSTM1\*A* und *GSTM1\*B* Allele bezüglich der Entwicklung einer DGF. So weisen *Peter et al.* in einer Studie an Nierenspendern signifikant niedrigere DGF Raten bei Trägern des *GSTM1\*B* Allels nach (109).

### **1.6.5.2 Toll-like Rezeptor 4 (TLR4): Enzymfunktion, zugehöriges Gen und Polymorphismus**

Bei der Entstehung der DGF lässt vieles eine wichtige Rolle der TLR und somit des angeborenen Immunsystems vermuten (siehe 1.3.2).

TLR4 aus der Familie der TLR wurde 1997 als erstes humanes Homologes des *Drosophila Toll* von Medzhitov et al. entdeckt (71). Die zytoplasmatische Komponente des transmembranen TLR4 Rezeptors und des IL-1 Rezeptors stimmen fast genau überein. Sie weisen auch ähnliche Wege der intrazellulären Signaltransduktion auf, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B und auf diese Weise zur Expression von Genen aus dem Bereich der Entzündungs- und Immunreaktion führen (114).

TLR4 wurde als Rezeptor für Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien identifiziert (73). Neben LPS und anderen exogenen Liganden werden auch endogene Bestandteile wie Hitzeschockproteine HSP60 und HSP70, Fibrinogen, Hyaluronsäure, Heparansulfat oder Fibronectin von TLR4 erkannt (115). Die Expression von TLR4 wird nach dem Kontakt mit bakteriellen Bestandteilen, aber auch nach dem Kontakt mit proinflammatorischen Zytokinen gesteigert (78).

## Einleitung

TLR4 wird auf vielen verschiedenen Zellen exprimiert. Hierzu gehören Zellen des angeborenen Immunsystems wie Mastzellen oder neutrophile Granulozyten, aber auch Epithel- und Endothelzellen (52, 115).

Das Gen für den TLR4 liegt auf Chromosom 9 (9q32-q33) (92). Auf dem TLR4 Gen haben *Arbour et al.* die beiden in dieser Studie untersuchten missense Mutationen A896G (Asp299Gly) und C1196T (Thr399Ile) beschrieben (4). Hierbei handelt es sich um zwei stark gekoppelte Punktmutationen mit einem vom Startcodon aus gerechneten A→G Austausch an Position 896 und einen C→T Austausch an Position 1196. Diese führen zu zwei Aminosäureaustauschprozessen Asp299Gly bzw. Thr399Ile, welche die extrazelluläre Domäne des TLR4 Rezeptors betreffen. Die beobachteten Allelfrequenzen der beiden Mutationen lagen in verschiedenen Kontrollpopulationen zwischen 3 % und 8 % (1, 50, 54, 65, 90, 126). Nur in wenigen Fällen trat eine der Mutationen isoliert auf (50, 54, 90).

In der Arbeit von *Arbour et. al.* zur Stimulation des Atemwegsepithels mit LPS führt die A896G Mutation zu einem kompletten und die C1196T Mutation zu einem partiellen Verlust der Immunantwort auf LPS im Atemwegsepithel (4). Bei für beide Mutationen heterozygoten Patienten wurde am Atemwegsepithel nach Stimulation mit LPS eine verringerte Expression von TLR4 und eine defizitäre Zytokinproduktion beobachtet (4, 97). Diese Arbeit zeigt, dass die A896G Mutation und die C1196T Mutation mit einer Veränderung der Immunantwort durch Einflüsse von außen (hier LPS) assoziiert ist (4). Somit könnten sie auch mit der Entwicklung der DGF assoziiert sein.

### **1.6.5.3 Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): Enzymfunktion, zugehöriges Gen und Polymorphismus**

Unumstritten ist die wichtige Rolle der Chemo- und Zytokine bei der Entstehung der DGF (siehe 1.3.2). Die Expression von Chemokinen und ihren Rezeptoren scheint großen Anteil an der Vermittlung der komplexen Prozesse der Extravasation und der Einwanderung von Leukozyten im Bereich des geschädigten Transplantatgewebes zu haben (79).

Die meisten heute bekannten Chemokine sind Mitglieder einer der beiden Gruppen der CC-Chemokine und der CXC-Chemokine, wobei sie nach der Position der ersten zwei Cysteine in der Aminosäuresequenz ihres Peptids unterschieden werden (36). Chemokine werden von unterschiedlichen Zelltypen sezerniert. Im Nierenparenchym

## Einleitung

produzieren Endothelzellen, Tubulusepithelzellen, Mesangiumzellen und Fibroblasten grundsätzlich oder in Folge von Gewebsschäden Chemokine (95, 120). Das von uns in dieser Studie untersuchte Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP1) gehört der Gruppe der CC-Chemokine an. MCP1 wird in Folge proinflammatorischer Stimuli von einer Vielzahl verschiedener Zelltypen sezerniert, wobei es chemotaktisch anziehend und aktivierend auf Monozyten, aktivierte T Zellen, natürliche Killerzellen und Basophile wirkt (7, 38, 66).

Im Tierversuch an Ratten konnte im Rahmen der akuten Abstoßungsreaktion eine stark verstärkte Expression von MCP-1 im allogenen Transplantat nachgewiesen werden (36). Andere Untersuchungen zeigen erhöhte Werte von MCP1 im Serum und Urin bei nierentransplantierten Patienten während der akuten und chronischen Abstoßungsreaktion (16, 88). In Nierenbiopsien, entnommen in der Reperusionsphase, korreliert die MCP1 Expression positiv mit der Rate der DGF (persönliche Mitteilung nicht veröffentlichter Daten von Dr. Bernd Schröppel).

In der Promotorregion des MCP1-Gens auf Chromosom 17q11 liegt der Polymorphismus MCP1-2518 (94). Es werden die beiden Allele MCP1-2518A und MCP1-2518G unterschieden, welche sich in einem Nukleotidaustausch A→G an Position 2518 des Exons unterscheiden (94). In vitro zeigte sich ein Einfluss des MCP1-2518 Polimorphysmus auf das Level der MCP1-Produktion als Antwort auf Interleukin1 $\beta$ , wobei Träger des MCP1-2518G Allels höhere Level exprimierten (94). Verbindungen zwischen dem MCP1-2518 Polymorphismus und der Ausprägung verschiedener Krankheiten sind das Thema zahlreicher Veröffentlichungen. So zeigte z.B. eine Studie mit HIV infizierten Patienten bei Trägern des MCP1-2518G Allels eine verstärkte Krankheitsprogression und ein höheres Risiko für HIV assoziierte Demenz (35). Klinische Studien deuten z.B. auf eine Verbindung des MCP1-2518 Polymorphismus mit rheumatoider Arthritis, Nephritis bei Patienten mit Systemischem Lupus Erythematodes, oder dem Krankheitsverlauf bei Patienten mit Morbus Crohn hin (34, 42, 56). Auch scheint das MCP1-2518G Allel bei homozygoten Trägern ein genetischer Risikofaktor für Koronare Herzkrankheit zu sein (113).

Den für diese Arbeit interessanten Bezug auf die Nierentransplantation nimmt eine Arbeit über Verbindung des MCP1-2518 Polymorphismus mit dem *outcome* der Nierentransplantation, bei der aber nicht die Nierenspender, sondern die Transplantatempfänger genotypisiert wurden (57). Hier stellte sich heraus, dass Empfänger, welche homozygote Träger des MCP1-2518G Allels waren, in der

## Einleitung

Studienpopulation ein erhöhtes Risiko für frühzeitiges Transplantatsversagen hatten (57).

Der MCP1-2518 Polymorphismus zeigt ethnische Heterogenität: Es wurde eine höhere Frequenz des G-Allels bei Populationen mit asiatischer und mexikanischer Abstammung gegenüber Populationen mit kaukasischer und afrikanischer Abstammung festgestellt (94). Die beobachteten Allelfrequenzen der MCP1-2518G Mutation lagen in verschiedenen kaukasischen Kontrollpopulationen zwischen 21 % und 29 % (28, 42, 57, 94, 113).

## 2 Fragestellung und Zielsetzung

- **Wie häufig ist die DGF bei den untersuchten Transplantationen?**
  
- **Wie relevant ist die DGF für die Studienpopulation?**
  
- **Kann ein modifizierter DGF-Score an diesem Kollektiv verifiziert werden?**
  
- **Kann durch die bisher üblicherweise erhobenen demographischen Daten die DGF für einen individuellen Patienten zufriedenstellend vorhergesagt werden?**
  
- **Liefert das Wissen um genetische Variationen des Spenders in Kombination mit den demographischen Daten eine verbesserte Vorhersage der DGF?**

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Studiendesign**

Um Antworten auf diese konkreten Fragen zu finden, wurden im Rahmen einer prospektiv exploratorischen Studie demographische Daten von Nierenspendern und -empfängern gesammelt und ausgewertet. Des Weiteren erfolgte nach Feststellung des Hirntodes eine Entnahme von Blut des Nierenspenders. Aus dem Blut der Nierenspender wurde die DNA extrahiert, um sie, mittels der PCR Methode mit anschließender Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus(RFLP)–Analyse, auf das Vorliegen von Mutationen hin zu untersuchen, welche mit der Entwicklung der DGF in Verbindung stehen könnten.

Bei der Planung der Studie bestanden verschiedene ethische Bedenken, die im Vorfeld ausgeräumt wurden. Fraglich war, ob durch die zusätzlich zur Organspende durchgeführte Abnahme von Blut zu Studienzwecken die Organspendebereitschaft zurückgehen würde. Im Hinblick darauf wurde auf eine strenge Überwachung der Organspendeaktivität geachtet. Ein weiterer Aspekt war, dass eine genetische Untersuchung des Organspenders auch eine Diagnostik von Erbkrankheiten des Spenders ermöglichen würde. Das würde die Frage aufwerfen, welche Konsequenzen das Wissen um eventuell vorhandene Erbkrankheiten für die betroffenen Familien mit sich bringen würde. Deshalb wurde die Untersuchung des Spenderbluts nur auf nicht hereditäre Erkrankungen eingeschränkt. Nach Absprache und Zustimmung der Deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO), der Deutschen Transplantationsgesellschaft (DTG) und Eurotransplant wurde im April 2005 ein Ethikantrag gestellt.

Die Studie wurde ab 2005 nach Genehmigung des Ethikantrags anhand von postmortalen Organspendern durchgeführt. Es handelte sich ausschließlich um Transplantationen, die über die DSO abgewickelt wurden. Folgende Kriterien wurden als Bedingung zur Studienteilnahme festgelegt.

Einschlusskriterien:

- Feststellung des Hirntods
- Eignung als Organspender
- Zustimmung der Bezugspersonen

Ausschlusskriterien:

technisch unzureichendes Transplantat

Ablehnung einer Studienteilnahme durch Bezugspersonen

Der Einschluss in die Studie blieb für Organspender und Organempfänger ohne therapeutische Konsequenz. Die Zustimmung durch Bezugspersonen erfolgte bei der Aufklärung über die Einwilligung zur Organentnahme.

Bei der Verwaltung der Daten wurde eine irreversible Anonymisierung gewährleistet. Das entnommene Spenderblut wurde ausschließlich unter der von Eurotransplant zugeteilten EDTA-Nummer geführt. Auch die anonymisierten Daten wurden vertraulich behandelt, geltende gesetzliche Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten.

### 3.2 Patientenkollektiv

Für diese Arbeit wurden bis August 2006 erhobene Daten und Genotypisierungsergebnisse der weiterlaufenden Studie ausgewertet. Zu diesem Zeitpunkt standen Daten von 297 Transplantationsvorgängen zur Auswertung zur Verfügung. Hierbei handelte es sich um 297 Transplantationen mit 297 verschiedenen Empfängern, welche die Organe von insgesamt 195 Spendern bezogen.

Zur Erhebung der Spender- und Empfängerdaten wurden zwei verschiedene Formblätter verwendet, auf denen die Daten für die weitere Analyse vermerkt wurden (siehe Anhang). Die benötigten Spenderdaten wurden aus der Datenbank der DSO erhoben. Bei den Empfängern wurde das Formblatt an die verantwortlichen Ärzte des transplantierenden Zentrums geschickt und um Rücksendung gebeten (siehe Anhang).

In der folgenden Tabelle 3-1 sind die Angaben aufgelistet, die bezüglich Spender und Empfänger für diese Arbeit ermittelt und ausgewertet wurden.

**Tabelle 3-1 Erhobene Daten Spender und Empfänger.** In Klammern die zugehörigen Einheiten.

<b>Spender</b>	<b>Empfänger</b>
Alter (Jahren)	Alter (Jahren)
Geschlecht	Geschlecht
Gewicht (kg)	Gewicht (kg)
Ethnizität	Ethnizität

Todesursache (Anoxie oder cerebrovaskulär/ Apoplex)	Kalte Ischämiezeit (Stunden)
	Panel Reactive Antibodies (PRA) (%)
	Gabe eines Calcineurininhibitors
	Gabe eines mTOR-Inhibitors
	Antikörperinduktion
	Anzahl der Dialysebehandlungen
	Kreatininwert 28 Tage post Transplantation ( mg/dl)
	Anzahl der Krankenhaustage

### 3.3 Der modifizierte DGF-Score

Für die in dieser Arbeit untersuchten Transplantationen wurde ein modifizierter DGF-Score gebildet, basierend auf dem DGF-Score von *Irish et al. (51)*.

Das DGF Risiko wird hierbei sowohl bei der originalen als auch bei der für diese Arbeit modifizierten Form des DGF-Scores in zwei Schritten ermittelt.

Die folgende Abbildung 3-1 zeigt den ersten, ins Deutsche übersetzten Teil des klinischen DGF-Scores von *Irish et al. (51)*.

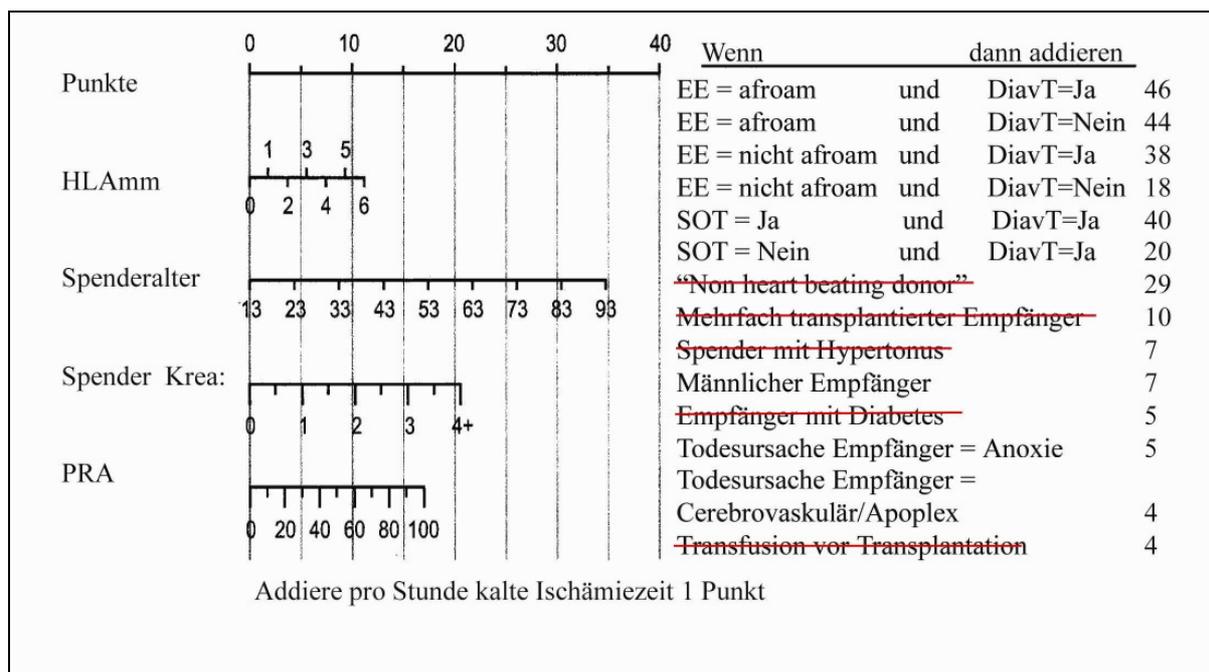


Abbildung 3-1 Formblatt nach *Irish et al. (51)* zur Ermittlung der Punktwerte. Rot durchgestrichen sind die von *Irish et al.* aufgelisteten aber in dieser Studie nicht erfassten Faktoren.

## Material und Methoden

HLAmm = HLA mismatch; Spender Krea = Spender Serum Kreatinin; PRA = Panel Reactive Antibodies; EE = Ethnizität Empfänger; DiavT = Dialysebehandlung vor Transplantation; afroam = afroamerikanisch; SOT = single organ transplant = einfache Transplantation

Grundsätzlich werden im ersten Schritt bekannte Risikofaktoren von Spendern und Empfängern anhand dieses Formblatts in feste Punktwerte übersetzt.

In der rechten Spalte wird einer Eigenschaft oder der Kombination zweier Eigenschaften ein fester Punktwert zugeordnet.

Bei dieser Arbeit gingen die in der rechten Spalte der Abbildung 3-1 rot durchgestrichenen Faktoren nicht in die Berechnung des Scores ein. Die aufgeführten *non heart beating donors* sind wie in 1.4.1 erklärt im untersuchten Kollektiv nicht enthalten. Ob ein Hypertonus beim Spender oder Diabetes mellitus beim Empfänger besteht, ist nur unpräzise zu ermitteln. Das Fehlen der Information schließt diese Erkrankungen nicht aus. Daten zu Mehrfachtransplantation und Transfusion vor Transplantation werden in der derzeitigen ET-Datenbank nicht erfasst. Auch bei anderen Scores finden diese beiden Faktoren keine Beachtung und haben beim DGF-Score nach *Irish et al.* nur einen sehr geringen Effekt auf die Gesamtpunktzahl.

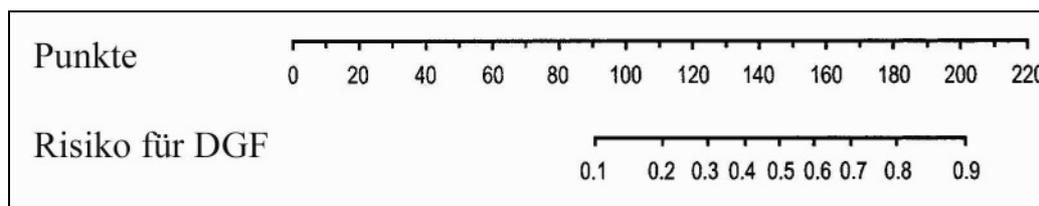
Bei der linken Spalte soll nach *Irish et al.* so vorgegangen werden, dass man die genauen Werte der einzelnen Parameter auf der zum jeweiligen Parameter gehörenden Werteleiste nach rechts verfolgt und dann nach oben hin den zugehörigen Punktwert abliest (51). Das Ablesen und Abschätzen mag für den einzelnen Patienten in der klinischen Anwendung einen guten Punktwert ergeben. Da in dieser Arbeit der Score für eine große Anzahl von Transplantationsvorgängen gebildet wurde, war es wichtig, die einzelnen Parameter zu immer gleichen Bedingungen in feste Punktwerte zu übersetzen. Dafür haben wir für die Parameter in der linken Spalte ein festes Ableseschema aufgestellt. Dabei legten wir für den jeweiligen Maximalwert auf der Werteleiste (z.B. beim Parameter Alter 93 Jahre) einen festen Punktwert fest. Aus diesem Punktwert und dem Maximalwert auf der Werteleiste des jeweiligen Parameters haben wir für jeden der Parameter folgende Formeln zur Berechnung erstellt:

$$\begin{array}{ll} \text{HLAmm} \times 2 & = \text{Punktwert} \\ (\text{Spenderalter} - 13) / 80 \times 35 & = \text{Punktwert} \\ (\text{Spenderkreatinin} / 4) \times 21 & = \text{Punktwert} \end{array}$$

$$(PRA / 100) \times 17 = \text{Punktwert}$$

Außerdem geht die kalte Ischämiezeit (CIT) mit einem Punkt pro Stunde in den Score ein. Hierbei ist zu erwähnen, dass bei dieser Arbeit im Rahmen der multivariaten Analyse unter anderem ein noch weiter modifizierter, die Punkte der kalten Ischämiezeit nicht enthaltender Score, verwendet wurde. Das erscheint plausibel, wenn man bedenkt, dass die kalte Ischämiezeit modifiziert werden könnte, wenn das Risiko für eine DGF erhöht ist. Würde sie mit eingehen, könnte der Score erst nach der Transplantation gebildet werden und der Score wäre klinisch weniger brauchbar. Durch Aufaddieren der Punkte aus der rechten und linken Spalte erhält man schließlich eine feste Gesamtpunktzahl.

Im zweiten Schritt wird mit dieser Gesamtpunktzahl anhand eines einfachen visuellen Rasters das DGF Risiko direkt abgelesen (siehe Abbildung 3-2).



**Abbildung 3-2 Raster zum Ablesen des DGF Risikos nach Irish et al. (51)**

Auch für diesen Schritt wurden zur Analyse der Daten dieser Arbeit einmal feste Werte abgelesen. Tabelle 3-2 zeigt die von uns für bestimmte Punktwertgruppen abgelesenen und festgelegten Prozentwerte.

**Tabelle 3-2 Prozentwerte DGF-Score**

DGF-Score	Prozentwerte
146 -165	50-70%
135 -145	40-50%
110-134	20-40 %
<110	10-20 %

### 3.4 Konkordanzanalyse

Um herauszufinden ob sich in der untersuchten Kohorte die transplantierten Nieren konkordant bezüglich der Entwicklung einer DGF verhielten, wurden als erstes die

## Material und Methoden

Spender der Kohorte ermittelt, deren Nieren zwei verschiedenen Empfängern transplantiert wurden. Zur weiteren Analyse wurden die Transplantationen bei denen die Nieren dieser Spender transplantiert wurden in die drei in Tabelle 3-3 dargestellten Gruppen unterteilt.

**Tabelle 3-3 Einteilung der Spender für Konkordanzanalyse**

Bei beiden Empfängern der Nieren eines Spenders entwickelte sich eine DGF.
Nur bei einem der beiden Empfänger der Nieren eines Spenders entwickelte sich eine DGF.
Bei keinem der beiden Empfänger der Nieren eines Spenders entwickelte sich eine DGF.

## 3.5 Untersuchung der Spenderpolymorphismen

### 3.5.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.5.1.1 Grundsätzliche Vorgehensweise

Die DNA der Nierenspender wurde auf die auf den Genen von GSTM1, TLR4 und MCP1 liegenden Polymorphismen hin untersucht (siehe 1.6.5).

Als Ausgangsmaterial wurde Leukozyten-DNA von Nierenspendern verwendet. Zur Genotypisierung der Polymorphismen wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) mit anschließender Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)-Analyse verwendet. Hierbei wird mittels PCR aus dem Ausgangsmaterial der DNA Abschnitt mit dem Polymorphismus amplifiziert. Diese Produkte wurden anschließend durch ein Restriktionsenzym verdaut, wobei die Schnittstelle nur in einer der möglichen Allelvarianten vorhanden war. Durch elektrophoretische Auftrennung der so entstandenen Restriktionsfragmente konnte man anhand des Bandenmusters im Gel den Genotyp bestimmen. PCR und Restriktionsverdau für GSTM1 wurden im Rahmen der Arbeit neu etabliert, für die anderen Polymorphismen wurde die Methode aus bestehenden Arbeiten übernommen (57, 113, 117). Zur Validierung wurden die GSTM1 Genotypen mittels Sequenzierung durch ein kommerzielles Sequenzierunternehmen bestätigt.

### 3.5.1.2 Isolierung genomischer DNA

Bei Spendern, die die Einschlusskriterien für die Studie erfüllten, und die durch die DSO Bayern transplantiert wurden, wurden in 9 ml EDTA-Röhrchen (S-Monovette® 7,5 ml EDTA, Sarstedt) Blutproben abgenommen. Diese wurden bei der DSO Bayern bei -20 °C zwischengelagert.

Die Isolierung der genomischen DNA aus den gesammelten Blutproben erfolgte mit Hilfe der Aussalzmethode nach Miller (75).

4 ml Vollblut wurden mit 10 ml Ery-Lyse-Puffer in einem 30 ml Cup vorgelegt. Zur Eliminierung der Erythrozyten, welche keine DNA enthalten, wurde 10 ml eines hypotonischen Erythrozytenlysepuffer zugegeben. Nach 15 Minuten Lyse bei Raumtemperatur erhielt man eine lackfarbene Lösung. Anschließend erfolgte die Sedimentation der Leukozyten durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 1500 Upm. Der Überstand wurde verworfen, das Leukozytensediment in 10 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und weitere 10 Minuten lysiert. Danach fand eine erneute Zentrifugation für 10 Minuten bei 1500 Upm statt.

Die Schritte Verwerfen des Überstands, Resuspendierung und erneute Zentrifugation wurden noch ein weiteres Mal wiederholt.

Beim letzten Durchgang wurde der Überstand verworfen. Das verbliebene Leukozytensediment wurde in 2,5 ml Kernlysepuffer durch Auf- und Abpipettieren, sowie durch Mixen auf dem Vortex-Schüttler resuspendiert. Zur Degradation von Membran- und Proteinanteilen wurden SDS (Endkonzentration 1%) und Proteinase K (Endkonzentration 0,2 mg/ml) zugegeben. Diese Mischung wurde über Nacht bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Am nächsten Tag wurden zur Fällung der Protein- und Membranfragmente 750 µl 5M NaCl-Lösung zugegeben und auf dem Vortex Schüttler vermischt. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 4000 Ump wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Der Überstand wurde nun mit 10 ml Ethanol versetzt und langsam vermischt. Jetzt kam es im Röhrchen zum fadenförmigen Ausfallen der DNA. Daraufhin wurde erneut für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgegossen und die verbliebene DNA in 3 ml Ethanol gewaschen. Nach Abgießen des Ethanols und Trocknen der DNA wurde diese in 300 µl TE Puffer gelöst. Die Aufbewahrung erfolgte bei - 20°C in einem Eppendorf Cup.

### 3.5.1.3 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR erlaubt es, eine bestimmte Zielsequenz einer genomischen DNA exponentiell und selektiv zu amplifizieren. Die Methode ist sowohl hoch sensitiv, d.h. wenige Kopien der Zielsequenz reichen als Vorlage aus, als auch sehr spezifisch, da eine selektive Amplifizierung einer spezifischen Sequenz unter Millionen anderer Sequenzen möglich ist.

An die zuvor denaturierte DNA binden sich als Primer zwei, zu je einem der beiden Stränge des DNA-Doppelstrangs komplementäre und mit ihren 3'-Enden aufeinander gerichtete, 21– 31 Basen lange Oligonukleotide. Nun kann eine hitzestabile DNA-Polymerase den zwischen den Primern gelegenen Abschnitt amplifizieren. Das geschieht im Rahmen eines zyklischen Prozesses aus Denaturierung, Primeranlagerung („Primer-Annealing“) und Extension, der so oft wiederholt wird, bis die Zielsequenz zum Nachweis ausreichend vervielfältigt ist.

Konkret wird bei der PCR zuerst eine 5-15 minütige Anfangsdenaturierung je nach verwendeter Taq-DNA Polymerase vorgenommen. Darauf folgen 30-40 Amplifikationszyklen mit Denaturierung bei 94 °C für meist 30 Sekunden, Primeranlagerung bei der für das betreffende Primerpaar optimalen Temperatur für ebenfalls meist 30 Sekunden sowie die Extension bei 72 °C mit einer von der Länge des Amplifikats abhängigen Dauer von mindestens 30 Sekunden. Zum Schluß wird noch eine Endextension bei 72 °C für 10 Minuten durchgeführt, bei der die noch nicht komplett amplifizierten PCR-Produkte vervollständigt werden sollen.

Für die PCR wurde eine Heissstart DNA-Polymerase (HotStarTaq™ DNA-Polymerase, Qiagen) verwendet, welche hitzelabile Schutzgruppen trägt und erst durch eine Inkubation bei 95 °C für 15 Minuten aktiviert wird.

Ein PCR Ansatz besteht aus der als Matrize dienenden Ausgangs DNA, einem PCR Puffer, dNTP-Mix (aus den vier Deoxynukleotidtriphosphaten dATP, dGTP, dCTP, dTTP), den zwei bzw. bei GSTM1 vier verwendeten spezifischen Primern, einer Magnesiumchloridlösung zur Einstellung der durch Austestung ermittelten optimalen  $Mg^{2+}$ -Konzentration, der Taq-DNA-Polymerase und Wasser zur Einstellung des Ansatzvolumens. Bei jedem PCR-Ansatz wird auch eine Negativkontrolle mit Wasser anstatt mit DNA mit angesetzt. Der PCR-Ansatz setzt sich aus folgenden Endkonzentrationen zusammen:

1 × PCR-Puffer

## Material und Methoden

0,2 mM dNTP

0,25  $\mu\text{M}$  der beiden Primer (bei der GSTM1-PCR wurden zwei verschiedene Primerpaare verwendet: 0,1  $\mu\text{M}$  der beiden Albumin Primer und 0,5  $\mu\text{M}$  der GSTM1 Primer)

0,025 U/ $\mu\text{l}$  HotStarTaq DNA-Polymerase

1,5– 4 mM MgCl (siehe Tabelle 3-4)

Diesem Mix wurde 1  $\mu\text{l}$  extrahierte DNA beigemischt.

Bei GSTM1 wurde die passende MgCl<sub>2</sub>-Konzentration durch Austestung ermittelt. Weiter wurde die Anlagerungstemperatur der Primer („Primer-Annealing“) anhand der Schmelztemperatur der beiden Oligonukleotide berechnet, wobei diese in der Regel 5 °C unter der Schmelztemperatur liegt. Zur Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur wurden drei verschiedene (55 °C, 60 °C, 65 °C) Temperaturen getestet.

Für die Typisierung durch die Restriktionsfragmentanalyse wurden Fragmente in Längen von 165 bp bis 234 bp hergestellt. Für GSTM1 wurden die Primer anhand der im National Center for Biotechnology Informations (NCBI) veröffentlichten Gensequenzen ausgesucht. Gegebenenfalls weichen die Primer von der Originalsequenz ab, um Erkennungstellen für ein Restriktionsenzym einzubauen. Die PCR wurde in 10  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen mit 35 Amplifikationszyklen bei einer Extensionszeit von 30 Sekunden durchgeführt.

Die MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen, die Länge der PCR Produkte und die Primer-Annealingtemperaturen sind in Tabelle 3-4 zusammengefasst.

**Tabelle 3-4**

<b>Untersuchte Gene und Polymorphismen</b>	<b>Name des 5'-Primers</b>	<b>Name des 3'-Primers</b>	<b>Produktlänge (bp)</b>	<b>Primer-Annealing T °C</b>	<b>MgCl<sub>2</sub> Konzentration</b>
GSTM1	GSTM1 5'	GSTM1 3'	165 bp	55 °C	1,5 mM
Albumin	ALB1 5'	ALB1 3'	259 bp	55 °C	1,5 mM

TLR4 A896G	TLR4-Nco 5´	TLR4-Nco 3´	188 bp	62 °C	4 mM
TLR4 C1196T	TLR4-399 5´	TLR4-399 3´	124 bp	60 °C	1,5 mM
MCP1-2518	MCP 5´	MCP 3´	234 bp	55 °C	-----

### 3.5.1.4 Die Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus Analyse

Bei Restriktionsendonukleasen handelt es sich um Enzyme, die von Bakterien synthetisiert werden und spezifische DNA Sequenzen erkennen und schneiden. Man unterscheidet drei Typen, wobei am häufigsten die Typ-II-Restriktionsendonukleasen verwendet werden. Sie erkennen meist Palindrome und schneiden an einer genauen Position innerhalb oder neben der Erkennungssequenz. Bei Palindromen handelt es sich um Sequenzen, die mit der Komplementärsequenz identisch sind. Sitzt der Polymorphismus nun auf der Erkennungsstelle eines bestimmten Restriktionsenzym, kann man durch Verdau eines durch PCR amplifizierten Fragments nachweisen, ob diese eine polymorphe Nukleotidposition beinhaltet oder nicht. Gibt es keine geeignete Erkennungsstelle für ein bestimmtes Restriktionsenzym, ist es durch in einzelnen Nukleotiden von der originalen Sequenz abweichende Primersequenzen möglich, in der PCR eine solche einzuführen. Voraussetzung dafür ist, daß in unmittelbarer Nachbarschaft der zu untersuchenden polymorphen Nukleotidposition eine zur Generierung einer Erkennungsstelle passende Sequenz vorliegt, die der Erkennungsstelle für ein bestimmtes Restriktionsenzym ausreichend ähnlich ist. Dabei muß die polymorphe Nukleotidposition Teil der entsprechenden Erkennungsstelle sein. Ebenso muss gewährleistet sein, dass im verwendeten amplifizierten Fragment keine weitere Erkennungssequenz für das Enzym vorhanden ist.

Wie Tabelle 3-5 zeigt, setzt sich der Ansatz eines Verdau zusammen aus bestimmten Mengen eines Puffers, dem spezifischen Restriktionsenzym, bei manchen Enzymen zusätzlich bovines Serumalbumin (BSA) und dem zu verdauenden PCR Produkt.

**Tabelle 3-5**

	Konzentration	Volumen
Restriktionsenzym	5 - 50 U/ $\mu$ l	0,2 – 1,25 $\mu$ l
Restriktionspuffer	10 $\times$	1,25 ml
BSA	100 $\times$	0,125 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O		ad Menge x in $\mu$ l (je nach Menge der anderen Flüssigkeiten)
$\Sigma$		2,5 $\mu$ l
PCR-Produkt		10 $\mu$ l
Endvolumen		12,5 $\mu$ l

Dieser Ansatz wird nun bei einer für das Restriktionsenzym spezifischen Temperatur für mindestens zwei Stunden inkubiert. Tabelle 3-6 listet die spezifischen Verdauenzymen für die einzelnen Polymorphismen auf. Weiter zeigt sie die entsprechenden Endkonzentrationen des Verdauenzym, die verwendeten Restriktionspuffer und die spezifische Restriktionstemperatur.

**Tabelle 3-6**

<b>Polymorphismus</b>	<b>Enzym</b>	<b>Endkonzentration des Enzyms</b>	<b>Restriktionspuffer</b>	<b>Restriktionstemperatur</b>
TLR4 A896G	<i>Nco I</i>	1 U/ $\mu$ l	NEBuffer 4	37 °C
TLR4 C1196T	<i>Hinf I</i>	1 U/ $\mu$ l	NEBuffer 2	37 °C
GSTM1	<i>Xho1</i>	1 U/ $\mu$ l	NEBuffer 2	37 °C
MCP1-2518G	<i>PvuII</i>	1 U/ $\mu$ l	NEBuffer 2	37 °C

Die entstandenen Restriktionsfragmente werden im weiteren Verlauf durch Agaroselektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht.

### 3.5.1.5 Agaroselektrophorese

Mit Hilfe der Agaroselektrophorese werden die einzelnen Fragmente im elektrischen Feld nach ihrer Größe horizontal aufgetrennt. Hierbei wird das Agarosegel in ein Becken mit Pufferlösung eingelegt. Ein Spannungsfeld wird angelegt, wobei sich nun

die DNA-Fragmente mit den negativ geladenen Nukleinsäuren in Richtung der positiv geladenen Anode bewegen. Je kleiner die Fragmente sind, desto schneller laufen sie durch die Poren des Gels. So kann durch den Vergleich mit standardisierten, gleichzeitig aufgetragenen Molekulargewichtsstandards die Größe der Fragmente abgeschätzt werden. Im Agarosegel sichtbar gemacht werden die Fragmentbanden durch den an die DNA bindenden Farbstoff Ethidiumbromid. Dieser Farbstoff wird der Gellösung und dem Laufpuffer beigegeben, nach Bindung mit den DNA-Fragmenten beginnt er unter UV-Licht orange zu fluoreszieren.

Es wird ein Gel mit 2,5 prozentiger Agarosekonzentration verwendet. Das Agarosepulver wird in 200ml oder 250ml 1 × TBE-Puffer durch Aufkochen in einer Mikrowelle vollständig gelöst. Danach werden in die heiße Flüssigkeit 3 µl bzw. 4 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Sigma) untergemischt. Die Gellösung wird nun in einen Gelträger mit vier Kämmen à zwanzig Zähnen gegossen. Nach dem Erkalten und Erstarren der Gellösung werden die Kämmen vorsichtig gezogen und in das mit Laufpuffer (1 × TBE-Puffer mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid) gefüllte Elektrophoresebecken gestellt. Nun wird in die Randspur 20 µl eines 100 bp-Leiter (4 µl Orange G + 2 µl (400 ng DNA) Leiter + 14 µl H<sub>2</sub>O) gegeben, welcher als Größenstandard dient. Die anderen Taschen im Gel werden mit 15-20 µl der DNA-Proben befüllt, die zuvor mit 1/4 Volumen Auftragspuffer gemischt wurden. Nach Anlegen des Spannungsfeldes an das Gelbecken lässt man die Fragmente bis zur gut erkennbaren Auftrennung, ca. 1,5 bis 2 Stunden, im Gel laufen. Ist diese Phase beendet, werden die Gelträger aus dem Becken genommen und unter dem UV-Transilluminator betrachtet und abfotografiert.

### **3.5.2 Typisierung der Polymorphismen**

#### **3.5.2.1 Polymorphismus und Deletion im GSTM1-Gen**

Der untersuchte Polymorphismus liegt auf dem siebten Exon des GSTM1 Gens. Es werden die Allele GSTM1\*A und GSTM1\*B unterschieden, die sich durch den Austausch eines Nukleotids unterscheiden, sowie eine häufige Deletion des gesamten GSTM1 Gens (GSTM1\*0) (84, 98, 122, 125).

Die Nachweismethode wird in der folgenden Abbildung 3-3 beschrieben.

```

                                C
GTCCTTGACCTCCACCGTATATTTGAGCCCAAGGTGCTTGGACGCCTTCCCAAATCTGAAGGA
CTTCATCTCCCGCTTTGAGGTGATGCCCCCATCCTCCTTTCTCTTTGATGCCCTTGTTCCG
TTACCTCCTTTCAGATGTTTTCCCAGTCCTGGAGCTACACACAGAATAACTCGCATGTATTG
    
```

**Abbildung 3-3 Genotypisierung der Polymorphismen GSTM1\*A (G519) und GSTM1\*B (C519) im GSTM1-Gen** Die Primersequenzen für die RFLP-Typisierung sind fett blau. Die unterstrichenen Basen unterscheiden sich von der Originalsequenz und wurden zum Einbau einer Erkennungssequenz für das jeweils geeignete Restriktionsenzym ausgetauscht. Die polymorphe Base ist rot markiert.

Zum Nachweis des Polymorphismus wurde ein 165 bp langes PCR Produkt hergestellt. Durch Änderung von zwei Nukleotiden im 5'Primer wurde eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Xho I* (C/TCGAG) eingeführt. Die Erkennungssequenz aber besteht nur, wenn das GSTM1\*A Allel vorhanden ist (CCCAAG), das macht die Differenzierung zwischen den Allelen GSTM1\*A (G519) und GSTM1\*B (C519) möglich.

Um auch die häufig homozygote GSTM1\*0 Deletion, bei der aufgrund der Deletion kein PCR Produkt entstehen würde, sicher erkennen zu können, wurde als interne Kontrolle immer ein 259 bp großes Stück des Albumin Gens amplifiziert (siehe Abbildung 3-4 ) Lag die GSTM1\*0 Deletion vor, war dieses Fragment das alleinige PCR Produkt. Dieses Fragment wurde nicht verdaut und war deshalb auch noch nach diesem Schritt in voller Länge erhalten.

```

ATTCTGCTTTTATGACTTGCTAGATTTCTACCTACCACACACTCTTAAATGGATAATTC
TGCCCTAAGGATAAGTGATTACCATTTGGTTCAGAACTAGAACTAATGAATTTTAAAAATTA
TTTCTGTATGTCCATTTTGAATTTTCTTATGAGAAATAGTATTTGCCTAGTGTTCATATA
AAATATCGCATGATAATACCATTTTGATTGGCGATTTTCTTTTTAGGGCAGTAGCTCGCCTG
AGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGTGACAGATCTTACCAA
    
```

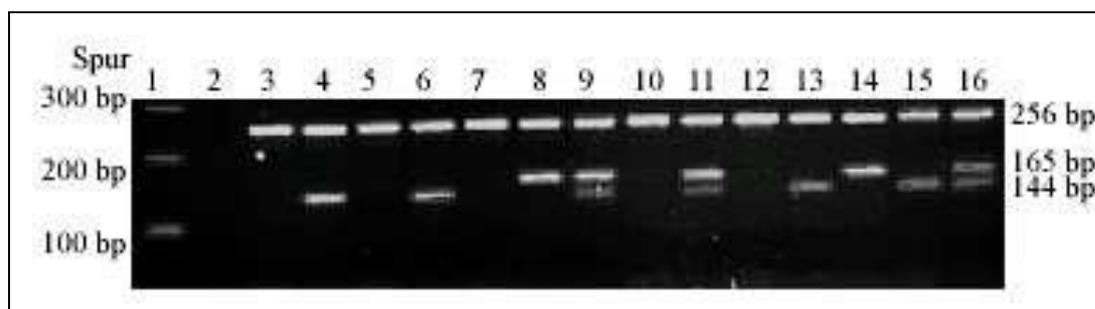
**Abbildung 3-4 ALB-Gen** Die Primersequenzen sind fett blau.

Bei Vorliegen des GSTM1\*A (G519) Allels oder GSTM1\*B (C519) Allels, lieferte die PCR ein weiteres, 165 bp langes Fragment. Beim Verdau des 165 bp langen PCR-Produkts resultierten im Falle des GSTM1\*A (G519) Allels zwei Fragmente mit 21 bp und 144 bp Länge. Lag das GSTM1\*B (C519) Allel vor, fand kein Verdau statt, das 165 bp lange Fragment blieb bestehen.

<b>Genotyp</b>	<b>AA / A0:</b>	drei Fragmente von 259 bp, 144 bp und 21 bp Länge
	<b>BB / B0:</b>	zwei Fragmente von 259 bp und 165 bp Länge
	<b>AB:</b>	vier Fragmente von 256 bp, 165 bp und 144 bp und 21 bp Länge
	<b>00:</b>	ein Fragment von 256 bp Länge

Die verwendete Methode erlaubte keine Unterscheidung zwischen den Genotypen AA und A0, sowie zwischen BB und B0. Nach der Restriktion erfolgte die Auftrennung der amplifizierten und geschnittenen Fragmente in 2,5 prozentigem Agarosegel. Anhand des Bandenmusters wurde der Genotyp ermittelt.

Abhängig vom Genotyp des Nierenspenders ergab sich, wie in Abbildung 3-5 zu sehen, im Agarosegel das folgende Bandenmuster.



**Abbildung 3-5 Nachweis des Polymorphismus im GSTM1-Gen**

Spur 1: 100 bp Leiter

Spur 2: Negativkontrolle

Spur 3, 5, 7, 10, 12 4: Homozygoter Träger der Deletion GSTM1\*0

Spur 4, 6, 13, 15: Homozygoter Genotyp GSTM1\*A (G519) oder heterozygoter Genotyp GSTM1\*A/GSTM1\*0

Spur 8, 14: Homozygoter Genotyp GSTM1\*B (C519) oder heterozygoter Genotyp GSTM1\*B/GSTM1\*0

## Material und Methoden

Spur 9, 11, 16: Heterozygoter Genotyp GSTM1\*A/GSTM1\*B

Die PCR-Produkte wurden durch ein kommerzielles Unternehmen sequenziert und bestätigt.

### 3.5.2.2 Polymorphismen im TLR4-Gen

Im TLR4 Gen wurden die beiden, von *Arbour et al.* beschriebenen Mutationen A896G (Asp299Gly) und C1196T (Thr399Ile) untersucht (4). Die Methode für PCR und Restriktionsverdau wurde von *Török et al.* übernommen (117). Beide Mutationen sind im zweiten Exon des TLR4-Gens gelegen und zeigen ein sehr ausgeprägtes Kopplungsungleichgewicht. Die Nachweismethode wird in Abbildung 3-6 beschrieben.



**Abbildung 3-6 Genotypisierung der Mutationen A896G und C1196T im TLR4-Gen** Die Primersequenzen für die RFLP-Typisierung sind fett blau. Die unterstrichenen Basen unterscheiden

## Material und Methoden

sich von der Originalsequenz und wurden zum Einbau einer Erkennungssequenz für das jeweils geeignete Restriktionsenzym ausgetauscht. Die polymorphen Basen sind rot markiert.

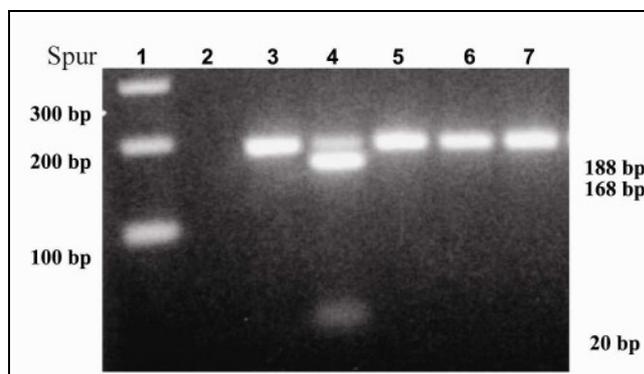
### TLR4 A896G (Asp299Gly)

Für den Nachweis der Punktmutation TLR4 A896G (Asp299Gly) wurde ein 188 bp langes PCR-Produkt hergestellt (siehe Abbildung 3-6). Im 5' Primer wurde durch Austausch eines Nukleotids eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Nco1* eingeführt. Eine Unterscheidung der beiden Allele (896A und 896G) wird dadurch möglich, dass die Erkennungssequenz nur im Fall des G-Allels (CCATG $\overline{\text{G}}$ ) vorhanden ist.

Beim Verdau des 188 bp langen PCR Produkts erhielt man im Falle des G-Allels zwei Fragmente von 168bp und 20 bp Länge. Beim Wildtyp (A-Allel) kam es zu keinem Verdau, das Fragment behielt die Länge von 188 bp.

<b>Genotyp</b>	<b>AA:</b>	ein Fragment von 188 bp Länge: Wildtyp
	<b>GG:</b>	zwei Fragmente von 168 bp und 20 bp Länge: homozygoter Träger der Mutation (auf der Abbildung 3-7 nicht zu sehen)
	<b>AG:</b>	drei Fragmente von 188 bp, 168 bp und 20 bp Länge: heterozygoter Träger der Mutation

Abhängig vom Genotyp des Nierenspenders waren, wie Abbildung 3-7 zeigt, im Agarosegel die folgenden Bandenmuster zu sehen:



**Abbildung 3-7 Nachweis der A896G Mutation im TLR4-Gen.**

Spur 1: 100 bp Leiter

Spur 2: Negativkontrolle

Spur 3, 5, 6, 7: Homozygoter Träger des Wildtyp-Allels (Genotyp AA)

## Material und Methoden

Spur 4: Heterozygoter Träger der Mutation (Genotyp AG)

### C1196T (Thr399Ile)

Die Mutation C1196T (Thr399Ile) wurde durch die Bildung eines 124 bp langen Fragments nachgewiesen (siehe Abbildung 3-6). Das erste Nukleotid der Erkennungssequenz (G) für das Restriktionsenzym *Hinf1* wurde durch eine Sequenzänderung des 5'-Primers (TLR4-399 5') eingeführt. Die Erkennungssequenz, ein unterbrochenes Palindrom (GAN $\overline{\text{T}}$ C), ist nur vorhanden, wenn das Allel 1196T vorliegt (Kästchen).

Mit der PCR wurde ein 124 bp langes Fragment hergestellt, welches den Polymorphismus beinhaltet. Im Falle des Wildtyps (C-Allel) wurde das PCR-Produkt in zwei Fragmente mit 98 bp und 26 bp Länge gespalten. Im Falle des T-Allels wurde das PCR-Produkt nicht gespalten, das Fragment mit der vollen Länge von 124 bp konnte beobachtet werden.

<b>Genotyp</b>	<b>CC:</b>	ein Fragment von 124 bp Länge: Wildtyp
	<b>TT:</b>	zwei Fragmente von 98 bp und 26 bp Länge: homozygoter Träger der Mutation
	<b>CT:</b>	drei Fragmente von 124 bp, 98 bp und 26 bp Länge: heterozygoter Träger der Mutation

Abhängig vom Genotyp waren, wie in Abbildung 3-8 zu sehen, im Agarosegel folgende Bandenmuster zu sehen:

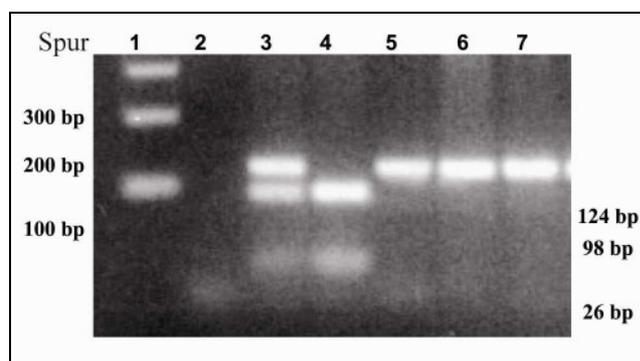


Abbildung 3-8 Nachweis der C1196T Mutation im TLR4-Gen.

Spur 1: 100 bp Leiter

## Material und Methoden

Spur 2: Negativkontrolle

Spur 5, 6, 7: Homozygoter Träger des Wildtyp-Allels (Genotyp 1196CC)

Spur 3: Heterozygoter Träger der Mutation (Genotyp 1196CT)

Spur 4: Homozygoter Träger der Mutation (Genotyp 1196TT)

### 3.5.2.3 Polymorphismus im MCP1-Gen

Im MCP1-Gen wurde der von *Rovin et al.* beschriebene, in der Promotorregion des MCP1-Gens gelegene, Polymorphismus MCP1-2518 untersucht (94). Die Methode für PCR und Restriktionsverdau wurde von *Szalai et al.* übernommen (113). Die Nachweismethode wird in Abbildung 3-9 beschrieben.



**Abbildung 3-9 Genotypisierung des Polymorphismus MCP1-2518 im MCP1-Gen** Die Primersequenzen für die RFLP-Typisierung sind fett blau. Die polymorphe Base ist rot markiert.

Die Amplifikation mit dem MCP1 Primerpaar generierte ein 234 bp langes PCR Produkt. Beim Restriktionsverdau dieses Fragments besteht für das verwendete Restriktionsenzym *PvuII* (CAG/CTG) nur eine Erkennungssequenz, wenn das G Allel vorhanden ist (CAGCT**G**), was eine Differenzierung zwischen den beiden Allelen möglich macht.

Bei der Typisierung des MCP1-2518 Polymorphismus wurde eine PCR mit anschließendem Restriktionsverdau mit dem Enzym *PvuII* durchgeführt. Beim Verdau des 234 bp langen PCR Produkts erhielt man im Falle des G-Allels zwei Fragmente von 159 bp und 75 bp Länge. Beim Wildtyp (A-Allel) kam es zu keinem Verdau, das Fragment behielt die Länge von 234 bp.

<b>Genotyp</b>	<b>AA:</b>	ein Fragment von 234 bp Länge: Wildtyp
	<b>GG:</b>	zwei Fragmente von 159 bp und 75 bp Länge: homozygoter Träger der Mutation
	<b>AG:</b>	drei Fragmente von 234 bp, 159 bp und 75 bp Länge: heterozygoter Träger der Mutation

## 3.6 Statistische Auswertung

### 3.6.1 Allgemeine Voraussetzungen und Vorgehensweise

Bei der vorliegenden Studie wurde unter anderem der Einfluss des Genotyps des Nierenspenders auf die Entstehung einer DGF untersucht. Die Verteilung der Genotypfrequenzen der genotypisierten Nierenspender wurde mit den bei Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes erwarteten Frequenzen verglichen.

Die gesamte statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen Microsoft Office Excel 2003 und SPSS (Version 15.0 und 16.0 für Microsoft Windows XP).

### 3.6.2 Deskriptive Analyse des Gesamtkollektivs

Für die deskriptive Analyse des Gesamtkollektivs wurden Mittelwerte mit Standardabweichung und Mediane gebildet.

### 3.6.3 Hypothesen generierende Statistik

#### 3.6.3.1 Konkordanzanalyse

Chi-Quadrat ( $\chi^2$ )-Test

#### 3.6.3.2 Einfluß der Spendervariablen auf die Entstehung einer DGF

**Univariate Analyse: Einfluss der Spendervariable auf DGF**

Chi-Quadrat ( $\chi^2$ )-Test

**Multivariate Analyse: Einfluss des *GSTM1\*B* Allels auf DGF unter Berücksichtigung anderer Faktoren**

Logistische Regression

### **3.6.3.3 Auswirkung einer DGF auf Variablen nach der Transplantation**

t-Test für unabhängige Stichproben

### **3.6.4 Signifikanzniveau**

Alle Tests wurden zweiseitig auf einem Signifikanzniveau von 5% durchgeführt ( $p \leq 0.05$  = signifikant)

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Beschreibung der Spender

Tabelle 4-1 zeigt die Eigenschaften der 195 untersuchten Spender.

**Tabelle 4-1 Eigenschaften der Spender.** Bei Angabe von Mittelwerten wird die Standardabweichung dahinter in Klammern angeben.

<b>Alter</b>	50,5 ( $\pm$ 16.2) Jahre
<b>Geschlecht</b>	41,5 % weiblich 58,5 % männlich
<b>Gewicht</b>	78,2 ( $\pm$ 16.4) kg
<b>Kreatinin</b>	0,91 ( $\pm$ 0.33) mg/dl
<b>Ethnizität</b>	193 Spender kaukasischer Abstammung 1 Spender thailändischer Abstammung
<b>Todesursache</b>	21 Spender mit Anoxie 60 Spender mit cerebrovaskulärer Todesursache oder Apoplex

### 4.2 Beschreibung der Empfänger

Die 297 analysierten Empfänger zeichneten sich durch folgende Eigenschaften aus.

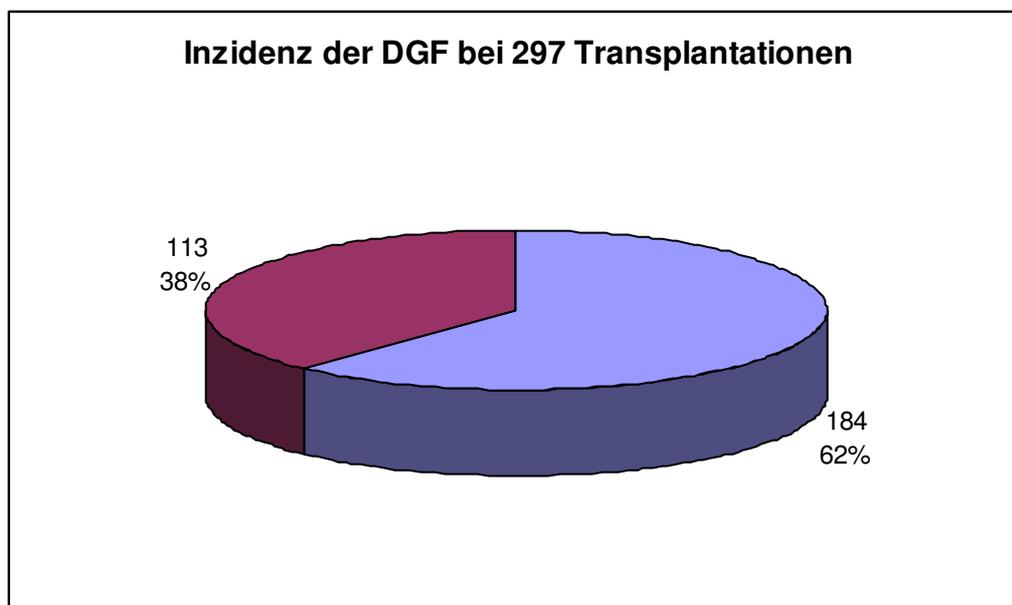
**Tabelle 4-2 Eigenschaften der Empfänger.** Bei Angabe von Mittelwerten wird die Standardabweichung dahinter in Klammern angeben. Falls nicht von allen Empfängern Daten für eine bestimmte Eigenschaft vorlagen, wird die Anzahl der ausgewerteten Empfänger dahinter mit n= angegeben.

<b>Alter</b>	51,17 ( $\pm$ 12.9) Jahre
<b>Geschlecht</b>	39,1% weiblich 60,9% männlich
<b>Gewicht</b>	72,4 ( $\pm$ 12.9) kg
<b>Ethnizität</b>	296 kaukasischer Abstammung 1 spanischer Abstammung
<b>Kalte Ischämiezeit</b>	13,2 ( $\pm$ 5.4) Stunden

<b>PRA</b> (n=228)	bei 9,2% nachweisbar
<b>Calcineurininhibitor</b> (n=242)	verabreicht bei 85,2%
<b>mTOR-Inhibitor</b> (n=216)	verabreicht bei 9,7%
<b>Antikörperinduktion</b> (n=200)	bei 69%
<b>Anzahl der Dialysebehandlungen</b> (n=229)	2,7 (± 4.9)
<b>Kreatininwert 28 Tage post Transplantation</b> (n=234)	2,41 (± 2.1) mg/dl
<b>Anzahl der Krankenhaustage</b> (n=183)	26,8 (± 17.5)
<b>Anzahl der kombinierten Transplantationen Niere und Pankreas</b> (n=257)	16

### 4.3 Häufigkeit der DGF

Die 297 ausgewerteten Transplantationen wurden bezüglich der Entwicklung einer DGF in zwei Untergruppen unterteilt (DGF ja und DGF nein). 113 Transplantationen, bei denen eine DGF auftrat, stehen 184 Transplantationen ohne DGF gegenüber, was eine DGF-Rate von **38%** des Studienkollektivs bedeutet (siehe Grafik 4-1).



**Grafik 4-1 DGF Risiko im Studienkollektiv.** Rot: Anzahl und Prozentsatz der Patienten mit DGF. Blau: Anzahl und Prozentsatz der Patienten ohne DGF.

#### 4.4 Ergebnis der Konkordanzanalyse

Insgesamt wurden bei 129 Spendern des Studienkollektivs beide Nieren entnommen und zwei verschiedenen Empfängern transplantiert. Demzufolge haben 258 Empfänger die Organe dieser Spender erhalten. Diese Spender wurden zur Konkordanzanalyse in folgende Untergruppen unterteilt:

Tabelle 4-3 Spendergruppen für Konkordanzanalyse

Spendergruppen	Beobachtete Anzahl der Spender (n=129)	Beobachtete Fälle von DGF bei Empfängern (n=258)
Gruppe <b>a</b> : Beide Empfänger entwickelten DGF	26	52
Gruppe <b>b</b> : Einer der Empfänger entwickelte DGF	47	47
Gruppe <b>c</b> : Keiner der Empfänger entwickelte DGF	56	0

Hieraus errechnet sich die Häufigkeit einer DGF von  $p = (52+47) \times 100/258 = 38,37\%$ . Die Häufigkeit, dass keine DGF vorlag ist damit  $q = 1-p = 61,63\%$ .

Gäbe es keine Korrelation zwischen den Nieren eines Spenders, würde man folgende Häufigkeiten der Spendergruppen erwarten:

$$\text{Gruppe } \mathbf{a}' = p \times p$$

$$\text{Gruppe } \mathbf{b}' = 2 \times p \times q$$

$$\text{Gruppe } \mathbf{c}' = q \times q$$

Hieraus errechnet sich die in Spalte 2 der folgenden Tabelle 4-4 erwartete Zahl von Spendern in den einzelnen Spendergruppen. Spalte 1 zeigt noch einmal zum Vergleich die tatsächlich beobachtete Anzahl.

Tabelle 4-4 Beobachtete und erwartete Anzahl der Spender

Spendergruppen	Beobachtete Anzahl der Spender (n=129)	Erwartete Anzahl der Spender (n=129)
----------------	--	--------------------------------------

## Ergebnisse

Gruppe <b>a</b> bzw. <b>a'</b> : Beide Empfänger entwickelten DGF	26	19
Gruppe <b>b</b> bzw. <b>b'</b> : Einer der Empfänger entwickelte DGF	47	61
Gruppe <b>c</b> bzw. <b>c'</b> : Keiner der Empfänger entwickelte DGF	56	49

Somit sind a, b, c die beobachteten und a', b' und c' die erwarteten Werte. Führt man den ( $\chi^2$ )-Test durch, ergibt sich eine Signifikanz von **p= 0.03**.

### 4.5 Auswirkungen der DGF auf das Studienkollektiv

Tabelle 4-5 zeigt, was die Entwicklung einer DGF für die untersuchten Empfänger konkret bedeutete. Hierzu wurden die untersuchten Transplantationen in zwei Gruppen, Empfänger mit DGF und ohne DGF, unterteilt. Diese beiden Gruppen wurden nun auf die Parameter Anzahl der Dialysebehandlungen, Kreatininwert 28 Tage post Transplantation und Anzahl der Krankenhaustage nach der Transplantation analysiert. Die drei Parameter wurden ausgewählt, da sie bekanntermaßen durch die DGF stark negativ beeinflusst werden.

**Tabelle 4-5 Auswirkung der DGF.** Bei Angabe von Mittelwerten wird die Standardabweichung dahinter in Klammern angeben. Spalte 1 gibt mit n die Anzahl der Ausgewerteten Empfänger an; Spalte 2 alle Empfänger; Spalte 3 Empfänger mit DGF; Spalte 4 Empfänger ohne DGF; Spalte 6 p-Werte (DGF ja vs. DGF nein) ermittelt mit t-Test für unabhängige Stichproben.

	<b>Alle</b>	<b>DGF ja</b>	<b>DGF nein</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Anzahl der Dialysebehandlungen</b> (n=229)	2,7 (4.9)	6,8 (6.0)	0,3 (0.9)	p< 0.001
<b>Kreatininwert 28 Tage post OP</b> (n=234)	2,41 (2.1) mg/dl	3,65 (2.6) mg/dl	1,72 (1.1) mg/dl	p< 0.001
<b>Anzahl der Krankenhaustage</b> (n=183)	26,8 (17.5)	35,7 (22.3)	20,3 (8.5)	p< 0.001

## Ergebnisse

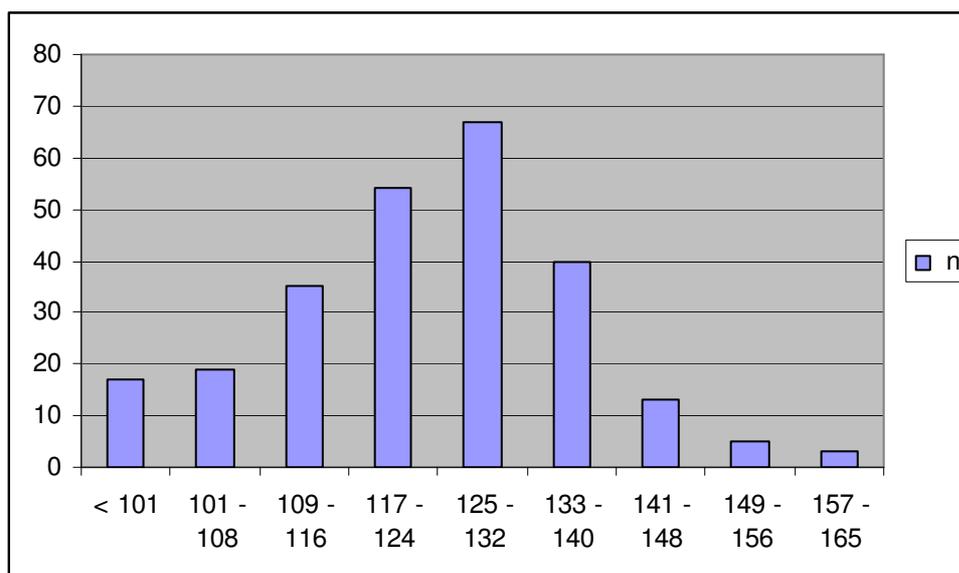
Wie erwartet lagen die Mittelwerte für die drei ausgewählten Parameter bei der Gruppe mit DGF (siehe Spalte 3) weit über denen der Gruppe ohne DGF (siehe Spalte 4). Im Schnitt wurden die Patienten mit DGF nach der Transplantation 6,8 Mal dialysiert, die Gruppe, die keine DGF entwickelte, nur 0,3 Mal. Auch waren die Empfänger mit DGF durchschnittlich mehr als 15 Tage länger im Krankenhaus (DGF ja 35,7 Tage und DGF nein 20,3 Tage). Der Kreatininwert lag, gemessen 28 Tage nach der Transplantation, bei den Empfängern mit DGF mit im Schnitt 3,65 mg/dl um mehr als 2 mg/dl (DGF nein 1,72 mg/dl) höher.

In der Folge zeigte die Betrachtung der Werte mit dem t-Test für unabhängige Stichproben, dass die Gruppe der Empfänger mit DGF signifikant mehr Dialysebehandlungen bekam ( $p < 0.001$ ). Auch der Kreatininwert ( $p < 0.001$ ) und die Krankenhaustage ( $p < 0.001$ ) lagen signifikant höher als bei der Gruppe ohne DGF.

### 4.6 Der modifizierte DGF-Score

Von den 297 untersuchten Transplantationen lagen bei 253 alle Parameter zur Erhebung des modifizierten DGF-Scores vor.

Die folgende Grafik 4-2 teilt den DGF-Score nach Punktwertgruppen ein und gibt an wieviele der untersuchten Transplantationen anhand des für sie ermittelten Punktwerts in die jeweiligen Untergruppen fielen.



**Grafik 4-2** Aufteilung der Transplantationen durch Punktwerte DGF-Score. n = Anzahl der Transplantationen; y-Achse Anzahl der Transplantationen; x-Achse Punktwerte DGF-Score.

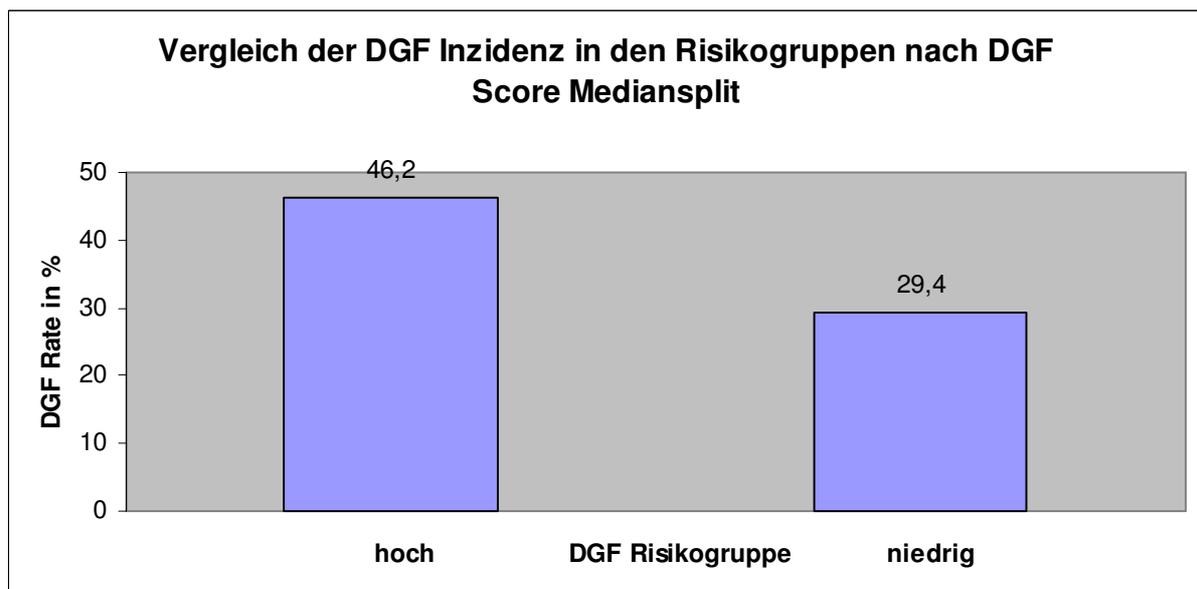
## Ergebnisse

Bei der Analyse der 253 Transplantationen ergab sich ein Mittelwert des DGF-Scores von 123 mit einer Standardabweichung von  $\pm 14.2$  Punkten. Der Median betrug 125 Punkte. Anhand des Medians wurden die Transplantationen in eine Gruppe mit höherem und eine Gruppe mit niedrigerem erwarteten Risiko für DGF eingeteilt ( $> 125$  Punkte und  $\leq 125$  Punkte). Diese Unterteilung in DGF-Score nach Mediansplit wurde in Tabelle 4-6 verwendet, um eine Assoziation zwischen dem DGF-Score und der DGF zu prüfen. Hieraus ergibt sich, dass Patienten der Hochrisikogruppe nach DGF-Score signifikant ( $p= 0.006$ ) häufiger eine DGF entwickeln.

**Tabelle 4-6 DGF-Score Auswirkung auf DGF** 1 Spalte untersuchter Faktor; 2 Spalte Einteilung; 3 und 4 Spalte Aufteilung in 2 Gruppen DGF ja/nein; 4 Spalte p-Wert ermittelt mittels ( $\chi^2$ )-Test.

	Einteilung	DGF		p- Wert
		ja	nein	
<b>DGF-Score nach Mediansplit</b>	$> 125$ Punkte	54	63	<b>p= 0.006</b>
	$\leq 125$ Punkte	40	96	

Grafik 4-3 veranschaulicht die in Tabelle 4-6 aufgelisteten Ergebnisse. In der DGF Hochrisikogruppe nach DGF-Score ( $> 125$  Punkte) war die DGF Inzidenz mit 46,2% um 16,8% höher als in der Niedrigrisikogruppe.



**Grafik 4-3**

## Ergebnisse

Bei der in Tabelle 4-7 gezeigten Auswertung wurde zuerst der DGF-Score nach Punkten in 4 Untergruppen unterteilt (siehe Spalte 1). Für diese Untergruppen wurden die Risikobereiche für DGF nach Abbildung 3-2 abgelesen und festgelegt (siehe Spalte 3). Weiter wurden die 253 untersuchten Transplantationen nach diesen Punktwerten aufgeteilt (siehe Spalte 2) und der Prozentsatz der DGF Fälle in diesen Untergruppen ermittelt (siehe Spalte 4)

**Tabelle 4-7 Beobachtetes und erwartetes Risiko für DGF.** Spalte 1 Punkte nach DGF-Score; Spalte 2 Anzahl der Transplantationen; Spalte 3 erwarteter DGF Risikobereich; Spalte 4 beobachtetes DGF Risiko.

DGF-Score	n	erwartet	beobachtet
146 - 165	11	50 - 70 %	64%
135 - 145	38	40 - 50 %	45%
110 - 134	165	20 - 40 %	36%
< 110	39	10 - 20 %	28%

Für alle 253 Transplantationen wurde ein noch weiter modifizierter DGF-Score gebildet. Für den DGF-Score ohne kalte Ischämiezeit (= DGF-Score ohne CIT) wurde die Gesamtpunktzahl ohne die Punktwerte für die kalte Ischämiezeit berechnet. Es ergab sich ein Mittelwert des DGF-Scores ohne CIT von 111 mit einer Standardabweichung von  $\pm 11.8$  Punkten. Der Median betrug 110 Punkte. Anhand des Medians wurden die Transplantationen in eine Gruppe mit höherem und eine Gruppe mit niedrigerem erwarteten Risiko für DGF eingeteilt ( $> 110$  Punkte und  $\leq 110$  Punkte). Auch hier wurde die Unterteilung in DGF-Score nach Mediansplit vorgenommen, um eine Assoziation zwischen dem DGF-Score und der DGF zu prüfen (siehe Tabelle 4-8) Hieraus ergibt sich, dass wiederum Patienten der Hochrisikogruppe nach DGF-Score ohne CIT signifikant ( $p < 0.001$ ) häufiger eine DGF entwickeln.

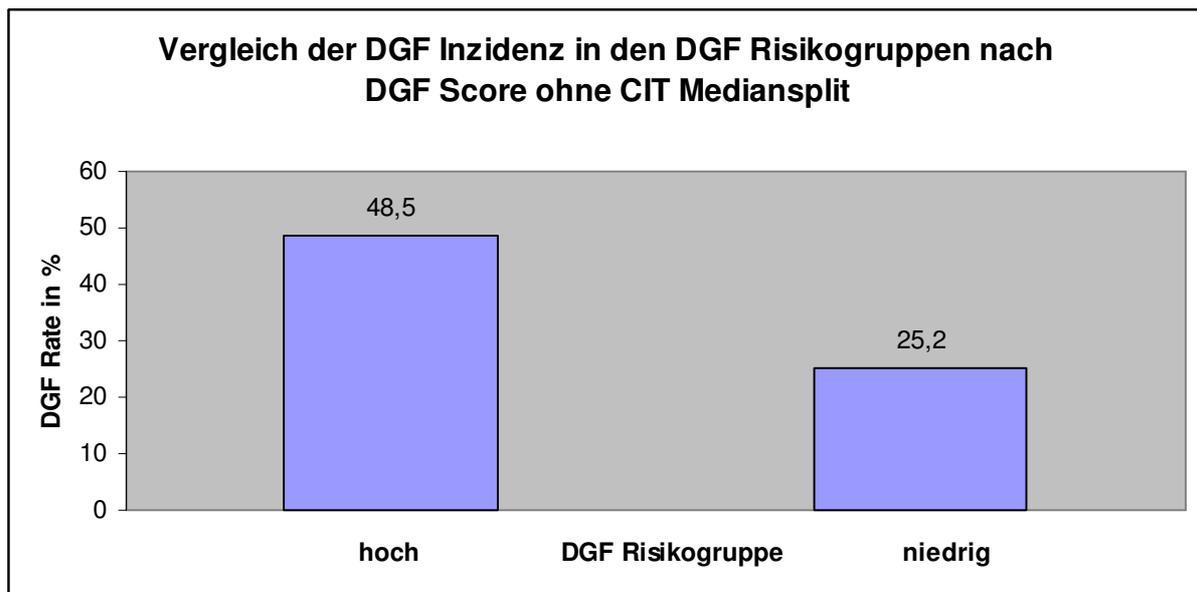
**Tabelle 4-8 DGF-Score ohne CIT Auswirkung auf DGF** 1 Spalte untersuchter Faktor; 2 Spalte Einteilung; 3 und 4 Spalte Aufteilung in 2 Gruppen DGF ja/nein; 4 Spalte p-Wert ermittelt mittels ( $\chi^2$ )-Test.

	Einteilung	DGF		p- Wert
		ja	nein	

## Ergebnisse

<b>DGF-Score</b> <b>CIT</b>	<b>ohne</b>	> 110 Punkte	63	67	<b>p &lt; 0.001</b>
		≤ 110 Punkte	31	92	

In Grafik 4-4 werden die in Tabelle 4-8 dargestellten Ergebnisse noch einmal veranschaulicht. Hier ist zu sehen, dass in der DGF Hochrisikogruppe nach DGF-Score ohne CIT (> 110 Punkte) die DGF Inzidenz mit 48,5%, verglichen mit 25,2% in der Niedrigrisikogruppe, um 23,3% höher war.



Grafik 4-4

### 4.7 Einfluss verschiedener Faktoren auf Entwicklung einer DGF

Tabelle 4-9 zeigt, welche Faktoren bezüglich ihres Einflusses auf die Entwicklung einer DGF bei den Transplantationen untersucht wurden. Jeder der Faktoren wurde in Form einer Vierfeldertafel mit  $\chi^2$ -Test auf DGF ja/nein hin untersucht. Dazu wurden Faktoren, die nicht dichotom und somit in 2 Gruppen vorlagen, in zwei Gruppen eingeteilt. Das Spenderalter wurde nach *Halloran et al.* in die Gruppe > 55 Jahre und ≤ 55 Jahre eingeteilt (39). Die kalte Ischämiezeit wurde in die Gruppen > 8 Stunden und ≤ 8 Stunden gesplittet.

## Ergebnisse

**Tabelle 4-9 Einflussfaktoren DGF.** 1 Spalte untersuchte Faktoren; 2 Spalte Einteilung der untersuchten Faktoren; 3 und 4 Spalte Aufteilung in 2 Gruppen DGF ja/nein; 4 Spalte p-Wert ermittelt mittels ( $\chi^2$ )-Test.

	Einteilung	DGF		p- Wert
		ja	nein	
<b>Spenderalter</b>	> 55 Jahre	58	64	<b>p= 0.005</b>
	≤ 55 Jahre	55	120	
<b>Geschlecht des Spenders</b>	weiblich	49	73	p= 0.530
	männlich	64	111	
<b>Kalte Ischämiezeit</b>	> 8 Stunden	82	128	p= 0.079
	≤ 8 Stunden	10	31	
<b>Calcineurininhibitor</b>	ja	78	129	p= 0.124
	nein	18	17	
<b>mTOR-Inhibitor</b>	ja	3	18	<b>p= 0.017</b>
	nein	80	115	
<b>Antikörperinduktion</b>	ja	58	80	p= 0.126
	nein	19	43	

Spalte 4 der Tabelle 4-9 zeigt, dass das Spenderalter (**p= 0.005**) und die Gabe eines mTOR-Inhibitors (**p= 0.017**) sich bei den untersuchten Transplantationen als signifikante Einflussfaktoren auf die Entwicklung einer DGF erwiesen. Ältere Spender hatten ein größeres Risiko eine DGF zu entwickeln, Patienten bei denen ein mTOR-Inhibitor verabreicht wurde hatten ein geringeres Risiko eine DGF zu entwickeln. Ein Einfluss der Faktoren Geschlecht des Spenders (p= 0.530), kalte Ischämiezeit (p= 0.079), Gabe eines Calcineurininhibitors (p= 0.124) und der Antikörperinduktion (p= 0.126) ließ sich am untersuchten Kollektiv nicht erkennen.

Für die spätere Diskussion wird die Gruppe der Patienten, denen ein mTOR-Inhibitor verabreicht wurde, mit denen, die keinen mTOR-Inhibitor bekommen haben, weiter verglichen. Die Ergebnisse zeigt im Folgenden die Tabelle 4-10. Für die untersuchten Faktoren wurden die Mittelwerte in den jeweiligen Untergruppen mTOR-Inhibitor Gabe ja/nein mit Standardabweichung angegeben.

## Ergebnisse

**Tabelle 4-10 Gabe von mTOR-Inhibitor.** 1 Spalte untersuchte Faktoren; 2 und 3 Spalte Aufteilung in 2 Gruppen mTOR-Inhibitor Gabe ja/nein;

	<b>mTOR-Inhibitor</b>	
	<b>ja</b>	<b>nein</b>
<b>Spenderalter</b>	41,1 (± 18.1)	50,3 (± 16.9)
<b>Empfängeralter</b>	44,1 (± 9.2)	51,9 (± 12.2)
<b>DGF-Score</b>	112,3 (± 15.7)	122,9 (± 15.0)
<b>Kalte Ischämiezeit</b>	11,0 (± 4.2)	13,5 (± 15.9)

## 4.8 Ergebnisse und Auswertung der Genotypisierung der Spender

### 4.8.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Für alle Polymorphismen wurden Berechnungen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes vorgenommen. Da die beobachteten Genotypfrequenzen keine Abweichungen von den erwarteten Frequenzen zeigten, konnte die Aussage getroffen werden, dass sich alle drei Gruppen der Studienpopulation im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befanden und somit systematische Fehler bei der Zusammenstellung der Studienpopulation sowie bei der Typisierung nicht anzunehmen waren.

### 4.8.2 Polymorphismus im GSTM1-Gen

Zum Zeitpunkt der Auswertung lagen Daten der GSTM1 Genotypisierung von 147 Spendern vor. Die PCR für GSTM1 ermöglicht, wie in 3.5.2.1 beschrieben wird, keine Differenzierung zwischen den Genotypen AA und A0, sowie zwischen BB und B0. Tabelle 4-11 stellt die ermittelten Genotypfrequenzen der 147 Spender dar.

**Tabelle 4-11 Spender Genotypfrequenzen des Polymorphismus im GSTM1 Gen**

<b>GSTM1 Genotyp</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Prozent</b>
<b>AA oder AO</b>	33	22,4%
<b>AB</b>	15	10,2%

## Ergebnisse

<b>BB oder BO</b>	48	32,7%
<b>O</b>	51	34,7%
<b>Gesamt</b>	147	

Die Organe dieser Spender wurden insgesamt 232 von uns erfassten Empfängern transplantiert. Das bedeutete 232 Transplantation, bei denen die in der Tabelle 4-12 gezeigte Genotypenverteilung beobachtet werden konnte.

### 4-12 Genotypfrequenzen des Polymorphismus im GSTM1 Gen

<b>GSTM1 Genotyp</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Prozent</b>
<b>AA oder AO</b>	47	20,3 %
<b>AB</b>	23	9,9 %
<b>BB oder BO</b>	79	34,1 %
<b>O</b>	83	35,8 %
<b>Gesamt</b>	232	100,0 %

Tabelle 4-13 zeigt, wie die Verteilung der Genotypen bezüglich des Auftretens einer DGF mit analysiert wurden. Wieder erfolgte eine Einteilung der Transplantationen in die zwei Gruppen der Empfänger mit und ohne DGF.

**Tabelle 4-13 Auswertung GSTM1 Genotypisierung.** 1 Spalte GSTM1 Genotyp. 2 und 3 Spalte Aufteilung in 2 Gruppen DGF ja/nein; 4 Spalte p-Wert ermittelt mittels  $\chi^2$ -Test mit Yates-Korrektur bzw. Fisher's-Exakt-Test.

<b>GSTM1 Genotyp</b>	<b>DGF</b>		<b>(<math>\chi^2</math>)-Test</b>
	<b>ja</b>	<b>nein</b>	
<b>AA oder AO</b>	17	30	p= 0.671 df=3 P= 1.569
<b>BB oder BO</b>	30	49	
<b>AB</b>	7	16	
<b>O</b>	36	47	
<b>Gesamt n= 232</b>	90	142	

Mit Hilfe des ( $\chi^2$ )-Test wurde untersucht, ob einer der GSTM1 Genotypen signifikanten Einfluss auf die Entstehung einer DGF hat. Die Analyse, welche bei

## Ergebnisse

allen 232 Transplantationen vorgenommen wurde, konnte keinen signifikanten Zusammenhang ( $p= 0.671$ ) zwischen dem GSTM1 Genotyp und dem Vorliegen einer DGF nachweisen.

Zur weiteren Analyse wurden in Anlehnung an *ST Peter et al.* die Genotypen in zwei Gruppen, *GSTM1\*B* Allel ja/nein eingeteilt (109). Die Gruppen *GSTM1\*B* Allel ja/nein wurden aus den ermittelten Genotypfrequenzen bestimmt. Jeder Spender der das *GSTM1\*B* Allel trägt (also BB bzw. BO und AB) fiel in die *GSTM1\*B* Allel ja. AA bzw. AO und OO fielen in die Gruppe B Allel nein. *GSTM1\*B* Allel ja/nein war nun ein Faktor der gemeinsam mit denen in der Tabelle 4-14 aufgelisteten Faktoren multivariat analysiert wurde.

**Tabelle 4-14 Faktoren der multivariaten Analyse**

<b>Spenderalter</b>
<b>Empfängeralter</b>
<b>mTOR-Inhibitorgabe ja/nein</b>
<b>DGF-Score</b>
<b>DGF-Score ohne CIT</b>
<b><i>GSTM1*B</i> Allel ja/nein</b>

Für die multivariate Analyse wurde die Hochrisikogruppe nach DGF-Score ohne CIT Mediansplit ( $>110$ ) im Hinblick auf die Entwicklung einer DGF (DGF ja/nein) untersucht. Zum Zeitpunkt der Auswertung standen die Daten für alle in das Modell eingerechneten Faktoren von 194 Transplantationen zur Verfügung. Bei diesen 194 Transplantationen war bei 103 ein DGF-Score ohne CIT von mehr als 110 zu ermitteln. Die Hochrisikogruppe bestand somit aus 103 Patienten.

Abbildung 4-1 zeigt die Ergebnisse der multivariaten Analyse der Hochrisikogruppe.

## Ergebnisse

	Regressions koeffizientB	Standardf ehler	Wald	df	Sig.	Exp(B)
donor age	-,003	,030	,008	1	,928	,997
recipient age	-,002	,024	,008	1	,927	,998
mTOR use	1,281	1,233	1,079	1	,299	3,600
DGF score (w/o CIT)	-,037	,067	,301	1	,583	,964
DGF score	,021	,040	,258	1	,612	1,021
GSTM1 B allele	-1,233	,512	5,799	1	,016	,291
constant	1,336	4,892	,075	1	,785	3,805

**Abbildung 4-1** Spalte 1:donor age = Spenderalter; recipient age = Empfängeralter; mTOR use = mTOR-Inhibitorgabe; DGF-Score (w/o CIT) = DGF-Score ohne CIT; GSTM1 B allele = GSTM1 B Allel;

Die blau unterlegte Zeile der Abbildung 4-1 zeigt, dass das *GSTM1\*B* Allel in der Hochrisikogruppe nach DGF-Score ohne CIT mit einer signifikant geringeren DGF Rate korrelierte (**OR 0.3, CI 95% 0.17- 0.49, p=0.02**).

Grafik 4-5 veranschaulicht noch einmal die DGF Inzidenzen in der Hochrisikogruppe nach DGF-Score ohne CIT und vergleicht diese mit der gesamten Gruppe von 194 Patienten. Grundsätzlich wurden hierfür die Patienten nach ihrem DGF-Score ohne CIT aufgeteilt (siehe x-Achse der Grafik). Tabelle 4-15 zeigt wie viele Patienten die einzelnen Gruppen aufgeteilt nach DGF-Score ohne CIT enthielten (Zeile 4 Tabelle 4-15) und wie sie sich weiter bezüglich eines vorhandenen B Allels aufsplitteten (Zeile 2 und 3 Tabelle 4-15).

**Tabelle 4-15 Aufteilung nach Punkten DGF-Score ohne CIT und GSTM1 B Allel ja nein**

<b>GSTM1 B Allel ja/nein</b>					
<b>Kein B Allel</b>	109	57	43	29	14
<b>B Allel</b>	84	46	35	21	8
<b>Alle</b>	194	103	78	50	22
<b>Score ohne CIT (Punkte)</b>	alle	>110	>115	>120	>125

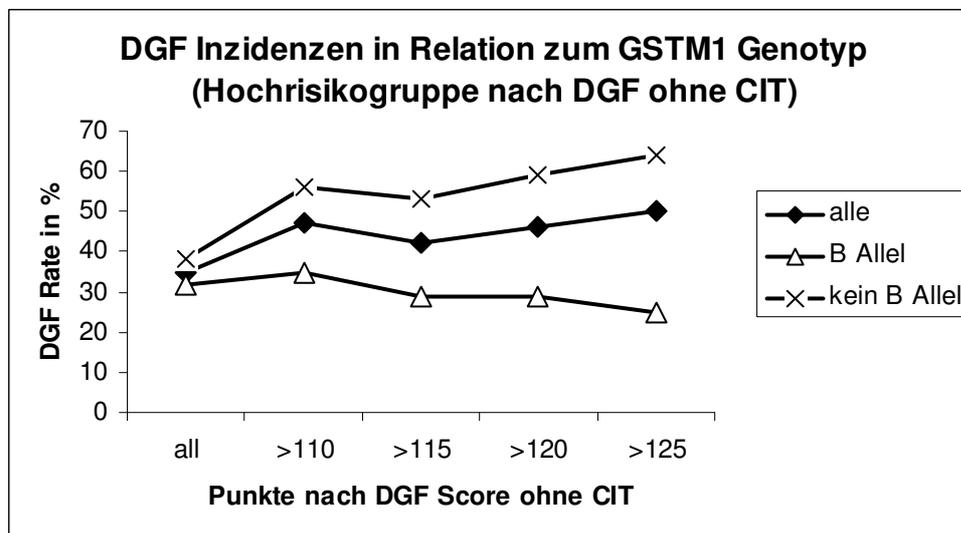
Für die Grafik 4-5 wurden dann wie in Tabelle 4-16 zu sehen die DGF Inzidenzen in den zuvor aufgeteilten Gruppen berechnet.

## Ergebnisse

**Tabelle 4-16 DGF Raten in % in Relation zu GSTM1 Genotyp aufgeteilt in Gruppen nach DGF-Score ohne CIT**

<b>GSTM1 B Allel</b>					
<b>Kein B Allel</b>	38%	56%	53%	59%	64%
<b>B Allel</b>	32%	35%	29%	29%	25%
<b>Alle</b>	35%	47%	42%	46%	50%
<b>Score ohne CIT (Punkte)</b>	alle	>110	>115	>120	>125

Die in Tabelle 4-16 gezeigten DGF Inzidenzen für die einzelnen Gruppen (B Allel, kein B Allel, Alle) werden in Grafik 4-5 veranschaulicht.



**Grafik 4-5**

### 4.8.3 Polymorphismen im TLR4-Gen

#### 4.8.3.1 A896G Mutation (Asp299Gly) im TLR4-Gen

Zum Zeitpunkt der Auswertung lagen Daten der Genotypisierung der A896G Mutation von 122 Spendern vor. Tabelle 4-17 zeigt die bei den Spendern ermittelte Allelfrequenz.

**Tabelle 4-17 Allelfrequenz der A896G Mutation**

<b>Allelfrequenzen Anzahl (%)</b>		
	<b>A</b>	<b>G</b>
<b>Spender (n=122)</b>	223 (91,4%)	21 (8,6%)

## Ergebnisse

Die Organe dieser Spender wurden insgesamt 197 von uns erfassten Empfängern transplantiert. Das bedeutete 197 Transplantation, bei denen die in der Tabelle 4-18 gezeigte Genotypenverteilung beobachtet werden konnte.

**Tabelle 4-18 Genotypfrequenzen der A896G Mutation im TLR4 Gen**

Genotyp der A896G Mutation		
	Anzahl	Prozent
<b>AA</b>	168	85,3 %
<b>AG</b>	27	13,7 %
<b>GG</b>	2	1 %
<b>Gesamt</b>	197	

Tabelle 4-19 zeigt, wie die Verteilung der A896G Genotypen bezüglich des Auftretens einer DGF analysiert wurde. Die Einteilung der Transplantationen erfolgte in die zwei Gruppen der Empfänger mit und ohne DGF.

**Tabelle 4-19 Auswertung der Genotypisierung der A896G Mutation.** 1 Spalte A896G Genotyp. 2 und 3 Spalte Aufteilung in 2 Gruppen DGF ja/nein; 4 Spalte p-Wert ermittelt mittels ( $\chi^2$ )-Test.

Genotyp der A896G Mutation	DGF		$(\chi^2)$ -Test
	ja	nein	
<b>AA</b>	61	107	p= 0.290 df=2
<b>AG</b>	14	13	
<b>GG</b>	1	1	
<b>Gesamt n=197</b>	76	121	

Mit Hilfe des ( $\chi^2$ )-Test wurde untersucht, ob einer der A896G Genotypen signifikanten Einfluss auf die Entstehung einer DGF hat. Die Analyse, welche die gesamten 197 Transplantationen betrachtet, konnte keinen signifikanten Zusammenhang (p= 0.290) zwischen dem Genotyp der A896G Mutation und dem Vorliegen einer DGF feststellen.

## Ergebnisse

### 4.8.3.2 C1196T Mutation (Thr399Ile) im TLR4-Gen

Zum Zeitpunkt der Auswertung lagen Daten der Genotypisierung der C1196T Mutation von 122 Spendern vor. Tabelle 4-20 zeigt die bei den Spendern ermittelte Allelfrequenz.

**Tabelle 4-20 Allelfrequenz der C1196T Mutation**

Allelfrequenzen Anzahl (%)	C	T
	<b>Spender (n=122)</b>	229 ( 93,8%)

Die Organe dieser Spender wurden insgesamt 197 von uns erfassten Empfängern transplantiert. Das bedeutete 197 Transplantation, bei denen die in der Tabelle 4-21 gezeigte Genotypenverteilung beobachtet werden konnte.

**Tabelle 4-21 Genotypfrequenzen der C1196T Mutation**

Genotyp C1196T Mutation	Bei Spendern beobachtet	
	Anzahl	Prozent
<b>CC</b>	169	85,8 %
<b>CT</b>	28	14,2 %
<b>TT</b>	0	
<b>Gesamt</b>	197	

Wieder wurde die Verteilung der Genotypen bezüglich des Auftretens einer DGF analysiert (siehe Tabelle 4-22), wobei die Einteilung der Transplantationen in die zwei Gruppen der Empfänger mit und ohne DGF erfolgte.

**Tabelle 4-22 Auswertung der Genotypisierung der C1196T Mutation.** 1 Spalte C1196T Genotyp. 2 und 3 Spalte Aufteilung in 2 Gruppen DGF ja/nein; 4 Spalte p-Wert ermittelt mittels ( $\chi^2$ )-Test.

Genotyp C1196T Mutation	DGF		$(\chi^2)$ -Test
	ja	nein	
<b>CC</b>	61	108	p= 0.095 df=2
<b>CT</b>	15	13	
<b>TT</b>	0	0	
<b>Gesamt n=197</b>	76	121	

## Ergebnisse

Auch hier wurde mit Hilfe des ( $\chi^2$ )-Test untersucht, ob einer der Genotypen signifikanten Einfluss auf die Entstehung einer DGF hat. Die Analyse, welche alle 197 Transplantationen einschließt, konnte keinen signifikanten Zusammenhang ( $p=0.095$ ) zwischen dem Genotyp der C1196T Mutation und dem Vorliegen einer DGF feststellen.

### 4.8.4 Polymorphismus im MCP1-Gen

Zum Zeitpunkt der Auswertung lagen Daten der MCP1-2518 Genotypisierung von 164 Spendern vor. Tabelle 4-23 zeigt die bei den Spendern ermittelte Allelfrequenz.

**Tabelle 4-23 Allelfrequenz des MCP1-2518 Polymorphismus**

Allelfrequenzen Anzahl (%)		
	A	G
Spender (n=164)	248 ( 75,6%)	80 (24,4%)

Die Organe dieser Spender wurden insgesamt 257 von uns erfassten Empfängern transplantiert. Das bedeutete 257 Transplantation, bei denen die in der Tabelle 4-24 gezeigte Genotypenverteilung beobachtet werden konnte.

**Tabelle 4-24 Genotypfrequenzen des MCP1-2518 Polymorphismus**

MCP1-2518 Genotyp		
	Anzahl	Prozent
AA	145	56,4 %
AG	95	37,0 %
GG	17	6,6 %
Gesamt	257	

Wieder wurde die Verteilung der Genotypen bezüglich des Auftretens einer DGF analysiert (siehe Tabelle 4-25), wobei die Einteilung der Transplantationen in die zwei Gruppen der Empfänger mit und ohne DGF erfolgte.

## Ergebnisse

**Tabelle 4-25 Auswertung MCP1-2518 Genotypisierung.** 1 Spalte MCP1-2518 Genotyp. 2 und 3 Spalte Aufteilung in 2 Gruppen DGF ja/nein; 4 Spalte p-Wert ermittelt mittels ( $\chi^2$ )-Test.

Genotyp	DGF		$(\chi^2)$ -Test
	ja	nein	
AA	55	90	p= 0.897 df=2
AG	39	56	
GG	7	10	
gesamt n= 257	101	156	

Das Vorgehen bei der statistischen Analyse war dasselbe wie bei den anderen untersuchten Polymorphismen. Für MCP1-2518 wurde ebenfalls mittels ( $\chi^2$ )-Test untersucht, ob einer der Genotypen signifikanten Einfluss auf die Entstehung einer DGF hat.

Die statistische Analyse, welche die gesamten 257 Transplantationen betrachtet, konnte keinen signifikanten Zusammenhang (p= 0.897) zwischen dem MCP1-2518 Genotyp und dem Vorliegen einer DGF nachweisen.

## 5 Diskussion

### 5.1 Beschreibung der Studienpopulation

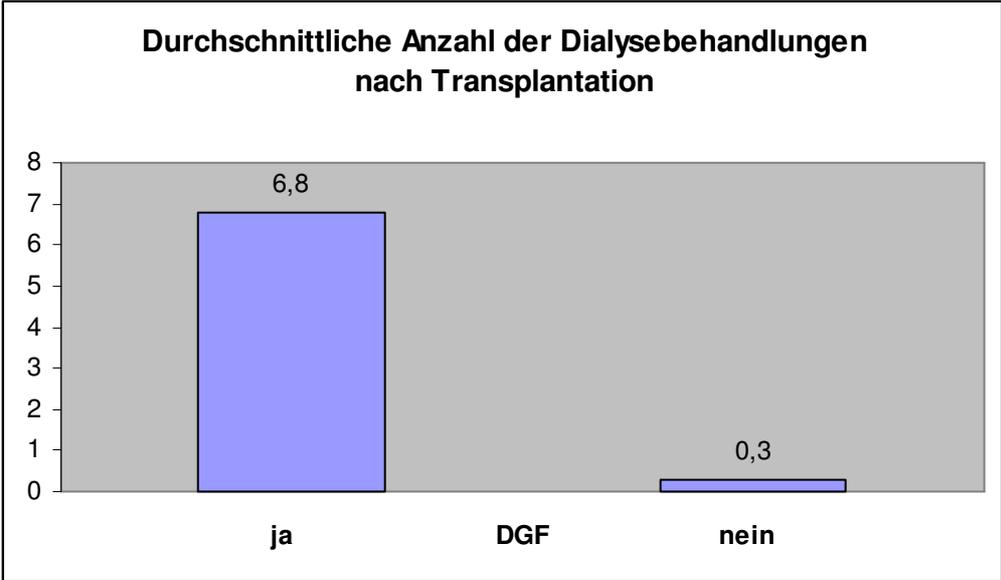
Ein besonderer Aspekt dieser Arbeit ist die hier untersuchte Studienpopulation. Es stand die DNA von 195 Nierenspendern zur genetischen Untersuchung zur Verfügung. Genetische Studien an Organspendern sind seltener als an Organempfängern, da das Rekrutieren dieser Probanden mit größerem Aufwand verbunden ist. Ein weiterer Aspekt ist, dass die Daten bezüglich der DGF zum erstenmal an diesem Kollektiv erhoben wurden.

### 5.2 Häufigkeit der DGF in der Studienpopulation

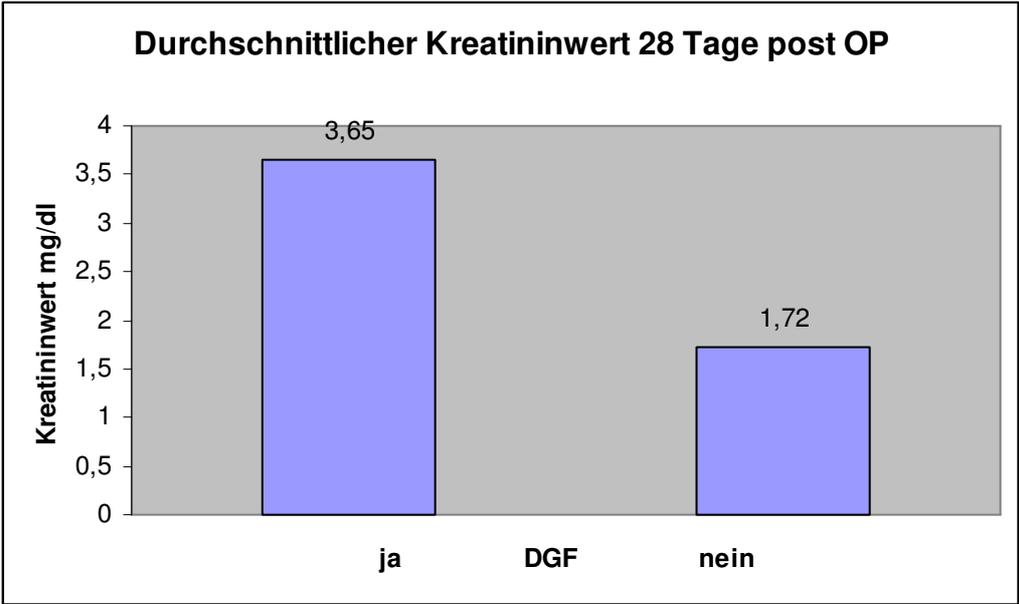
Die ermittelte DGF Rate von **38%** in der Studienpopulation (siehe Grafik 4-1) ist etwas höher als in den zum Vergleich aufgelisteten Arbeiten aus der Tabelle 1-2 (DGF Raten von 15% bis 30%). Die Problematik der Vergleichbarkeit wurde bereits in Kapitel 1.2 erläutert. Gründe wie variierende Definitionen und Unterschiede in den Kollektiven anderer Arbeiten erschweren es die DGF Raten zu vergleichen. Es bleibt aber noch einmal festzuhalten, dass das für diese Arbeit untersuchte Kollektiv ausschließlich aus *HBD* bestand und keine *NHBD* oder Lebendspender miteinschloß. Ohne mit anderen Arbeiten zu vergleichen bestätigt sich aber, dass es sich auch in der Studienpopulation bei der DGF um eine sehr häufig auftretende und somit gewichtige Komplikation handelt.

### 5.3 Relevanz der DGF für die Studienpopulation

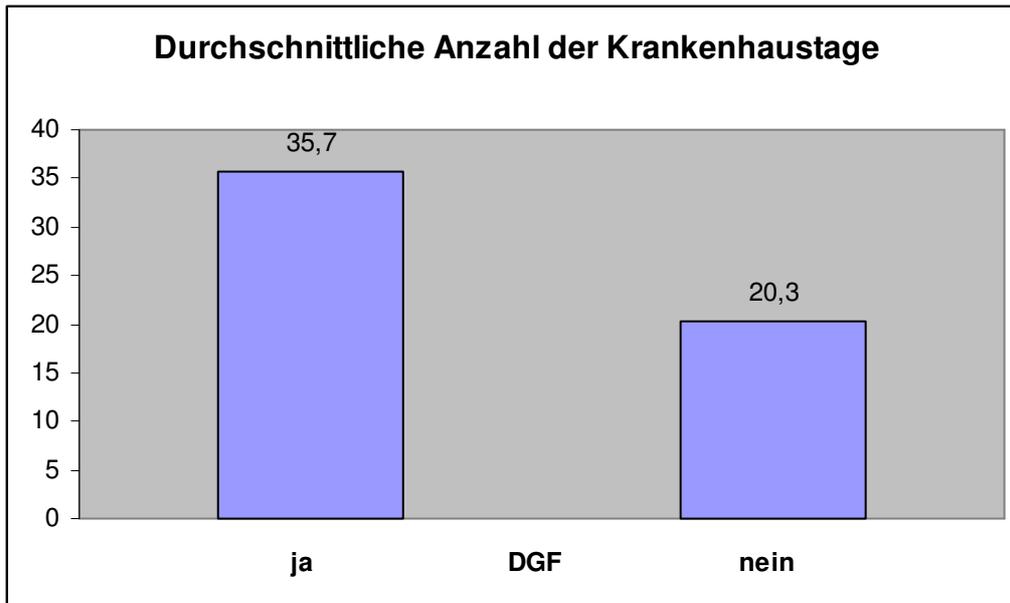
Folglich war es bei der hohen Rate an DGF umso interessanter zu ermitteln, welche konkreten Auswirkungen sich nun für die Empfänger mit einer DGF ergaben. Hierzu sind die Ergebnisse für die Faktoren Anzahl der Dialysebehandlungen, Kreatininwert 28 Tage post OP und Anzahl der Krankenhaustage aus Tabelle 4-5 in Grafik 5-1, Grafik 5-2, Grafik 5-3 noch einmal dargestellt. Der in allen drei Parametern signifikante Unterschied ( $p < 0.001$ ) der Gruppen mit und ohne DGF zeigt sich in den Grafiken noch einmal anhand von konkreten Durchschnittswerten.



Grafik 5-1



Grafik 5-2



Grafik 5-3

Die in Kapitel 1.2 betonte erhöhte Morbidität und die Mehrkosten längerer Hospitalisierung durch die DGF sind auch für das Studienkollektiv anzunehmen, bedenkt man nur die Kosten von einem hier ermittelten im Schnitt 15 Tage längeren Krankenhausaufenthalt und der durchschnittlich fast sieben Dialysebehandlungen bei Patienten mit DGF. *Rosenthal et al.* beschreiben eine im Schnitt zehn Tage längere Hospitalisierung (93). Mit einem durchschnittlich mehr als 15 Tage längeren Krankenhausaufenthalt lag das untersuchte Studienkollektiv sogar deutlich über diesem Wert.

#### 5.4 Ermittelte Punktwerte und Verifizierung des modifizierten DGF-Scores am Studienkollektiv

Nach der in 3.3 beschriebenen Vorgehensweise wurde bei 253 Transplantationen des Studienkollektivs der modifizierte DGF-Score erhoben.

Grafik 4-2 zeigt, wie sich bei den meisten Transplantationen Punktwerte zwischen 110 und 140 ergaben. Veranschaulicht wird das noch einmal durch Tabelle 4-7, in der zu sehen ist, dass mit 165 Transplantationen der Großteil im Bereich von 110 bis 134 Punkten und somit im allgemein erwarteten Risikobereich für DGF von 20- 40% lag.

Konnte nun der modifizierte Score die DGF für das gesamte Studienkollektiv zufriedenstellend vorhersagen?

Die auf das gesamte Studienkollektiv gute Anwendbarkeit des Scores zeigt Tabelle 4-6. Im Studienkollektiv entwickelten Patienten mit nach DGF-Score hohem Risiko, auch signifikant ( $p=0.006$ ) mehr Fälle von DGF.

Verdeutlicht werden diese Ergebnisse auch durch die in Tabelle 4-7 dargestellte Auswertung. Hier wird das Studienkollektiv durch die mit dem DGF-Score ermittelten Punktwerte in vier Risikogruppen unterteilt. Es zeigt sich, dass für jede der vier Gruppen der beobachtete Prozentsatz an Fällen von DGF im vom DGF-Score erwarteten Bereich lag. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass der modifizierte DGF-Score auch für die hier untersuchten Transplantationen gut zutreffende DGF Raten vorhergesagt hat.

### **5.5 Einfluss verschiedener demographischer Faktoren auf die Entwicklung einer DGF am Studienkollektiv**

Wie der Tabelle Tabelle 4-9 zu entnehmen ist, war auch das Spenderalter im Studienkollektiv ein erwarteter signifikanter Einflussfaktor ( $p= 0.005$ ). In der nach *Halloran et al.* definierten Gruppe der Spender mit einem Alter von über 55 Jahren entwickelten fast die Hälfte dieser transplantierten Nieren in der Folge eine DGF, verglichen mit weniger als einem Drittel bei den Patienten unter 55 Jahren (39).

Ein Effekt bezüglich des Spendergeschlechts konnte nicht ( $p= 0.530$ ) festgestellt werden. Auch die kalte Ischämiezeit (CIT) brachte entgegen den Erwartungen keinen signifikanten Effekt bezüglich der DGF Inzidenz ( $p= 0.079$ ).

Bemerkenswerte Ergebnisse ergaben sich bei der Art der immunsuppressiven Therapie. Ob ein Calcineurininhibitor verabreicht wurde oder nicht hatte keinen signifikanten Einfluss auf die DGF Inzidenz ( $p= 0.124$  siehe Tabelle 4-9). Auch ob eine Antikörperinduktion durchgeführt wurde, blieb für das Studienkollektiv ohne Auswirkung. Was jedoch die Behandlung mit mTOR-Inhibitoren betrifft, zeigte sich für die Gruppe, welche mit einem mTOR-Inhibitor behandelt wurde, eine signifikant niedrigere DGF Rate ( $p= 0.017$ ). Wie in 1.4.3 beschrieben, lassen viele Studien wie von *Smith et al.* und *Simon et al.* bei Patienten mit mTOR-Inhibitor Therapie eine höhere Rate von DGF und somit das Gegenteil vermuten (103, 104). Nachdem also kein protektiver Effekt bezüglich der DGF Entstehung durch die Gabe eines mTOR-Inhibitors wie Sirolimus zu vermuten war, stellte sich die Frage, warum im Studienkollektiv bei den 21 Patienten, die mit einem mTOR-Inhibitor behandelt wurden, nur in drei Fällen eine DGF auftrat (29).

Zunächst einmal wurde im untersuchten Kollektiv in insgesamt nur 9,7% der Fälle (21 von 216 Patienten siehe Tabelle 4.2) ein mTOR-Inhibitor verabreicht. Das erklärt sich wohl unter anderem dadurch, dass grundsätzlich die negativen Effekte von Sirolimus bezüglich der Entwicklung einer DGF bekannt sind und man es deshalb nur selten unmittelbar mit der Transplantation einsetzt. Bei welchen Patienten aber wurde dennoch ein mTOR-Inhibitor eingesetzt? Blickt man auf die Tabelle 4-10 so sieht man, dass die Patienten, die einen mTOR-Inhibitor erhielten, im Schnitt um fast acht Jahre jünger waren. Auch die Nierenspender in dieser Gruppe waren im Schnitt mehr als neun Jahre jünger und die transplantierten Nieren hatten eine dreieinhalb Stunden kürzere Ischämiezeit als die Gruppe von Patienten, die keinen mTOR-Inhibitor erhalten hatte. Vor allem aber der DGF-Score, in den bekanntermaßen noch weitere Faktoren eingehen, war in der mTOR-Inhibitor Gruppe mit 112,3 ( $\pm$  15.7) Punkten durchschnittlich um mehr als 10 Punkte (122,9 ( $\pm$  15.0)) niedriger als in der Gruppe ohne mTOR-Inhibitor Gabe. Diese Zahlen lassen annehmen, dass im klinischen Alltag nur den Patienten ein mTOR-Inhibitor verabreicht wurde, für die man mit Hilfe eines Scores oder der gängigen Risikofaktoren auf ein nur geringes DGF Risiko geschlossen hat und man sich deshalb die Gabe eines mTOR-Inhibitors „erlauben“ konnte. Das legt die Hypothese nahe, dass die mTOR-Inhibitor Gabe nicht der Grund für die geringe Anzahl an Fällen von DGF in der mTOR-Inhibitor Gruppe des Studienkollektivs, sondern eher die Konsequenz einer vorher durchgeführten Risikoabschätzung für DGF ist. Diese Einschätzung eines geringen DGF Risikos scheint also für die individuellen Patienten dieser Gruppe so gut zu funktionieren, dass selbst nach der sich eigentlich negativ auswirkenden Gabe eines mTOR-Inhibitors nur 3 von 21 Patienten eine DGF entwickeln.

### **5.6 Individuelles Risiko für die Entstehung einer DGF**

5.4 zeigt, dass auf das ganze Studienkollektiv bezogen der DGF-Score auch in der hier modifizierten Form gut reproduzierbar war. Es stellt sich aber weiterhin die Frage, wie gut die Vorhersage durch Risiko-Scores für einen individuellen Patienten ist und inwieweit der Score bezüglich des Behandlungsmanagements des einzelnen Patienten von Nutzen ist.

Heute ist bekannt, dass im klinischen Alltag anhand einzelner demographischer Parameter oder mit klinischen Scores das DGF Risiko für den individuellen Patienten abgeschätzt wird und diese Erkenntnisse in die Behandlung der Organempfänger mit

einfließen. Für Transplantationen, bei denen ein geringes Risiko abgeschätzt wird, scheint das klinisch gut zu funktionieren. Das bestätigte auch die in 5.5 veranschaulichte Auswertung bezüglich der Gabe von mTOR-Inhibitoren am untersuchten Studienkollektiv. Der DGF-Score scheint hier Patienten mit geringem Risiko gut herausgefiltert zu haben und wirkte sich auch konkret auf die Behandlungsentscheidung aus (Gabe eines mTOR-Inhibitors ja/nein).

Patienten mit mittlerem bis hohem Risikoindex stellen die größere Gruppe des Studienkollektivs. Welche therapeutische Konsequenz ergibt sich für Patienten mit mittlerem bis hohem Risiko-Index? Betrachtet man die nach DGF-Score eingeteilte Hochrisikogruppe von Patienten, so konnte man in dieser Gruppe tatsächlich auch sehr hohe DGF Inzidenzen feststellen (46,2% in der Hochrisikogruppe nach DGF-Score und 48,5% in der Hochrisikogruppe nach DGF-Score ohne CIT, siehe Grafik 4-3 und Grafik 4-4).

Es wäre außerordentlich hilfreich auch bei mittlerem bis hohem Risiko-Index für DGF weitere Faktoren zu finden, die eine genauere Vorhersage der DGF ermöglichen und folglich helfen würden das Behandlungsmanagement der Transplantation in diesen Fällen zu verbessern.

## **5.7 Genotypisierung des Spenders**

### **5.7.1 Relevanz der Genetik des Spenders**

Ein wichtiger Ansatzpunkt liegt darin, ob das Wissen um genetische Variationen des Nierenspenders in Kombination mit den demographischen Daten eine verbesserte Vorhersage der DGF ermöglichen könnte.

Zum jetzigen Zeitpunkt weisen Arbeiten zur Ethnizität des Nierenspenders auf einen Einfluss der Genetik hin. Nieren afroamerikanischer Spender haben ein schlechteres Tx-Überleben als Nieren kaukasischer Spender (17, 112).

Der große Vorteil gegenüber genetischen Risikofaktoren des Empfängers wäre, dass genetische Risikofaktoren bezüglich des Spenders schon vor der Transplantation ermittelt werden können. So wäre es möglich, das Risiko einer DGF schon vor der Transplantation besser vorherzusagen. Das würde z.B. erlauben, bei Ermittlung eines hohen Risikos modifizierbare Risikofaktoren der DGF, wie die kalte Ischämiezeit, darauf abzustimmen. So könnte man bei erhöhtem DGF Risiko aufgrund der Genetik des Spenders versuchen, die CIT zu minimieren.

### **5.7.2 Konkordantes Verhalten der Nieren in der untersuchten Kohorte**

In der Gruppe der Spender des Studienkollektivs deren Nieren zwei verschiedenen Empfängern transplantiert wurden, zeigten die Nieren ein signifikant konkordantes Verhalten bezüglich der Entwicklung einer DGF ( $p= 0.03$ ). Das lässt auch für das untersuchte Kollektiv einen Einfluss der genetischen Variabilität des Spenders vermuten.

### **5.7.3 Aufbau und Ausgangspunkte des genetischen Teils der Studie**

Beim genetischen Teil dieser Arbeit handelt es sich um eine Assoziationsstudie. Im Falle der untersuchten DGF, ein Krankheitsbild mit multifaktorieller Ätiologie und komplexem genetischen Hintergrund, stellen Assoziationsstudien einen Ansatz zur Suche krankheitsrelevanter Gene dar. Die Assoziationsstudie soll klären, ob bestimmte Polymorphismen mit dem untersuchten Krankheitsbild assoziiert sind. Dazu werden mittels statistischer Tests bei den untersuchten Polymorphismen die Genotypfrequenzen der Patienten, welche das Krankheitsbild ausprägen mit den Frequenzen derer, die das Krankheitsbild nicht ausprägen, verglichen.

Bei den untersuchten, auf diesen Genen liegenden Polymorphismen handelte es sich zum einen um kodierende Polymorphismen, welche zu Änderung der Aminosäuresequenz führen. Dies ist der Fall beim Polymorphismus im GSTM1 Gen und bei den beiden Polymorphismen A896G (Asp299Gly) und C1196T (Thr399Ile) im TLR4-Gen. Der Polymorphismus MCP1-2518 liegt in der Promotorregion des MCP1-Gens und somit nicht in einem kodierenden, sondern genregulierenden Bereich.

Für jeden dieser Polymorphismen wurden funktionelle Auswirkungen beschrieben.

Somit eignen sich die untersuchten Polymorphismen sehr gut für die Untersuchung einer möglichen Assoziation dieser Gene mit der DGF.

In dieser Arbeit wurden 195 Spender, deren Organe 257 Empfängern transplantiert wurden, eingeschlossen. Diese 195 Spender, deren DNA extrahiert wurde und die zur Genotypisierung der verschiedenen Polymorphismen bereitstanden, waren bis auf einen Spender mit thailändischer Abstammung allesamt kaukasischer Herkunft.

## 5.7.4 Bewertung der Ergebnisse der Genotypisierung im GSTM1-Gen

### 5.7.4.1 Vergleich der GSTM1 Genotypfrequenz der Studienpopulation

Für den Polymorphismus im GSTM1 Gen war es mit der hier verwendeten Methode nicht möglich, heterozygote von homozygoten Individuen zu unterscheiden (*GSTM1*\*AA und AO oder *GSTM1*\*BB und BO).

Sicher zu identifizieren war der GSTM1 Null Genotyp (homozygot für *GSTM1*\*0 Deletion). Eine gute Möglichkeit zum Vergleich der Genotypen erlaubte die Arbeit von *Garte et al. (30)*. Hier wurden die Frequenzen für den GSTM1 Null Genotyp in Kontrollpopulationen vieler verschiedener Studien ermittelt und für unterschiedliche Ethnizitäten verglichen.

**Tabelle 5-1 GSTM1 Null Genotypfrequenzen nach *Garte et al. (30)***

<b>Ethnizität</b>	<b>Anzahl der ausgewerten Studien</b>	<b>Anzahl der Individuen</b>	<b>Frequenz GSTM1 Null Genotyp (homozygot für <i>GSTM1</i>*0 Deletion)</b>
<b>kaukasisch</b>	50	10514	0,531 (0.42–0.60)
<b>afroamerikanisch</b>	7	479	0,267 (0.16–0.36)

In Tabelle 5-1 ist zu sehen, dass der GSTM1 Null Genotyp in den kaukasischen Bevölkerungsgruppen häufiger vorzukommen scheint. Das hier untersuchte Kollektiv bestand fast nur aus Spendern kaukasischer Abstammung (194 Spender, davon 193 Spender kaukasischer Abstammung, 1 Spender thailändischer Abstammung). Für das untersuchte Kollektiv wurde eine Frequenz des GSTM1 Null Genotyp von 0,347 ermittelt (Tabelle 4-11). Die ermittelte Frequenz lag in der Studienpopulation unter der Frequenz aus anderen Kontrollpopulationen (Zeile 2 Tabelle 5-1).

### 5.7.4.2 Einfluss des GSTM1 Genotyps auf DGF

Es wurde der Einfluss des Spendergenotyps für GSTM1 auf die Entstehung einer DGF bei 232 Transplantationen mit Hilfe des ( $\chi^2$ )-Test untersucht (Tabelle 4-13). In der gesamten Gruppe von 232 Transplantationen konnte kein Einfluss des Spendergenotyps auf das Auftreten einer DGF ermittelt werden ( $p= 0.671$ ).

Wie in 1.6.5.1 erläutert, wird der GSTM1 Null Genotyp, welcher mit verminderter GSTM1 Enzymaktivität einhergeht, mit einer schlechteren Toleranz gegen oxidativen Stress in Verbindung gebracht (37). So erschien es aussichtsreich, eine Verbindung zwischen dem GSTM1 Null Genotyp und der DGF nachweisen zu können. Erstaunlicherweise konnte keiner der verschiedenen Genotypen, und somit auch nicht der GSTM1 Null Genotyp, mit einer erhöhten Inzidenz von DGF am Gesamtkollektiv in Verbindung gebracht werden. Dass hier keine Assoziation nachgewiesen werden konnte, kann vielleicht dadurch erklärt werden, dass es mit dieser Methode nicht möglich war, die *GSTM1\*0* Deletion direkt nachzuweisen. Nur indirekt konnten die Individuen mit homozygoter *GSTM1\*0* Deletion bestimmt werden. Folglich war es nicht möglich, zwischen *GSTM1\*0* heterozygoten und den Trägern zweier gesunder Allele *GSTM1\*A* oder *GSTM1\*B* zu unterscheiden.

### 5.7.4.3 Signifikanter Einfluss des *GSTM1\*B* Allels auf DGF im Studienkollektiv

*Peter et al.* wiesen in einer Studie an 104 Nierenspendern einen protektiven Effekt des *GSTM1\*B* Allels nach ( $p < 0.05$ ) (109). So war es von Interesse, ob sich auch für das Studienkollektiv ein protektiver Effekt des *GSTM1\*B* Allels ergeben würde.

Auch *Peter et al.* definierten die DGF als die Notwendigkeit der Dialysebehandlung in der ersten Woche nach Transplantation (109). Wie auch für die multivariate Analyse in dieser Arbeit wurden die Spender in die zwei Gruppen *GSTM1\*B ja/nein* aufgeteilt. *Peter et al.* betrachtete nur Spender mit hohem Risiko für DGF, wobei das hohe Risiko für DGF als kalte Ischämiezeit (CIT) von über 24 Stunden definiert wurde. Für diese Arbeit wurde die in der multivariaten Analyse untersuchte Hochrisikogruppe nach dem DGF-Score ohne CIT Mediansplit ( $>110$ ) definiert (109). Hier ist die CIT nicht miteinbezogen. Die Einteilung könnte von Vorteil sein, da die CIT ein modulierbarer Risikofaktor (siehe 1.4.2) für die DGF ist. Besteht eine Assoziation zwischen der DGF und dem *GSTM1\*B Allel*, so könnte, falls aufgrund des Genotyps des Spenders ein erhöhtes Risiko für DGF besteht, durch eine Verkürzung der CIT versucht werden, die Entstehung einer DGF zu verhindern. Die untersuchte Hochrisikogruppe für DGF nach DGF-Score ohne CIT Mediansplit ( $>110$ ) bestand aus 103 Patienten. In die multivariate Analyse wurden neben dem Faktor *GSTM1\*B ja/nein* die bezüglich der DGF bedeutenden Faktoren aus Tabelle 4-14 miteinbezogen.

Im untersuchten Studienkollektiv korrelierte das *GSTM1\*B* Allel mit einer signifikant geringeren DGF Rate (**OR = 0.3, 95% CI 0.17- 0.49; p = 0.02**). Das *GSTM1\*B* hatte

also unter Berücksichtigung der Faktoren aus Tabelle 4-14 signifikanten Einfluss auf die Inzidenz der DGF in der Hochrisikogruppe (nach DGF-Score ohne CIT Mediansplit) des Studienkollektivs. Veranschaulicht wird das Ergebnis bildlich in der Grafik 4-5. Man sieht deutlich, wie sich die Inzidenzen für DGF bei Patienten ohne *GSTM1\*B* Allel über der Gruppe der Träger des *GSTM1\*B* Allels bewegen. Die Tatsache, dass sich allein das Vorhandensein des *GSTM1\*B* Allels als signifikant erwies, erscheint interessant, da es sich von *GSTM1\*A* nur in einer einzigen Aminosäure unterscheidet. Bis jetzt konnte noch kein Unterschied in der Enzymaktivität von *GSTM1\*A* und *GSTM1\*B* nachgewiesen werden (122). Allerdings muss die in vitro Enzymkinetik nicht unbedingt mit der in vivo übereinstimmen, vor allem wenn eine Vielzahl verschiedener Substrate für das Enzym zur Verfügung stehen. Dies ist im Rahmen der IschämieReperfusion unumstritten der Fall.

Interessant ist weiter, dass sich das *GSTM1\*B* Allel gerade bei Spendern mit hohem Risiko für DGF als signifikant erwies. Dieses Ergebnis wird durch die Tatsache gestützt, dass das Nierengewebe bei Spendern mit hohem Risiko nach DGF-Score automatisch auch stärkerem oxidativen Stress ausgesetzt und auch anfälliger für diesen ist. Diese erhöhte Empfindlichkeit für oxidativen Stress bedeutet auch mehr Einfluss der Enzymsysteme, die diesen abschwächen. Zu diesen Enzymsystemen zählen auch die GST, was somit auch den signifikanten Einfluss des *GSTM1\*B* Allels erklären könnte. Die Ergebnisse bezüglich des protektiven Effekts des *GSTM1\*B* Allels bei Spendern mit hohem DGF Risiko müssen jetzt an einem zweiten Kollektiv validiert werden.

### 5.7.5 Bewertung der Ergebnisse der Genotypisierung im TLR4-Gen

**Tabelle 5-2 Allelfrequenzen für die Mutationen im TLR4-Gen in verschiedenen Kontrollpopulationen**

Polymor- phis-men im TLR4- Gen	Frequenz der selteneren Allele im Studienkollektiv n=122	Daten aus der Literatur		
		Allelfrequenzen für die selteneren Allele und Herkunft der getesteten Personen	Anzahl der getesteten Individuen	Referenz
		0,05 / 0,05 Deutschland	229	Illig 2003 (50)

<b>A896G/ C1196T</b>	0,086 / 0,062	0,08 / 0,09	Deutschland	334	<i>Werner 2003 (121)</i>
		0,05 / 0,06	Deutschland	116	<i>Schmitt 2002 (96)</i>
		0,04 / 0,03	Österreich	810	<i>Kiechl 2002 (54)</i>
		0,06 / 0,05	USA (Kaukasier)	960	<i>Raby 2002 (90)</i>

Tabelle 5-2 zeigt, dass die Frequenzen der mutierten Allele im TLR4-Gen in der kaukasischen Bevölkerung bei 4-6 % liegen. Die Studie von *Werner et al.* gibt eine leicht höhere Frequenz von 8% bzw. 9% an (121). Die am Studienkollektiv bei 122 Spendern ermittelten Frequenzen der Mutationen lagen mit 8,6% für A896G und 6,2% für C1196T etwas höher oder im oberen Bereich von Frequenzen aus vergleichbaren Kollektiven.

Blickt man auf die Entstehung der DGF, lässt vieles eine wichtige Rolle der TLR und vor allem der Mutationen A896G und C1196T am TLR4 Rezeptor vermuten (siehe 1.3.2 und 1.6.5.2). Dennoch korrelierten am untersuchten Kollektiv die Genotypen für die Polymorphismen A896G ( $p= 0.290$ ) und C1196T ( $p= 0.095$ ) nicht mit der Entwicklung einer DGF (siehe Tabelle 4-19 und Tabelle 4-22 ).

### 5.7.6 Bewertung der Ergebnisse der Genotypisierung im MCP1-Gen

**Tabelle 5-3 Allelfrequenzen für die 2518 Mutation im MCP1-Gen in verschiedenen Populationen**

<b>MCP1- 2518 Polymor- phismus im MCP-1 Gen</b>	<b>Frequenz der selteneren Allele im Studienkollektiv n=164</b>	<b>Daten aus der Literatur</b>			
		<b>Allelfrequenzen für die selteneren Allele und Herkunft der Personen</b>	<b>Anzahl der getesteten Individuen</b>	<b>Referenz</b>	
		0,283	Deutschland	232	<i>Krüger</i>

<b>MCP1-2518</b>	0,244				(57)
		0,239	Ungarn	640	<i>Szalai</i> (113)
		0,219	Spanien	148	<i>Franco-Lopez</i> (28)

Die in Tabelle 5-3 dargestellten Allelfrequenzen der MCP1-2518 Mutation in anderen kaukasischen Populationen bewegen sich um Werte zwischen 21% und 29%. Die am Studienkollektiv bei den 164 typisierten Spendern ermittelte Allelfrequenz von 24% lag also im mittleren Bereich der Frequenzen aus anderen Arbeiten. In den Kapiteln 1.3.2 und 1.6.5.3 wurde erläutert, warum der MCP1-2518 Polymorphismus vielversprechend bezüglich einer Assoziation mit der DGF erschien. Dennoch konnte auch hier kein Zusammenhang des Genotyps der MCP1-2518 Mutation mit der Entwicklung einer DGF nachgewiesen werden ( $p= 0.897$  siehe Tabelle 4-25).

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Für diese Arbeit wurden Daten von 297 Nierentransplantationen, welche über die DSO vermittelt wurden, erhoben und bezüglich der *delayed graft function* (DGF) bei Nierentransplantation ausgewertet. Die 297 Nierenempfänger erhielten die Organe von insgesamt 195 Nierenspendern deren DNA extrahiert wurde und zur Analyse mittels PCR zur Verfügung stand.

Mit einer Inzidenz von **38%** erwies sich die DGF für das Studienkollektiv als im Vergleich zu anderen Studien häufige Komplikation.

Die Relevanz der DGF für das Studienkollektiv konnte deutlich anhand der Faktoren Anzahl der Dialysebehandlungen, Kreatininwert 28 Tage post OP und Anzahl der Krankenhaustage belegt werden. Die Gruppe mit DGF unterschied sich in allen drei Parametern signifikant von der Gruppe ohne DGF (**p < 0.001**).

Ein weiteres Ziel war es den Stellenwert eines modifizierten DGF-Scores zur Vorhersage der DGF am Studienkollektiv zu verifizieren. Die Reproduzierbarkeit dieses Scores zeigte sich daran, dass im Studienkollektiv Patienten mit nach modifiziertem DGF-Score hohem Risiko für DGF auch signifikant (**p = 0.006**) mehr Fälle von DGF entwickelten.

Bei der Analyse welche einzelnen demographischen Faktoren im untersuchten Kollektiv Einfluss auf die Entwicklung DGF hatten, erwies sich das Spenderalter als signifikant (**p = 0.005**). Die Faktoren kalte Ischämiezeit (CIT), Spendergeschlecht, Calcineurininhibitorgabe und Antikörperinduktion zeigten keinen signifikanten Effekt.

Unerwartet erschien, dass sich im Studienkollektiv die sonst eher negativ wirkende Gabe eines mTOR-Inhibitors als protektiv bezüglich der Entwicklung einer DGF herausstellte (**p = 0.017**). Allerdings wiesen die Patienten, die einen mTOR-Inhibitor erhalten hatten, einen signifikant niedrigeren DGF-Score und damit auch ein viel geringeres DGF Risiko auf. Trotz mTOR-Inhibitor Gabe blieb die DGF Inzidenz für diese Patienten signifikant geringer. Das führt zu der Annahme, dass man im Studienkollektiv einzelne Patienten, welchen nach DGF-Score ein niedriges Risiko für DGF zugeschrieben wurde, anhand der bekannten Risikofaktoren oder mittels eines DGF-Scores klinisch durchaus identifizieren kann. Es zeigte sich auch, dass für den individuellen Patienten, dem nach DGF-Score ein mittleres bis hohes Risiko für

## Zusammenfassung und Ausblick

die Entwicklung einer DGF zugeschrieben wurde, die Vorhersage der DGF nicht verbessert werden konnte.

In der Folge stellte sich die Frage, ob das Wissen um genetische Variationen des Spenders in Kombination mit den demographischen Daten eine verbesserte Vorhersage der DGF ermöglichen würde. Dass die genetische Variation des Spenders für das Studienkollektiv von Bedeutung ist, zeigt das signifikant (**p= 0.03**) konkordante Verhalten der Spendernieren bezüglich der Entwicklung einer DGF. Betrachtet wurden hierzu die 129 Spender des Studienkollektivs deren Nieren zwei verschiedenen Empfängern transplantiert wurden.

So wurden die Spender auf Polymorphismen in den Genen für GSTM1, TLR4 und MCP1 untersucht, welche bezüglich der Entwicklung der DGF als sehr vielversprechend erschienen.

Erkenntnisse von *Peter et al.* ließen eine protektive Wirkung des *GSTM1\*B* Allels bezüglich der Entwicklung der DGF vermuten (109). Auch in der multivariaten Analyse der Studienkollektivs bezüglich der Entwicklung einer DGF zeigte sich eine protektive Wirkung des *GSTM1\*B* Allels (**OR = 0.3, 95% CI 0.17- 0.49; p = 0.02**). Der GSTM1 Null Genotyp hatte im untersuchten Kollektiv keinen signifikanten Einfluss bezüglich der Entwicklung der DGF, obwohl er mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht wird.

Des Weiteren erwies sich für die Genotypen der Polymorphismen A896G und C1196T im TLR4-Gen und MCP1-2518 im MCP1-Gen kein signifikanter Effekt im Hinblick auf die Entstehung einer DGF.

Die Ergebnisse bezüglich des protektiven Effekts des *GSTM1\*B* Allels bei Spendern mit hohem DGF Risiko müssen jetzt an einem zweiten Kollektiv validiert werden.

## 7 Anhang

### 7.1 Materialien und Geräte

#### 7.1.1 DNA-Isolierung

Ethanol absolut		Merck
Proteinase K		Qiagen
Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung	10 %	
Erythrozyten-Lyse-Puffer	155 mM NH <sub>4</sub> Cl 10 mM NaHCO <sub>3</sub> 0,1 mM EDTA	
Kernlysepuffer	5 mM Tris/HCl pH 8 15 mM NaCl 1 mM EDTA	
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8 1 mM EDTA	

#### 7.1.2 Polymerasekettenreaktion

Aqua ad injectabilia		Braun
Desoxynukleotid-Mix (dNTP, je 10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)		Sigma
HotStarTaq <sup>TM</sup> DNA-Polymerase		Qiagen

#### 7.1.3 Namen und Sequenzen der verwendeten Primer

Die in Tabelle 7-1 aufgelisteten Oligonukleotide wurden von der Firma TIB-MOLBIOL, Berlin, synthetisiert. Die beiden MCP1 Primer stammen von der Firma Invitrogen. Die unterstrichenen Basen unterscheiden sich von der Originalsequenz und dienen dem Einbau des Erkennungsmotivs für das verwendete Restriktionsenzym oder zur Eliminierung eines im Bereich der Primerbindungsstelle zusätzlich vorhandenen Erkennungsmotivs.

Tabelle 7-1

Name	Sequenz (5'→3' Richtung)
------	--------------------------

<b>TLR4-Nco5'</b>	5' -AGCATACTTAGACTACTACCTCCATG-3'
<b>TLR4-Nco3'</b>	5' -GAGAGATTTGAGTTTCAATGTGGG-3'
<b>TLR4-399 5'</b>	5' -GGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTTGGGAGAA-3'
<b>TLR4-399 3'</b>	5' -GGAAATCCAGATGTTCTAGTTGTTCTAAGCC-3'
<b>GSTM1 5'</b>	5' -ACCTCCACCGTATATTTGAGCTCGA-3'
<b>GSTM1 3'</b>	5' -TATTCTGTGTGTAGCTCCAGGAC-3'
<b>ALB1 5'</b>	5' -AGATTTCTACCTACCACACACTC-3'
<b>ALB1 3'</b>	5' -TTCTGCAAACCTCAGCTTTGGGA-3'
<b>MCP 5'</b>	5' -TCTCTCACGCCAGCACTGACC-3'
<b>MCP 3'</b>	5' -GAGTGTTACATAGGCTTCTG-3'

#### 7.1.4 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme: New England BioLabs

*Hinf 1*

*Nco 1*

*XhoI*

*PuII*

Restriktionspuffer 10 × New England BioLabs

NE Buffer 2:  
 500 mM NaCl  
 100 mM Tris-HCl  
 100 mM MgCl<sub>2</sub>  
 10 mM Dithiothreitol

NE Buffer 4:  
 500 mM Kaliumazetat  
 200 mM Tris-Azetat  
 100 mM Magnesiumazetat  
 10 mM Dithiothreitol

BSA 100 × (10 mg/ml) New England BioLabs

#### 7.1.5 Agaroseelektrophorese

100 bp DNA Molekulargrößenstandard Cambrex

Agarose, Typ I-A Sigma

Ethidiumbromid Sigma

## Anhang

Polaroidfilm Typ 667

10 × TBE:

Polaroid

890 mM Tris

890 mM Borsäure

20 mM EDTA pH 8

DNA-Auftragspuffer

10 mM Tris/HCl pH 8

2 mM EDTA

20 % Ficoll 400

0,25 % Orange G

### 7.1.6 Geräte

Brutschränke

Memmert und Techne

Elektrophoresekammer

Sub-cell<sup>®</sup> GT, BioRad

Mikrowellenofen

Bosch

Mikrozentrifuge

Modell SD und AL, Roth

Polaroidkamera

MP-4 Land Camera

Rotator

Bachofer

Spannungsquelle

Power Pac 300, BioRad

Spectrophotometer

GeneQuant pro, Amersham

Thermocycler

Peltier

Tischzentrifuge

Universal 30RF, Hettich

UV-Transilluminator

LK Bromma

Vortex-Schüttler

Heidolph

Wasserbad

Julabo

Zentrifuge

Rotixa/P, Hettich

## 7.2 Datenblatt Spender

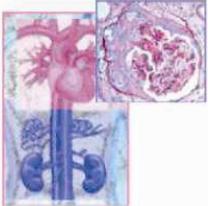
<p><b>NEPHROLOGISCHES ZENTRUM</b>  <b>Medizinische Poliklinik</b>  <b>Klinikum der Universität München – Innenstadt</b>  <b>Standorte: Ziemssenstraße 1 und Pettenkoferstraße 8A</b></p> <p>Direktor: Prof. Dr. med. Detlef Schlöndorff</p> <p>Studienleiter: Prof. Dr. med. Michael Fischereider, Tel. 089 – 5160 – 3325, Fax. 089 – 5160 – 4485          Dr. Detlef Boesebeck, DSO Bayern, Marchioninstr. 15, 81377 München</p>		<p>_____ <b>LMU</b>          Ludwig _____          Maximilians _____          Universität _____          München _____</p>
<p>Genotyp des Organspenders und Transplantationserfolg beim Organempfänger</p>		
<p><b><u>Spender Evaluation</u></b></p>		
<p>ET-Nr. (Identifikation)</p>		
<p>Alter (Jahre)</p>		<p>(Jahre)</p>
<p>Geschlecht</p>		
<p>Gewicht (kg)</p>		<p>(kg)</p>
<p>Ethnizität (cauc/afro/asia/hisp)</p>		
<p>Creatinin bei Aufnahme</p>		<p>(mg/dl)</p>
<p>Reanimation (ja/nein)</p>		
<p>Todesursache</p>		
<p>Zustimmung (ja/nein)</p>		
<p>Koordinator (Unterschrift)</p>		

Abbildung 7-1 Datenblatt Spender

### 7.3 Datenblatt Empfänger

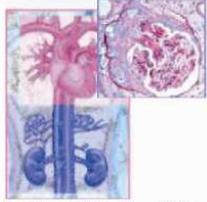
<b>NEPHROLOGISCHES ZENTRUM</b> <b>Medizinische Poliklinik</b> <b>Klinikum der Universität München – Innenstadt</b> <b>Standorte: Ziemssenstraße 1 und Pettenkoferstraße 8A</b>			<b>LMU</b> Ludwig— Maximilians— Universität— München—
Direktor: Prof. Dr. med. Detlef Schlöndorff			
Studienleiter: Prof. Dr. med. Michael Fischereeder, Tel. 089 – 5160 – 3325, Fax. 089 – 5160 - 4485 Dr. Detlef Boesebeck, DSO Bayern, Marchioninstr. 15, 81377 München			
<b>Evaluation Empfänger</b>		<b>ET-Nr. (Identifikation)</b>	
Alter (Jahre)			(Jahre)
Geschlecht			
Gewicht (kg)			(kg)
Ethnizität (cauc/afro/asia/hisp)			
Kalte Ischämie			(Stunden)
PRA (%)			(%)
Calcineurininhibitor (ja/nein)			
Sirolimus (ja/nein)			
Antikörper-Induktion (ja/nein)			
Dialysebehandlungen nach TX (Anzahl)			
Creatinin 4 Wochen post			(mg/dl)
Krankenhausaufenthalt (Tage)			(Tage)

Abbildung 7-2 Datenblatt Empfänger

## 7.4 Abkürzungsverzeichnis

ATN	Akute Tubularnekrose
BMI	body mass index
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
CI	Konfidenzintervall
CIT	cold ischemia time
DGF	delayed graft function
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
DTG	Deutsche Transplantationsgesellschaft
ET	Eurotransplant
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GSH	Glutathione
GST	Glutathion-S-Transferase
HBD	heart beating donor
HO-1	Heme oxygenase-1
HTK	Histidin Tryptophan Ketoglutarat
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharide
MCP1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MMF	Mycophenolat Mofetil
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
NHBD	non heart beating donor
NO	Stickstoffmonoxid
OPTN	Organ Procurement and Transplantation Network
OR	odds ratio
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub>
PRA	panel reactive antibodies
RFLP	Restriktions Fragment Längen Polymorphismus
ROS	reactive oxygen species

## Anhang

SNP	single nucleotid polymorphisms
TLR	Toll-like Rezeptor
Tx-Überleben	Tx-Überleben
UW	University of Wisconsin Lösung
VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	vascular endothelial growth factor

## 7.5 Lebenslauf

**Name:** Georg Dieplinger

**Geburtsdatum:** 31.08.1980  
**Geburtsort:** Freilassing

**Familienstand:** ledig  
**Staatsangehörigkeit:** deutsch

### **Schulische Ausbildung:**

1987 - 1991      Grundschule Saaldorf  
1991 - 2000      Rottmayr Gymnasium Laufen  
2000              Abitur

### **Zivildienst:**

2000 - 2001      Rettungssanitäter Rotes Kreuz, Bad Reichenhall

### **Studium:**

2001 - 2008      Studium der Humanmedizin an der LMU München  
2003 September    Ärztliche Vorprüfung  
2004 Februar      Famulatur Unfallchirurgie, Charité Berlin  
2005 Mai            Famulatur Chirurgie, Universitätskrankenhaus Pretoria Südafrika  
2005 August        Famulatur Innere Medizin, Medizinische Poliklinik München  
2006 Januar        Famulatur Allgemeinmedizin, Dr. Vollmuth Allgemeinarzt  
2006- 2007        Praktisches Jahr  
                         - Herz- und Gefäßchirurgie, University of Minnesota  
                         Medical Center, Minneapolis USA  
                         - Viszeral- und Thoraxchirurgie, Universitätsklinikum  
                         Großhadern LMU, München  
                         - Gynäkologie und Geburtshilfe, Tygerberg Hospital  
                         Stellenbosch University, Kapstadt Südafrika  
                         - Allgemeine Innere Medizin und Kardiologie, Toronto  
                         University Hospital, Toronto Kanada  
                         - Nephrologie, Poliklinik LMU, München  
2008 Mai            Staatsexamen Medizin nach neuer ÄAPPO

## 7.6 Danksagung

Ich danke herzlich allen Personen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben:

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Michael Fischereeder für die Überlassung des Themas, seine fachliche Anleitung, sowie seine Diskussionsbereitschaft in allen Fragen bedanken.

Besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Helga Török, die mich bei der konkreten Umsetzung im Labor und bei der Auswertung unterstützt hat. Auch danke ich Frau Xenia Varelas für die anfängliche Einarbeitung.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, besonders meiner Mutter Gabriele und meiner Cousine Susanne.

## **7.7 Ehrenwörtliche Erklärung**

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, Oktober 2008

Georg Dieplinger

## 8 Literaturverzeichnis

1. Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, Lowry SF. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis* 186 (10): 1522-5, 2002.
2. Almond PS, Troppmann C, Escobar F, Frey DJ, Matas AJ. Economic impact of delayed graft function. *Transplant Proc* 23 (1 Pt 2): 1304, 1991.
3. Andrade C KH, Der S et al. . Effects of ischemia/reperfusion on gene expression of toll-like receptors and cytokines during human lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 169: 203, 2004.
4. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 25 (2): 187-91, 2000.
5. Arumugam TV, Shiels IA, Woodruff TM, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM. Protective effect of a new C5a receptor antagonist against ischemia-reperfusion injury in the rat small intestine. *J Surg Res* 103 (2): 260-7, 2002.
6. Aull MJ. Chronic allograft nephropathy: pathogenesis and management of an important posttransplant complication. *Prog Transplant* 14 (2): 82-8, 2004.
7. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392 (6676): 565-8, 1998.
8. Bonventre JV, Colvin RB. Adhesion molecules in renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 5 (3): 254-61, 1996.
9. Bonventre JV, Sukhatme VP, Bamberger M, Ouellette AJ, Brown D. Localization of the protein product of the immediate early growth response gene, Egr-1, in the kidney after ischemia and reperfusion. *Cell Regul* 2 (3): 251-60, 1991.
10. Boom H, Mallat MJ, de Fijter JW, Zwinderman AH, Paul LC. Delayed graft function influences renal function, but not survival. *Kidney Int* 58 (2): 859-66, 2000.
11. Brennan DC, Flavin K, Lowell JA, Howard TK, Shenoy S, Burgess S, Dolan S, Kano JM, Mahon M, Schnitzler MA, Woodward R, Irish W, Singer GG. A randomized, double-blinded comparison of Thymoglobulin versus Atgam for induction immunosuppressive therapy in adult renal transplant recipients. *Transplantation* 67 (7): 1011-8, 1999.
12. Castaneda MP, Swiatecka-Urban A, Mitsnefes MM, Feuerstein D, Kaskel FJ, Tellis V, Devarajan P. Activation of mitochondrial apoptotic pathways in human renal allografts after ischemiareperfusion injury. *Transplantation* 76 (1): 50-4, 2003.
13. Chandrasekar B, Smith JB, Freeman GL. Ischemia-reperfusion of rat myocardium activates nuclear factor-KappaB and induces neutrophil infiltration via lipopolysaccharide-induced CXC chemokine. *Circulation* 103 (18): 2296-302, 2001.
14. Cheng L, Sturgis EM, Eicher SA, Char D, Spitz MR, Wei Q. Glutathione-S-transferase polymorphisms and risk of squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Int J Cancer* 84 (3): 220-4, 1999.

15. Colvin RB. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol* 18 (4): 1046-56, 2007.
16. Corsi MM, Leone G, Fulgenzi A, Wasserman K, Leone F, Ferrero ME. RANTES and MCP-1 chemokine plasma levels in chronic renal transplant dysfunction and chronic renal failure. *Clin Biochem* 32 (6): 455-60, 1999.
17. Cosio FG, Qiu W, Henry ML, Falkenhain ME, Elkhammas EA, Davies EA, Bumgardner GL, Ferguson RM. Factors related to the donor organ are major determinants of renal allograft function and survival. *Transplantation* 62 (11): 1571-6, 1996.
18. Danovitch GM aIWftDSG. Recipients of high-risk cadaver donors that suffer delayed graft function have worse graft survival, impaired renal function and more acute rejection. *Am J Transpl* 1: 185, 2001.
19. Davies SJ, D'Sousa R, Philips H, Matthey D, Hiley C, Hayes JD, Aber GM, Strange RC. Localisation of alpha, mu and pi class glutathione S-transferases in kidney: comparison with CuZn superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta* 1157 (2): 204-8, 1993.
20. Davies SJ, Reichardt-Pascal SY, Vaughan D, Russell GI. Differential effect of ischaemia-reperfusion injury on anti-oxidant enzyme activity in the rat kidney. *Exp Nephrol* 3 (6): 348-54, 1995.
21. De Perrot M, Sekine Y, Fischer S, Waddell TK, McRae K, Liu M, Wigle DA, Keshavjee S. Interleukin-8 release during early reperfusion predicts graft function in human lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 165 (2): 211-5, 2002.
22. DeJong JL, Chang CM, Whang-Peng J, Knutsen T, Tu CP. The human liver glutathione S-transferase gene superfamily: expression and chromosome mapping of an Hb subunit cDNA. *Nucleic Acids Res* 16 (17): 8541-54, 1988.
23. DeVries ME, Hosiawa KA, Cameron CM, Bosinger SE, Persad D, Kelvin AA, Coombs JC, Wang H, Zhong R, Cameron MJ, Kelvin DJ. The role of chemokines and chemokine receptors in alloantigen-independent and alloantigen-dependent transplantation injury. *Semin Immunol* 15 (1): 33-48, 2003.
24. Edelstein CL, Ling H, Schrier RW. The nature of renal cell injury. *Kidney Int* 51 (5): 1341-51, 1997.
25. Emami A, Schwartz JH, Borkan SC. Transient ischemia or heat stress induces a cytoprotectant protein in rat kidney. *Am J Physiol* 260 (4 Pt 2): F479-85, 1991.
26. Fernandez Rivera C, Alonso Hernandez A, Villaverde Verdejo P, Oliver Garcia J, Valdes Canedo F. Basiliximab (Simulect) in renal transplantation with high risk for delayed graft function. *Transplant Proc* 37 (3): 1435-7, 2005.
27. Fischereder M, Gohring P, Schneeberger H, Lohse P, Von Appen K, Samtleben W, Schlondorff D, Land W. Early loss of renal transplants in patients with thrombophilia. *Transplantation* 65 (7): 936-9, 1998.
28. Franco-Lopez E, Gonzalez-Escribano MF, Aguilera I, Pascasio JM, Pareja F, Bernardos A, Nunez-Roldan A. Lack of association of recipient MCP-1 gene promoter polymorphism with acute graft rejection after orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 37 (3): 1496-8, 2005.
29. Fuller TF, Freise CE, Serkova N, Niemann CU, Olson JL, Feng S. Sirolimus delays recovery of rat kidney transplants after ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 76 (11): 1594-9, 2003.
30. Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, Baranova H, Bathum L, Benhamou S, Boffetta P, Bouchardy C, Breskvar K,

- Brockmoller J, Cascorbi I, Clapper ML, Coutelle C, Daly A, Dell'Omo M, Dolzan V, Dresler CM, Fryer A, Haugen A, Hein DW, Hildesheim A, Hirvonen A, Hsieh LL, Ingelman-Sundberg M, Kalina I, Kang D, Kihara M, Kiyohara C, Kremers P, Lazarus P, Le Marchand L, Lechner MC, van Lieshout EM, London S, Manni JJ, Maugard CM, Morita S, Nazar-Stewart V, Noda K, Oda Y, Parl FF, Pastorelli R, Persson I, Peters WH, Rannug A, Rebbeck T, Risch A, Roelandt L, Romkes M, Ryberg D, Salagovic J, Schoket B, Seidegard J, Shields PG, Sim E, Sinnet D, Strange RC, Stucker I, Sugimura H, To-Figueras J, Vineis P, Yu MC, Taioli E. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10 (12): 1239-48, 2001.
31. Giral-Classe M, Hourmant M, Cantarovich D, Dantal J, Blancho G, Daguin P, Ancelet D, Souillou JP. Delayed graft function of more than six days strongly decreases long-term survival of transplanted kidneys. *Kidney Int* 54 (3): 972-8, 1998.
32. Gjertson DW. Impact of delayed graft function and acute rejection on kidney graft survival. *Clin Transpl*: 467-80, 2000.
33. Gonwa TA, Mai ML, Smith LB, Levy MF, Goldstein RM, Klintmalm GB. Immunosuppression for delayed or slow graft function in primary cadaveric renal transplantation: use of low dose tacrolimus therapy with post-operative administration of anti-CD25 monoclonal antibody. *Clin Transplant* 16 (2): 144-9, 2002.
34. Gonzalez-Escribano MF, Torres B, Aguilar F, Rodriguez R, Garcia A, Valenzuela A, Nunez-Roldan A. MCP-1 promoter polymorphism in Spanish patients with rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* 64 (7): 741-4, 2003.
35. Gonzalez E, Rovin BH, Sen L, Cooke G, Dhanda R, Mummidi S, Kulkarni H, Bamshad MJ, Telles V, Anderson SA, Walter EA, Stephan KT, Deucher M, Mangano A, Bologna R, Ahuja SS, Dolan MJ, Ahuja SK. HIV-1 infection and AIDS dementia are influenced by a mutant MCP-1 allele linked to increased monocyte infiltration of tissues and MCP-1 levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (21): 13795-800, 2002.
36. Grau V, Gemsa D, Steiniger B, Garn H. Chemokine expression during acute rejection of rat kidneys. *Scand J Immunol* 51 (5): 435-40, 2000.
37. Gronau S, Koenig-Greger D, Jerg M, Riechelmann H. GSTM1 enzyme concentration and enzyme activity in correlation to the genotype of detoxification enzymes in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Dis* 9 (2): 62-7, 2003.
38. Gu L, Tseng SC, Rollins BJ. Monocyte chemoattractant protein-1. *Chem Immunol* 72: 7-29, 1999.
39. Halloran PF, Hunsicker LG. Delayed graft function: state of the art, November 10-11, 2000. Summit meeting, Scottsdale, Arizona, USA. *Am J Transplant* 1 (2): 115-20, 2001.
40. Haugen E, Nath KA. The involvement of oxidative stress in the progression of renal injury. *Blood Purif* 17 (2-3): 58-65, 1999.
41. Hayes JD, Strange RC. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* 61 (3): 154-66, 2000.
42. Herfarth H, Goke M, Hellerbrand C, Muhlbauer M, Vogl D, Scholmerich J, Rogler G. Polymorphism of monocyte chemoattractant protein 1 in Crohn's disease. *Int J Colorectal Dis* 18 (5): 401-5, 2003.

43. Hernandez A LJ, Barhyte DY, Mabudian M, Gage F. Ablating the ischemia-reperfusion injury in non heart beating donor kidneys. *Transplantation* 67: 200-06, 1999.
44. Hetzel GR, Grunberg W, Boltres A, Plum A, Grabensee B, Plum J. Influence of delayed graft function on glomerular hemodynamics and permselectivity in well-functioning renal allografts. *Transplant Proc* 34 (6): 2203-4, 2002.
45. Hoffmann SC, Kampen RL, Amur S, Sharaf MA, Kleiner DE, Hunter K, John Swanson S, Hale DA, Mannon RB, Blair PJ, Kirk AD. Molecular and immunohistochemical characterization of the onset and resolution of human renal allograft ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 74 (7): 916-23, 2002.
46. <http://www.dso.de/grafiken/g32.html>. Grafik Warteliste und Nierentransplantation der Internetseite der Deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO)
47. <http://www.dso.de/grafiken/g39.html>. Grafik Lebendnierenspenden der Internetseite der Deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO)
48. Humar A, Payne WD, Sutherland DE, Matas AJ. Clinical determinants of multiple acute rejection episodes in kidney transplant recipients. *Transplantation* 69 (11): 2357-60, 2000.
49. Humar A, Ramcharan T, Kandaswamy R, Gillingham K, Payne WD, Matas AJ. Risk factors for slow graft function after kidney transplants: a multivariate analysis. *Clin Transplant* 16 (6): 425-9, 2002.
50. Illig T, Bongardt F, Schopfer A, Holle R, Muller S, Rathmann W, Koenig W, Meisinger C, Wichmann HE, Kolb H. The endotoxin receptor TLR4 polymorphism is not associated with diabetes or components of the metabolic syndrome. *Diabetes* 52 (11): 2861-4, 2003.
51. Irish WD, McCollum DA, Tesi RJ, Owen AB, Brennan DC, Bailly JE, Schnitzler MA. Nomogram for predicting the likelihood of delayed graft function in adult cadaveric renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 14 (11): 2967-74, 2003.
52. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5 (10): 987-95, 2004.
53. Jefferies H, Coster J, Khalil A, Bot J, McCauley RD, Hall JC. Glutathione. *ANZ J Surg* 73 (7): 517-22, 2003.
54. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, Willeit J, Schwartz DA. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* 347 (3): 185-92, 2002.
55. Kim BS, Lim SW, Li C, Kim JS, Sun BK, Ahn KO, Han SW, Kim J, Yang CW. Ischemia-reperfusion injury activates innate immunity in rat kidneys. *Transplantation* 79 (10): 1370-7, 2005.
56. Kim HL, Lee DS, Yang SH, Lim CS, Chung JH, Kim S, Lee JS, Kim YS. The polymorphism of monocyte chemoattractant protein-1 is associated with the renal disease of SLE. *Am J Kidney Dis* 40 (6): 1146-52, 2002.
57. Kruger B, Schroppel B, Ashkan R, Marder B, Zulke C, Murphy B, Kramer BK, Fischereder M. A Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) polymorphism and outcome after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 13 (10): 2585-9, 2002.
58. Kukielka GL, Smith CW, LaRosa GJ, Manning AM, Mendoza LH, Daly TJ, Hughes BJ, Youker KA, Hawkins HK, Michael LH, et al. Interleukin-8 gene induction in the myocardium after ischemia and reperfusion in vivo. *J Clin Invest* 95 (1): 89-103, 1995.

59. Lafuente A, Molina R, Palou J, Castel T, Moral A, Trias M. Phenotype of glutathione S-transferase Mu (GSTM1) and susceptibility to malignant melanoma. MMM group. Multidisciplinary Malignant Melanoma Group. *Br J Cancer* 72 (2): 324-6, 1995.
60. Lafuente A, Pujol F, Carretero P, Villa JP, Cuchi A. Human glutathione S-transferase mu (GST mu) deficiency as a marker for the susceptibility to bladder and larynx cancer among smokers. *Cancer Lett* 68 (1): 49-54, 1993.
61. Lalor PF, Adams DH. Lymphocyte homing to allografts. *Transplantation* 70 (8): 1131-9, 2000.
62. Lebranchu Y, Halimi JM, Bock A, Chapman J, Dussol B, Fritsche L, Kliem V, Oppenheimer F, Pohanka E, Salvadori M, Soergel M, Tufveson G. Delayed graft function: risk factors, consequences and parameters affecting outcome-results from MOST, A Multinational Observational Study. *Transplant Proc* 37 (1): 345-7, 2005.
63. Lemos FB, Ijzermans JN, Zondervan PE, Peeters AM, van den Engel S, Mol WM, Weimar W, Baan CC. Differential expression of heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor in cadaveric and living donor kidneys after ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol* 14 (12): 3278-87, 2003.
64. Ling H, Edelstein C, Gengaro P, Meng X, Lucia S, Knotek M, Wangsiripaisan A, Shi Y, Schrier R. Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Am J Physiol* 277 (3 Pt 2): F383-90, 1999.
65. Lorenz E, Frees KL, Schwartz DA. Determination of the TLR4 genotype using allele-specific PCR. *Biotechniques* 31 (1): 22-4, 2001.
66. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338 (7): 436-45, 1998.
67. Marcen R OL, Pascual J, de la Cal MA, Teruel JL, Villafruela JJ, Rivera ME, Mampaso F, Burgos FJ, Ortuno J. Delayed graft function does not reduce the survival of renal transplant allografts. *Transplant* 66: 461-466, 1998.
68. Matas AJ, Gillingham KJ, Elick BA, Dunn DL, Gruessner RW, Payne WD, Sutherland DE, Najarian JS. Risk factors for prolonged hospitalization after kidney transplants. *Clin Transplant* 11 (4): 259-64, 1997.
69. McTaggart RA, Gottlieb D, Brooks J, Bacchetti P, Roberts JP, Tomlanovich S, Feng S. Sirolimus prolongs recovery from delayed graft function after cadaveric renal transplantation. *Am J Transplant* 3 (4): 416-23, 2003.
70. McTaggart RA, Tomlanovich S, Bostrom A, Roberts JP, Feng S. Comparison of outcomes after delayed graft function: sirolimus-based versus other calcineurin-inhibitor sparing induction immunosuppression regimens. *Transplantation* 78 (3): 475-80, 2004.
71. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388 (6640): 394-7, 1997.
72. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Kaplan B. Long-term renal allograft survival: have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies? *Am J Transplant* 4 (8): 1289-95, 2004.
73. Methe H, Zimmer E, Grimm C, Nabauer M, Koglin J. Evidence for a role of toll-like receptor 4 in development of chronic allograft rejection after cardiac transplantation. *Transplantation* 78 (9): 1324-31, 2004.
74. Miller J, Mendez R, Pirsch JD, Jensik SC. Safety and efficacy of tacrolimus in combination with mycophenolate mofetil (MMF) in cadaveric renal transplant

- recipients. FK506/MMF Dose-Ranging Kidney Transplant Study Group. *Transplantation* 69 (5): 875-80, 2000.
75. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16 (3): 1215, 1988.
76. Miura M, Fu X, Zhang QW, Remick DG, Fairchild RL. Neutralization of Gro alpha and macrophage inflammatory protein-2 attenuates renal ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol* 159 (6): 2137-45, 2001.
77. Monteiro F, Buelow R, Mineiro C, Rodrigues H, Kalil J. Identification of patients at high risk of graft loss by pre- and posttransplant monitoring of anti-HLA class I IgG antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. *Transplantation* 63 (4): 542-6, 1997.
78. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'Amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 164 (11): 5998-6004, 2000.
79. Nelson PJ, Krensky AM. Chemokines, chemokine receptors, and allograft rejection. *Immunity* 14 (4): 377-86, 2001.
80. Noiri E, Peresleni T, Miller F, Goligorsky MS. In vivo targeting of inducible NO synthase with oligodeoxynucleotides protects rat kidney against ischemia. *J Clin Invest* 97 (10): 2377-83, 1996.
81. Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schmouder RL. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation* 63 (7): 968-74, 1997.
82. Osborn L. Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. *Cell* 62 (1): 3-6, 1990.
83. Oyama J, Blais C, Jr., Liu X, Pu M, Kobzik L, Kelly RA, Bourcier T. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation* 109 (6): 784-9, 2004.
84. Parl FF. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. *Cancer Lett* 221 (2): 123-9, 2005.
85. Peeters P, Terryn W, Vanholder R, Lameire N. Delayed graft function in renal transplantation. *Curr Opin Crit Care* 10 (6): 489-98, 2004.
86. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 364 (9447): 1814-27, 2004.
87. Polak WP, Kosieradzki M, Kwiatkowski A, Danielewicz R, Lisik W, Michalak G, Paczek L, Lao M, Walaszewski J, Rowinski WA. Activity of glutathione S-transferases in the urine of kidney transplant recipients during the first week after transplantation. *Ann Transplant* 4 (1): 42-5, 1999.
88. Prodjosudjadi W, Daha MR, Gerritsma JS, Florijn KW, Barendregt JN, Bruijn JA, van der Woude FJ, van Es LA. Increased urinary excretion of monocyte chemoattractant protein-1 during acute renal allograft rejection. *Nephrol Dial Transplant* 11 (6): 1096-103, 1996.
89. Quiroga I, McShane P, Koo DD, Gray D, Friend PJ, Fuggle S, Darby C. Major effects of delayed graft function and cold ischaemia time on renal allograft survival. *Nephrol Dial Transplant* 21 (6): 1689-96, 2006.
90. Raby BA, Klimecki WT, Laprise C, Renaud Y, Faith J, Lemire M, Greenwood C, Weiland KM, Lange C, Palmer LJ, Lazarus R, Vercelli D, Kwiatkowski DJ, Silverman EK, Martinez FD, Hudson TJ, Weiss ST. Polymorphisms in toll-like receptor 4 are not associated with asthma or atopy-related phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med* 166 (11): 1449-56, 2002.

91. Rebbeck TR. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6 (9): 733-43, 1997.
92. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (2): 588-93, 1998.
93. Rosenthal JT, Danovitch GM, Wilkinson A, Ettenger RB. The high cost of delayed graft function in cadaveric renal transplantation. *Transplantation* 51 (5): 1115-8, 1991.
94. Rovin BH, Lu L, Saxena R. A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 259 (2): 344-8, 1999.
95. Schlondorff D, Nelson PJ, Luckow B, Banas B. Chemokines and renal disease. *Kidney Int* 51 (3): 610-21, 1997.
96. Schmitt C, Humeny A, Becker CM, Brune K, Pahl A. Polymorphisms of TLR4: rapid genotyping and reduced response to lipopolysaccharide of TLR4 mutant alleles. *Clin Chem* 48 (10): 1661-7, 2002.
97. Schwartz DA. The genetics of innate immunity. *Chest* 121 (3 Suppl): 62S-68S, 2002.
98. Seidegard J, Vorachek WR, Pero RW, Pearson WR. Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (19): 7293-7, 1988.
99. Sekido N MN, Harada A, Nakanishi I, Watanabe Y, Matsushima K. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8 *Nature* 365: 654-57, 1993.
100. Shoskes DA, Cecka JM. Deleterious effects of delayed graft function in cadaveric renal transplant recipients independent of acute rejection. *Transplantation* 66 (12): 1697-701, 1998.
101. Shoskes DA, Cecka JM. Effect of delayed graft function on short- and long-term kidney graft survival. *Clin Transpl*: 297-303, 1997.
102. Shoskes DA, Xie Y, Gonzalez-Cadavid NF. Nitric oxide synthase activity in renal ischemia-reperfusion injury in the rat: implications for renal transplantation. *Transplantation* 63 (4): 495-500, 1997.
103. Simon JF, Swanson SJ, Agodoa LY, Cruess DF, Bohem EM, Abbott KC. Induction sirolimus and delayed graft function after deceased donor kidney transplantation in the United States. *Am J Nephrol* 24 (4): 393-401, 2004.
104. Smith KD, Wrenshall LE, Nicosia RF, Pichler R, Marsh CL, Alpers CE, Polissar N, Davis CL. Delayed graft function and cast nephropathy associated with tacrolimus plus rapamycin use. *J Am Soc Nephrol* 14 (4): 1037-45, 2003.
105. Snyder JJ, Kasiske BL, Gilbertson DT, Collins AJ. A comparison of transplant outcomes in peritoneal and hemodialysis patients. *Kidney Int* 62 (4): 1423-30, 2002.
106. Sola R, Alarcon A, Jimenez C, Osuna A. The influence of delayed graft function. *Nephrol Dial Transplant* 19 Suppl 3: iii32-7, 2004.
107. Solez K RL, Olsen S. Morphologic differences between acute tubular necrosis in transplanted and native kidneys. In: Solez K and Racusen LC(eds). *Acute Renal Failure: Diagnosis, Treatment and Prevention*. New York NY, NY: Marcel Dekker, Inc.: 3-12, 1991.
108. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76 (2): 301-14, 1994.

## Literaturverzeichnis

109. St Peter SD, Imber CJ, Jones DC, Fuggle SV, Watson CJ, Friend PJ, Marshall SE. Genetic determinants of delayed graft function after kidney transplantation. *Transplantation* 74 (6): 809-13, 2002.
110. Stallone G, Di Paolo S, Schena A, Infante B, Battaglia M, Ditunno P, Gesualdo L, Grandaliano G, Schena FP. Addition of sirolimus to cyclosporine delays the recovery from delayed graft function but does not affect 1-year graft function. *J Am Soc Nephrol* 15 (1): 228-33, 2004.
111. Strange RC, Fryer AA. The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. *IARC Sci Publ* 148 (148): 231-49, 1999.
112. Swanson SJ, Hypolite IO, Agodoa LY, Batty DS, Jr., Hshieh PB, Cruess D, Kirk AD, Peters TG, Abbott KC. Effect of donor factors on early graft survival in adult cadaveric renal transplantation. *Am J Transplant* 2 (1): 68-75, 2002.
113. Szalai C, Duba J, Prohaszka Z, Kalina A, Szabo T, Nagy B, Horvath L, Csaszar A. Involvement of polymorphisms in the chemokine system in the susceptibility for coronary artery disease (CAD). Coincidence of elevated Lp(a) and MCP-1 -2518 G/G genotype in CAD patients. *Atherosclerosis* 158 (1): 233-9, 2001.
114. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 16 (1): 3-9, 2004.
115. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21: 335-76, 2003.
116. Tejani AH, Sullivan EK, Alexander SR, Fine RN, Harmon WE, Kohaut EC. Predictive factors for delayed graft function (DGF) and its impact on renal graft survival in children: a report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study (NAPRTCS). *Pediatr Transplant* 3 (4): 293-300, 1999.
117. Torok HP, Glas J, Tonenchi L, Mussack T, Folwaczny C. Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis. *Clin Immunol* 112 (1): 85-91, 2004.
118. Troppmann C, Gillingham KJ, Benedetti E, Almond PS, Gruessner RW, Najarian JS, Matas AJ. Delayed graft function, acute rejection, and outcome after cadaver renal transplantation. The multivariate analysis. *Transplantation* 59 (7): 962-8, 1995.
119. Vakeva AP, Agah A, Rollins SA, Matis LA, Li L, Stahl GL. Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: role of the terminal complement components and inhibition by anti-C5 therapy. *Circulation* 97 (22): 2259-67, 1998.
120. Wenzel UO, Abboud HE. Chemokines and renal disease. *Am J Kidney Dis* 26 (6): 982-94, 1995.
121. Werner M, Topp R, Wimmer K, Richter K, Bischof W, Wjst M, Heinrich J. TLR4 gene variants modify endotoxin effects on asthma. *J Allergy Clin Immunol* 112 (2): 323-30, 2003.
122. Widersten M, Pearson WR, Engstrom A, Mannervik B. Heterologous expression of the allelic variant mu-class glutathione transferases mu and psi. *Biochem J* 276 ( Pt 2) (Pt 2): 519-24, 1991.
123. Wight JP, Chilcott JB, Holmes MW, Brewer N. Pulsatile machine perfusion vs. cold storage of kidneys for transplantation: a rapid and systematic review. *Clin Transplant* 17 (4): 293-307, 2003.
124. Wolfs TG, Buurman WA, van Schadewijk A, de Vries B, Daemen MA, Hiemstra PS, van 't Veer C. In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by

## Literaturverzeichnis

- renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *J Immunol* 168 (3): 1286-93, 2002.
125. Xu S, Wang Y, Roe B, Pearson WR. Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion. *J Biol Chem* 273 (6): 3517-27, 1998.
  126. Yang IA, Barton SJ, Rorke S, Cakebread JA, Keith TP, Clough JB, Holgate ST, Holloway JW. Toll-like receptor 4 polymorphism and severity of atopy in asthmatics. *Genes Immun* 5 (1): 41-5, 2004.
  127. Yarlagadda SG, Coca SG, Garg AX, Doshi M, Poggio E, Marcus RJ, Parikh CR. Marked variation in the definition and diagnosis of delayed graft function: a systematic review. *Nephrol Dial Transplant*, 2008.