

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für
Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie

Prof. Dr. med. Björn Nashan FACS, FRCSC, FEBS

**Polymorphismen im NFKBIA Gen und akute Abstoßungsreaktionen
nach Lebertransplantation**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Kathrin Stefanie Kramer
aus Stuttgart

Hamburg 2015

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 08. Mai 2015**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: Prof. Dr. med. Martina Sterneck

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. Friedrich Thaiss

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: PD Dr. med. Jun Li

Inhaltsverzeichnis

1. Zugrundeliegende Publikation	Seite 3-11
2. Hintergrund und Fragestellung	Seite 12-15
3. Materialien und Methoden	Seite 16-19
3.1 Kollektive	
3.2 Genotypisierung	
3.3 Statistische Auswertung	
4. Ergebnisse und Diskussion	Seite 19-22
5. Literaturverzeichnis	Seite 23-28
6. Abkürzungsverzeichnis	Seite 29-30
7. Lebenslauf	Seite 31
8. Danksagung	Seite 32
9. Erklärung zum Eigenanteil an der Publikation	Seite 33
10. Eidesstattliche Versicherung	Seite 34

Polymorphism in NFKBIA gene is associated with recurrent acute rejections in liver transplant recipients

K. Kramer¹, T. Thye², A. Treszl³, S. Peine⁴, M. Koch¹, M. Sterneck⁵, B. Nashan¹ & H. Thude¹

¹ Department of Hepatobiliary and Transplant Surgery, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, 20246, Germany

² Molecular Medicine Department, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Hamburg, 20359, Germany

³ Department of Medical Biometry and Epidemiology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, 20246, Germany

⁴ Institute for Transfusion Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, 20246, Germany

⁵ Department of Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, 20246, Germany

Key words

liver transplantation; nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-alpha; predictor; rejection; single nucleotide polymorphism

Correspondence

Dr rer. nat. Hansjörg Thude
Department of Hepatobiliary and Transplant Surgery
Campus Research N27
University Medical Center
Hamburg-Eppendorf
Martinistraße 52
D-20246 Hamburg
Germany
Tel: +49 40 741059586
Fax: +49 40 7410 55898
e-mail: h.thude@uke.de

Received 27 November 2013; revised 17 June 2014; accepted 7 July 2014

doi: 10.1111/tan.12411

Abstract

The nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer B-cells inhibitor-alpha (NFKBIA) gene encodes a member of the nuclear factor-kappa-B inhibitor family. Polymorphisms in this gene might be associated with a susceptibility to acute rejection episodes following liver transplantation, as they may cause an increased activation level of the proinflammatory transcription factor nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells (NFkB). The aim of this study was to evaluate whether the NFKBIA polymorphisms -297 C/T (rs2233409), -826 C/T (rs2233406) and 126 G/A (rs696) affect the incidence of acute liver graft rejection. A total of 199 liver transplant recipients was analyzed, 100 without (NAR) and 99 with early acute rejection (AR). Thirty-two individuals with multiple acute rejections (MAR) were analyzed as a subgroup of AR. Polymerase chain reaction-allele specific restriction enzyme analysis (PCR-ASRA) and allele-specific hybridization with fluorescence resonance energy transfer (FRET) were used for genotyping. We identified the genotype NFKBIA 126 AA ($P=0.002$) as well as the haplotype NFKBIA-126A-297T-826T ($P=0.002$) as a potential risk factor for the occurrence of recurrent acute rejections. Furthermore, we assessed an association between the 126 A allele and susceptibility to recurrent acute rejections ($P=0.027$). Our data suggest that the NFKBIA 126 G/A polymorphism might be potentially helpful to identify liver transplant recipients with an increased susceptibility to develop recurrent acute rejections.

Introduction

During the last decades numerous pharmacological agents have been developed to prevent allograft rejection and therefore establish liver transplantation as a successful therapy option for end-stage liver diseases (1). Acute rejection, a serious complication following liver transplantation, occurs in about 30% of adequately immunosuppressed patients (2). Although single acute rejection episodes do not influence the long-term liver allograft function, recurrent rejection episodes reduce it significantly and seem to cause constant histological damage (3). Besides graft failure, recurrent or *de novo* malignancies, infections, cardiovascular disease and renal failure are shown to be the leading reasons for long-term mortality after liver transplantation (4). Many of these causes seem to be promoted by risk factors including diabetes, hypertension and renal insufficiency (4). Typical side effects of commonly used immunosuppressive drugs include nephrotoxicity,

hypertension, hyperlipidaemia, hyperglycemia and general immune deficiency (1). Unfortunately, these side effects compound the mortality promoting risk factors. It is one of the big challenges in post-transplant immunosuppressive therapy to find a balance between sufficient protection of the transplanted organ and the prevention of long-term iatrogenic complications.

One possible strategy to improve the success of transplantation and post-transplant survival may include the development of individualized immunosuppressive protocols according to the recipient's risk profile containing clinical conditions and genetic predisposition. Therefore, it is required to identify secure predictors of acute rejections prior to transplantation. Characteristics such as the age of donor and recipient, ethnicity, etiology and severity of liver disease are reported to be related to the incidence of acute rejections (5, 6). Genetic polymorphisms are specifically suitable for this purpose, as they are stable biomarkers that may be used to calculate the

individual's risk for the development of rejection episodes. Several single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes of tumor necrosis factor- α , interleukin-10, interleukin-6, interferon- γ and cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 are discussed to be associated with acute liver graft rejection, however results remain inconsistent (7–14). For this reason, none of these polymorphisms is used in a clinical diagnostic setting.

This study focuses on SNPs in the NFKBIA gene, encoding for nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor- α , the inhibitor protein of the nuclear transcription factor NF κ B. NFKBIA consists of 317 amino acids and includes five ankyrin repeats, which are characteristic for the inhibitor of nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer B-cells family (15). These motifs allow the protein–protein-interaction and accordingly the inactivation of the homo- or heterodimers of the NF κ B/Rel family by masking the nuclear-localization sequence (16). Moreover, NFKBIA itself is able to move into the nucleus in order to dislocate NF κ B from the DNA (17). Once NFKBIA has been broken down by proteasomes after phosphorylation and ubiquitination, NF κ B translocates to the nucleus and promotes the expression of a panel of genes (18). Some of these, for example interleukin-2, interleukin-6, interleukin-12 or tumor necrosis factor- α , play an important role in the pathogenesis of allograft rejection and the activation of the immune system in general (19). Therefore, three polymorphisms in NFKBIA gene were chosen. The first two, –297 C/T (rs2233409) and –826 C/T (rs2233406), are located in the promoter region, whereas the last polymorphism, 126 G/A (rs696), is found in the 3' UTR. Polymorphisms in these regions are suspected to affect the gene expression rate at the level of transcription or translation. The selected polymorphisms have been analyzed already in context of carcinogenesis (20, 21), infection and metabolic disorders (22, 23). As the chosen polymorphisms are associated with several autoimmune diseases (24–32), they might also promote the development of acute rejections. However, to our knowledge no data exist regarding liver transplantation or allograft rejection.

Thus, the aim of this study is to determine if the mentioned NFKBIA polymorphisms are associated with a susceptibility to acute rejection in liver transplant recipients.

Materials and methods

Patients and diagnosis of acute rejection

The analysis included 103 control subjects and 199 patients who received liver transplant at the University Medical Center Hamburg-Eppendorf. All enrolled individuals gave informed consent for the study. The study protocol was approved in advance by the Local Ethics Commission.

The control group comprised Caucasian blood donors who were recruited from the Department of Transfusion Medicine of the University Medical Center Hamburg-Eppendorf and routinely checked for health before donation. The collection of

recipients' blood samples took place between 2009 and 2010 out of all adult liver transplant recipients (age ≥ 18 years at the date of transplantation) who were transplanted between 1993 and 2010.

Patients who died before 2010, with unknown contact data, incomplete reported medical history or those who did not return the consent form or blood sample were excluded. Patients were chosen retrospectively according to the following criteria. The biopsy-proven acute rejection was defined in terms of an early acute rejection that occurred within the first 30 days post-transplant and was diagnosed according to common histological criteria such as portal or periportal hepatitis, rejection cholangitis and endothelitis or phlebitis of portal or hepatic vein branches (33, 34). In addition, the episodes were accompanied by typical biochemical changes (increased aminotransferases, gamma-glutamyltransferase and bilirubin) without any other identifiable cause. Patients with hepatitis C reinfection were excluded. In all cases the symptoms responded to a high dose corticosteroid therapy. Steroid resistance did not occur. This group was compared to patients without any acute rejection, who were transplanted for at least 1 year and had no episodes of elevated liver enzymes for the complete post-transplant period until 2010. Patients who did not meet these criteria were excluded from the collective without rejection. In total, this study analyses 199 allograft recipients, 99 suffered AR and 100 did not (NAR). Within the cohort of patients with acute rejection, 32 individuals experienced additional rejection episodes ($n \geq 2$) at a later point of time. They were summarized in a third group with MAR. The majority of patients were of Caucasian ethnic origin (in all groups $\geq 94\%$).

Genotyping of NFKBIA polymorphisms

Peripheral venous blood sample of 5 ml were drawn from each individual by standard venepuncture. The blood samples were collected in sterile tubes with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA- Na_2) anticoagulants. Genomic DNA was extracted from EDTA- Na_2 anticoagulated blood using the commercially extraction kit innuPREP Blood DNA Mini Kit (Analytik Jena AG Lifescience, Jena, Germany) according to the manufacturer's instructions.

The NFKBIA 126 G/A (rs696) in 3' UTR as well as promoter polymorphisms –297 C/T (rs2233409) and –826 C/T (rs2233406) were determined using PCR-ASRA. PCR primers, conditions and restriction enzymes are shown in Table 1. Each PCR reaction was carried out in a 40 μ l mixed solution with 100 ng genomic DNA, 20 pmol flanking primers (see Table 1) and 20 μ l PCR Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) containing 1 U Taq DNA polymerase in 20 mM Tris–HCl, 100 mM KCl, 3 mM MgCl_2 and dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP each 0.4 mM). PCR involved an initial denaturation step for 5 min at 94°C, 34 cycles of denaturation for 30 s at 94°C, annealing temperature (Table 1) for 30 s, and extension for 30 s at 72°C, followed by a final extension step for

Table 1 Primers, annealing temperature, restriction enzymes, amplicon and fragment size for PCR-ASRA

	SNP	Primer sequence	Annealing (°C)	Amplicon size (bp)	Restriction enzyme	Fragment size (bp)
-297 C/T	rs2233409	F: 5'-CCAGCCATCATTCCACTCT-3' R: 5'-GAGAACTCCCTGCGATGAG-3'	59	300	Hyp8I	C: 300 T: 168 + 132
-826 C/T	rs2233406	F: 5'-AGGTCCAATCGCGTTAAG-3' R: 5'-GGTGGTGTGGATACCTTGCAATG-3'	53	196	BsII	C: 95 + 84 + 17 T: 112 + 84
126 G/A	rs696	F: 5'-GGCTGAAAGAACATGGACTTG-3' R: 5'-GTACACCATTACAGGAGGG-3'	61	424	HaeIII	G: 306 + 118 A: 424

bp, base pairs; F, forward; PCR-ASRA, polymerase chain reaction-allele specific restriction enzyme analysis; R, reverse; SNP, single nucleotide polymorphism.

Table 2 Primers and anchor/sensor oligonucleotides for FRET analysis

	SNP	Primer sequence	Anchor/sensor oligonucleotides
-297 C/T	rs2233409	F: 5'-TTTCCAAGCCAGTCAGACCAGAAAAAGA-3' R: 5'-TTCAAAAGATCAAAAAACGGAAAGGACCG-3'	A: 5'-ACCCTGTAATCCTGTCCTCTGCA-3' S: 5'-GTGAGCCTCTTTCCCTG-3'
-826 C/T	rs2233406	F: 5'-GTTTCCAAGTAAAGCAAGGTGTTAATG-3' R: 5'-CCTCCTTCTCTAAGTTCTCCTCGAATTTG-3'	A: 5'-CATAAACGAATAGCTACTTATGAACACAATAGC-3' S: 5'-ACTCTGCTATTGCAAGG-3'
126 G/A	rs696	F: 5'-AAGAAGTTTCTCAGAATTTCAATGATCTTTC-3' R: 5'-TTAACGTGTCTTTTCCCTTGTTCAG-3'	A: 5'-GCTGATCCTACCACAATAAGACGTT-3' S: 5'-TGGGCCAGGCAGT-3'

FRET, fluorescence resonance energy transfer; F, forward, R, reverse, A, anchor, S, sensor.

5 min at 72°C in a T3 Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen, Germany). The PCR products were digested, respectively, by 1 U of the restriction enzymes Hyp8I (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Germany), BslI or HaeIII (New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany) in a 10 µl reaction volume at 37°C for 4 h. Restriction fragments were separated on 3% agarose gel (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) and visualized by ethidium bromide staining to determine the genotypes (fragment sizes are shown in Table 1).

All patient samples were re-evaluated using dynamic allele-specific hybridization with FRET in a LightCycler 480 device (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Primer pairs and anchor/sensor oligonucleotides (Biomers, Ulm, Germany) for -297 C/T, -826 C/T and 126 G/A genotyping are listed in Table 2.

Statistical analysis

The goodness-of-fit chi-squared test was implemented, ensuring that there was no significant aberration of the Hardy-Weinberg equilibrium. Demographic and clinical characteristics as well as allele and genotype frequencies were tested by Student's *t*-test, Pearson's chi-squared test and Fisher's exact test. Age as an influencing co-factor was checked by logistic regression analysis. In order to calculate the predictive power we performed a ROC curve analysis. These calculations were performed by R 2.13.2. (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), SPSS STATISTICS 22 (IBM, Armonk, NY) and SAS 9.2 (SAS Institute Inc. Cary, NC).

In all calculations *P*-values ≤ 0.05 were considered to indicate statistical significance. Supported by the genetic analysis

software UNPHASED 3.1.5 (Dudbridge F, MRC Biostatistics Unit, Cambridge, UK) haplotype frequencies were estimated (35). In order to reach the best possible accuracy a setting was chosen that considered only haplotypes more frequent than 5% (in each single group). The significance of these results was finally controlled with reference to the Holm-Bonferroni method (36).

Results

Table 3 shows the demographic and clinical attributes such as sex, age, primary liver disease and initial immunosuppression. Apart from the age (*P* < 0.001 for AR vs NAR), none of these attributes varied between the three compared groups, particularly the distribution of patients with autoimmune diseases. Therefore, the statistic analyses of these two cohorts were additive adjusted to the age by logistic regression. The observed allele and genotype frequencies for the three groups with MAR, AR, NAR and controls are summarized in Table 4. The results for the investigated control subjects were in Hardy-Weinberg Equilibrium and in accordance with genotype and allele frequencies previously published on the database of SNPs of the National Center for Biotechnology Information (37). Neither allele frequencies nor genotypes of the evaluated promoter polymorphisms -297 C/T and -826 C/T were significantly different, comparing patients with and without acute rejection. Genotypes were more diverse in the group with multiple rejections. However, this trend did not reach a significant level. Similar results were observed for patients with and without early acute rejections and for the 126 A/G allele frequencies and genotypes. In comparison, the

Table 3 Demographic and clinical characteristics

Characteristic	NAR (n = 100)	AR (n = 99)	MAR (n = 32)
Gender (male/female)	60/40	60/39	20/12
Age ^a Mean ± SD (year)	54.92 ± 9.34	48.81 ± 11.96 ^b	50.91 ± 12.24
Primary liver disease			
Alcoholic cirrhosis	25	22	5
Chronic active hepatitis B (+HCV/+HDV)	17 (5/3)	11 (0/2)	5 (0/1)
Chronic active hepatitis C	17	10	4
Primary sclerosing cholangitis	7	12	2
Kryptogenic liver cirrhosis	8	8	2
Primary biliary cirrhosis	4	3	1
Autoimmune hepatitis	1	4	1
Fulminant hepatic failure through intoxication	1	4	2
Budd–Chiari-syndrome	1	4	2
Fulminant viral hepatitis (HAV/HBV)	1	3	1
Others	18	18	7
Initial immunosuppression			
TAC + Steroids	19	28	10
CSA + Steroids	22	24	8
CSA + MMF + Steroids	17	15	3
CSA + AZA + Steroids	10	9	2
TAC + MMF + Steroids	7	7	1
CSA + Everolimus + Steroids	7	4	1
TAC + Everolimus + Steroids	7	2	2
Others	11	10	5

AZA, azathioprin, CSA, cyclosporine A; HAV, hepatitis A virus, HBV, hepatitis B virus, HCV, hepatitis C virus, HDV, hepatitis D virus, MMF, mycophenolate mofetil, SD, standard deviation, TAC, tacrolimus.

^aAt the date of transplant (years).

^bAR vs NAR: $P \leq 0.001$.

difference between the 126 A and G allele frequencies was highly significant in recipients with multiple acute rejections [$P = 0.027$ OR (95% CI) 2.39 (1.34–4.25)]. Additionally, the genotype 126 AA, which was tested in a recessive model, showed an association with multiple acute cellular rejections [$P = 0.002$, OR (95% CI): 3.87 (1.59–9.48)]. The results of the genotyping using dynamic allele-specific hybridization with FRET showed a 98% match with the beforehand observed data.

To assess the predictive power of the genotype 126 AA and the A allele for the occurrence of multiple acute rejections we performed a ROC curve analysis. The calculated area under the curve (AUC) was 0.607 (95% CI, 0.528–0.687) for the allele analysis (Figure 1A). The genotype 126 AA tested in a recessive model (AA vs AG + GG) had an AUC of 0.628 (95% CI, 0.551–0.769) (Figure 1B).

Table 5 outlines the results for the estimated haplotypes of the investigated NFKBIA polymorphisms. There was no significant difference determined between the estimated haplotype frequencies in patients with and without acute cellular rejection. However, the frequency of the haplotype

NFKBIA–126G–297C–826C was significantly decreased in patients with multiple acute rejections [$P = 0.009$, OR (95% CI): 0.41 (0.2–0.81)], the haplotype frequencies of NFKBIA–126A–297C–826C and NFKBIA–126A–297T–826T were significantly higher than in patients without acute rejection [$P = 0.03$, OR (95% CI): 1.9 (1.07–3.36) and $P = 0.002$, OR (95% CI): 7.98 (1.75–49.41)]. For estimated haplotypes NFKBIA–126G–297C–826C and NFKBIA–126A–297T–826T P values remained significant after Holm–Bonferroni procedure.

In conclusion, this study showed that individuals with genotype 126 AA are almost four times more likely to develop multiple acute rejection episodes after liver transplantation. Furthermore, the 126 A allele favored the occurrence of recurrent acute rejection episodes. In addition, the haplotypes NFKBIA–126G–297C–826C and NFKBIA–126A–297T–826T appeared to predispose to a decreased or increased susceptibility to multiple acute rejections after liver transplantation.

Discussion

NFKBIA tightly regulates the activation of the NFκB (16). This proinflammatory transcription factor influences the gene expression of several cytokines (38), which are involved in the pathogenesis of acute rejections following liver transplantation (9). Therefore, an imbalance in this regulation might affect the incidence of acute liver graft rejections. Such an imbalance could be based on SNPs in the NFKBIA gene, which may modify the expression level of NFKBIA.

This was the first study to investigate whether the promoter SNPs –297 C/T (rs2233409) and –826 C/T (rs2233406) and another important SNP in 3' UTR of the NFKBIA gene are associated with susceptibility to acute rejections in liver transplant patients. Particularly, genotype NFKBIA 126 AA as well as the haplotype NFKBIA –126A–297T–826T were determined to be potential predictors for the occurrence of recurrent acute rejections following liver transplantation. Additionally, we found an association between the 126 A allele and a susceptibility to recurrent acute rejections.

Different mechanisms determining how these SNPs influence the NFKBIA gene expression have been discussed in detail: –297 C/T is located near to the NFκB binding sites κB2 and κB3 and might reduce the expression rate of NFKBIA (39). This causes probably disequilibrium between NFκB and its inhibitor NFKBIA. Additionally, a software based analysis (TFsearch Version 1.3, Wingender, Braunschweig, Germany, 1998) of the changed nucleotide sequence in the NFKBIA promoter region calculated a possible new binding site of the upstream stimulating factor 1 for the –297T allele. This ubiquitously expressed transcription factor is among others involved in various regulation processes of the immune response. This includes signal pathways of the cell mediated immunity (40), which are part of the basic concept of acute allograft rejection (41). For example, upstream stimulating factor 1 regulates

Table 4 Genotype and allele frequencies of NFKBIA polymorphisms

	SNP	Genotype/ allele	Controls (<i>n</i> = 103) <i>n</i> (%)	NAR (<i>n</i> = 100) <i>n</i> (%)	AR (<i>n</i> = 99) <i>n</i> (%)	MAR (<i>n</i> = 32) <i>n</i> (%)
-297 C/T	rs2233409	CC	62 (60)	66 (66)	68 (69)	22 (69)
		CT	38 (37)	28 (28)	26 (26)	6 (19)
		TT	3 (3)	6 (6)	5 (5)	4 (12)
		C	162 (79)	160 (80)	162 (82)	50 (78)
		T	44 (21)	40 (20)	36 (18)	14 (22)
-826 C/T	rs2233406	CC	54 (52)	56 (56)	55 (56)	18 (56)
		CT	41 (40)	30 (30)	31 (31)	8 (25)
		TT	8 (8)	14 (14)	13 (13)	6 (19)
		C	149 (72)	142 (71)	141 (71)	44 (69)
		T	57 (28)	58 (29)	57 (29)	20 (31)
126 G/A	rs696	GG	40 (39)	36 (36)	35 (35)	6 (18)
		GA	48 (47)	49 (49)	38 (39)	13 (41)
		AA	15 (14)	15 (15)	26 (26)	13 (41)*
		G	128 (62)	121 (60)	108 (55)	25 (39)**
		A	78 (38)	79 (40)	90 (45)	39 (61)

AR, acute rejection; OR, odds ratio; MAR, multiple acute rejections; NAR, no acute rejection; SNP, single nucleotide polymorphism. Tested constellations: allele A (major allele) vs allele B (minor allele); AA vs AB + BB (recessive model); BB vs AA + AB (dominant model); AR vs NAR was additionally corrected by logistic regression analysis for the co-factor age. Regarding MAR vs NAR genotype 126 AA and allele G are significant different respectively.

* *P* (recessive model) = 0.002; odds ratio (95% CI) = 3.87 (1.59–9.48), ** *P* (recessive model) = 0.027; odds ratio (95% CI) = 2.39 (1.34–4.25).

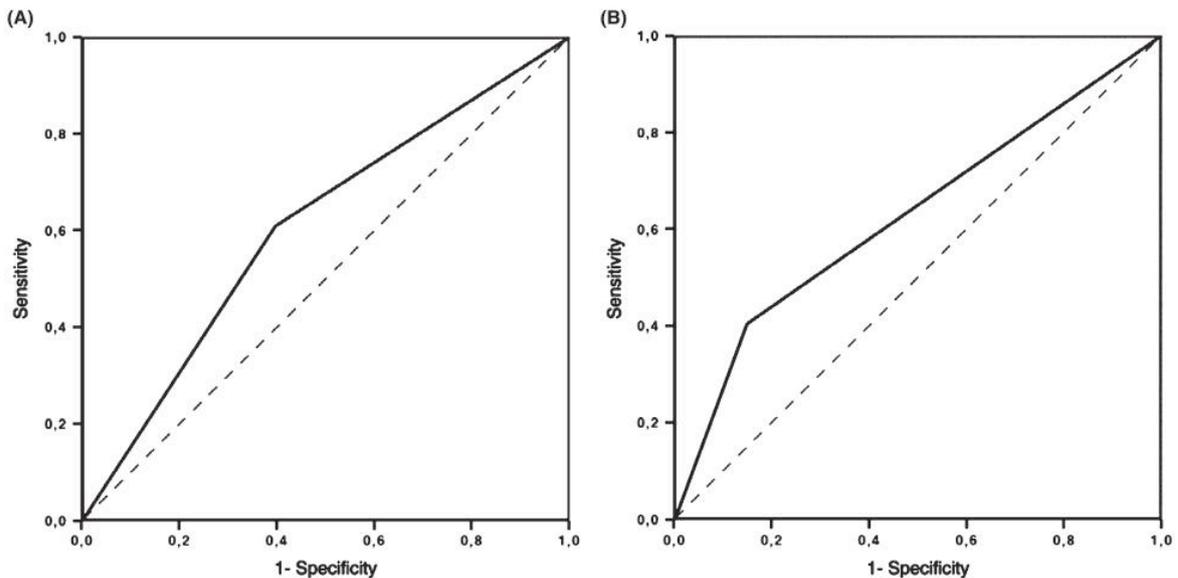


Figure 1 ROC curve analyses to evaluate the predictive power of NFKBIA 126 G/A SNP for the occurrence of multiple acute rejections after liver transplantation. (A) Alleles with area under the curve (AUC) 0.607 (95% CI, 0.528–0.687). (B) Genotype 126 AA tested in a recessive model (AA vs AG + GG) with AUC 0.628 (95% CI, 0.551–0.769).

the β 2-microglobulin transactivation, which is important for the antigen presentation by major histocompatibility complex class I molecules (42). In addition to this, it activates the class II major histocompatibility complex transactivator gene promoter. This activation is necessary for the major histocompatibility class II gene induction by interferon-gamma (43). For

the 826 C/T polymorphism, a binding motif of the transcription factor GATA binding protein 2 is located close to the SNP (24, 44). GATA binding protein 2 is expressed in antigen presenting cells such as monocytes as well as differentiated endothelial cells, and plays an important role in their proliferation and differentiation processes (45, 46). Therefore, these nucleotide

Table 5 Estimated haplotype frequencies of NFKBIA polymorphisms

Haplotype	C (%)	NAR (%)	AR (%)	MAR (%)	AR vs NAR		MAR vs C		MAR vs NAR	
					Odds ratio (95% CI)	P	Odds ratio (95% CI)	P	Odds ratio (95% CI)	P
126G–297C–826C	37	36	34	19	0.89 (0.59–1.35)	0.59	0.39 (0.2–0.77)	0.009*	0.41 (0.2–0.81)	0.009*
126G–297C–826T	5	6	7	9	1.15 (0.53–2.49)	0.73	1.99 (0.69–5.77)	0.36	1.46 (0.53–4.01)	0.46
126G–297T–826C	1	1	0	2	-	-	-	-	-	-
126G–297T–826T	19	17	13	9	0.72 (0.42–1.27)	0.26	0.43 (0.17–1.07)	0.1	0.51 (0.2–1.28)	0.15
126A–297C–826C	34	33	37	48	1.19 (0.79–1.79)	0.42	1.78 (1.01–3.13)	0.04	1.9 (1.07–3.36)	0.03
126A–297C–826T	2	4	4	2	-	-	-	-	-	-
126A–297T–826C	0	1	0	0	-	-	-	-	-	-
126A–297T–826T	2	2	5	11	-	-	8.22 (2.01–32.87)	0.002*	7.98 (1.75–49.41)	0.002*

AR, acute rejection; C, Controls; CI, confidence interval; MAR, multiple acute rejections; NAR, no acute rejection; ROC, Receiver-operating characteristic.

*P remains significant after Holm–Bonferroni procedure.

sequence changes near the GATA binding protein 2 binding site may affect the progression of cellular rejection. Furthermore, Hung *et al.* described a lower promoter activity for the –826 T allele (28). In contrast, 126 G/A is located in the 3' UTR. This region is implicated in regulation processes of gene expression considering nuclear export, polyadenylation status, subcellular targeting as well as translation and degradation of messenger ribonucleic acid through a modification of messenger ribonucleic acid stability (21, 47). Consequently, the A allele appears to reduce the expression rate of NFKBIA and therefore promotes acute rejections following liver transplantation. Nevertheless, this needs to be verified by further functional studies.

These aforementioned complex multifactorial effects corroborate our hypothesis, that the combination of all three SNPs in the NFKBIA–126A–297T–826T haplotype initiates a hyperreactivity of the immune system. This possible functional relevance is in line with our results, as NFKBIA–126A–297T–826T haplotype showed a highly significant association with recurrent acute liver transplant rejections.

To our knowledge, there have been no prior studies dealing with these NFKBIA polymorphisms regarding liver transplantation or acute rejection. However, the –826 T allele is found in the haplotype NFKBIA–297C–519C–550A–826T–881A, which has been linked in prior studies to the occurrence of several autoimmune diseases (24, 25, 28). Moreover, the related haplotype NFKBIA–297T–826T–881G has been described to be associated with sarcoidosis (29). Similar to the haplotype detected in our study, this haplotype includes also the combination of –297T–826T. Sarcoidosis is characterized by an increase in inflammatory activity and a disorder of the cell mediated immune response (48). Owing to this documented association between the NFKBIA–297T–826T–881G haplotype and sarcoidosis, we suspect the SNP combination –297T–826T may predispose to a state of immunologic hyperreactivity. Therefore, this may also manifest as a susceptibility to acute rejections. This hypothesis is supported by recently

published results of Ali *et al.* They reported half the amount of gene transcription for the –297T–826T including promoter haplotype –297T–826T–894G in comparison with the wild-type haplotype in a promoter-less luciferase model in CHO-K1 cells (49). In addition, the investigated genotype NFKBIA 126AA was significantly increased in patients with recurrent acute rejection episodes. This genotype is reported to be associated with Crohn's disease and latent autoimmune diabetes (31, 32). Similar to sarcoidosis, both are enhanced by a dysregulation of the cell mediated immunity (50, 51), which also underlies the pathogenesis of acute allograft rejections (40).

Particularly, recurrent acute rejections challenge long-term transplantation success. At the same time, it is essential to treat transplant recipients with minimized immunosuppressive dosages in order to prevent long-term damages through drug-induced complications. Our results showed that liver transplant recipients with the genotype 126 AA and the haplotype NFKBIA–126A–297T–826T were significantly more probably to suffer from recurrent acute rejections. It has been described, that an AUC >0.50 defines some discriminatory ability and for screening high risk individuals an AUC >0.75 should be applied (52). Unfortunately our AUC values do not reach the level of 0.75. However, the obtained results suggest that the NFKBIA polymorphism 126 G/A (rs696) has some discriminatory ability to separate patients with a risk for multiple acute rejections from those who are less likely to reject.

An adapted immunosuppressive therapy according on such segregations may eventually improve the success of transplantation. However, further prospective studies with larger populations should be performed to verify our results and to determine if the NFKBIA genotype or haplotype is an applicable predictor to calculate the acute rejection risk prior to liver transplantation.

Acknowledgment

The authors thank P. Tiede for her technical assistance.

Conflict of interest

The authors have declared no conflicting interest.

References

- Geissler EK, Schlitt HJ. Immunosuppression for liver transplantation. *Gut* 2009; **58**: 452–63.
- Shaked A, Ghobrial RM, Merion RM et al. Incidence and severity of acute cellular rejection in recipients undergoing adult living donor or deceased donor liver transplantation. *Am J Transplant* 2009; **9**: 301–8.
- Dousset B, Conti F, Cherruau B et al. Is acute rejection deleterious to long-term liver allograft function? *J Hepatol* 1998; **29**: 660–8.
- Watt KD, Pedersen RA, Kremers WK, Heimbach JK, Charlton MR. Evolution of causes and risk factors for mortality post-liver transplant: results of the NIDDK long-term follow-up study. *Am J Transplant* 2010; **10**: 1420–7.
- Bathgate AJ, Hynd P, Sommerville D, Hayes PC. The prediction of acute cellular rejection in orthotopic liver transplantation. *Liver Transpl Surg* 1999; **5**: 475–9.
- Maggard M, Goss J, Ramdev S, Swenson K, Busuttill R. Incidence of acute rejection in African-American liver transplant recipients. *Transplant Proc* 1998; **30**: 1492–4.
- Bathgate AJ, Pravica V, Perrey C et al. The effect of polymorphisms in tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, and transforming growth factor-beta1 genes in acute hepatic allograft rejection. *Transplantation* 2000; **69**: 1514–7.
- Fernandes H, Koneru B, Fernandes N et al. Investigation of promoter polymorphisms in the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genes in liver transplant patients. *Transplantation* 2002; **73**: 1886–91.
- Warlé MC, Metselaar HJ, Hop WCJ, Tilanus HW. Cytokine gene polymorphisms and acute liver graft rejection: a meta-analysis. *Liver Transpl* 2005; **11**: 19–26.
- Liu F, Li B, Wang W-T et al. Interleukin-10 -1082G/A polymorphism and acute liver graft rejection: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2012; **18**: 847–54.
- Karimi MH, Daneshmandi S, Pourfathollah AA et al. Association of IL-6 promoter and IFN- γ gene polymorphisms with acute rejection of liver transplantation. *Mol Biol Rep* 2011; **38**: 4437–43.
- Muro M, Rojas G, Botella C et al. CT60 A/G marker of the 3'-UTR of the CTLA4 gene and liver transplant. *Transpl Immunol* 2008; **18**: 246–9.
- Slavcheva E, Albanis E, Jiao Q et al. Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene polymorphisms and susceptibility to acute allograft rejection. *Transplantation* 2001; **72**: 935–40.
- Marder BA, Schroppe B, Lin M et al. The impact of costimulatory molecule gene polymorphisms on clinical outcomes in liver transplantation. *Am J Transplant* 2003; **3**: 424–31.
- May MJ, Ghosh S. Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Semin Cancer Biol* 1997; **8**: 63–73.
- Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002; **2**: 725–34.
- Zabel U, Baeuerle PA. Purified human I kappa B can rapidly dissociate the complex of the NF-kappa B transcription factor with its cognate DNA. *Cell* 1990; **61**: 255–65.
- Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 2000; **18**: 621–63.
- Wei J-F, Zheng S-S. NF-kappa B in allograft rejection. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003; **2**: 180–3.
- He Y, Zhang H, Yin J et al. IkappaBalpha gene promoter polymorphisms are associated with hepatocarcinogenesis in patients infected with hepatitis B virus genotype C. *Carcinogenesis* 2009; **30**: 1916–22.
- Gao J, Pfeifer D, He L-J et al. Association of NFKBIA polymorphism with colorectal cancer risk and prognosis in Swedish and Chinese populations. *Scand J Gastroenterol* 2007; **42**: 345–50.
- Chapman SJ, Khor CC, Vannberg FO et al. IkappaB genetic polymorphisms and invasive pneumococcal disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; **176**: 181–7.
- Romzova M, Hohenadel D, Kolostova K et al. NFkappaB and its inhibitor IkappaB in relation to type 2 diabetes and its microvascular and atherosclerotic complications. *Hum Immunol* 2006; **67**: 706–13.
- Lin CH, Wang SC, Ou TT et al. I kappa B alpha promoter polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol* 2008; **28**: 207–13.
- Hung YH, Ou TT, Lin CH et al. IkB α promoter polymorphisms in patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int* 2009; **30**: 93–7.
- Ou TT, Lin CH, Lin YC et al. IkappaBalpha promoter polymorphisms in patients with primary Sjögren's syndrome. *J Clin Immunol* 2008; **28**: 440–4.
- Lin CH, Ou TT, Wu CC, Tsai WC, Liu HW, Yen JH. IkappaBalpha promoter polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Immunogenet* 2007; **34**: 51–4.
- Hung YH, Wu CC, Ou TT et al. IkappaBalpha promoter polymorphisms in patients with Behçet's disease. *Dis Markers* 2010; **28**: 55–62.
- Abdallah A, Sato H, Grutters JC et al. Inhibitor kappa B-alpha (IkappaB-alpha) promoter polymorphisms in UK and Dutch sarcoidosis. *Genes Immun* 2003; **4**: 450–4.
- Klein W, Tromm A, Folwaczny C et al. A polymorphism of the NFKBIA gene is associated with Crohn's disease patients lacking a predisposing allele of the CARD15 gene. *Int J Colorectal Dis* 2004; **19**: 153–6.
- Katarina K, Daniela P, Peter N et al. HLA, NFKB1 and NFKBIA gene polymorphism profile in autoimmune diabetes mellitus patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2007; **115**: 124–9.
- Zhang G-L, Zou Y-F, Feng X-L et al. Association of the NFKBIA gene polymorphisms with susceptibility to autoimmune and inflammatory diseases: a meta-analysis. *Inflamm Res* 2011; **60**: 11–8.
- Neil DAH, Hübscher SG. Current views on rejection pathology in liver transplantation. *Transpl Int* 2010; **23**: 971–83.
- Demetris AJ. Terminology for hepatic allograft rejection. *Hepatology* 1995; **22**: 648–54.
- Dudbridge F. Likelihood-based association analysis for nuclear families and unrelated subjects with missing genotype data. *Hum Hered* 2008; **66**: 87–98.
- Holm S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Stat* 1979; **6**: 65–70.

37. The National Center for Biotechnology Information. Popular resources SNP. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
38. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; **16**: 225–60.
39. Mozzato-Chamay N, Corbett EL, Bailey RL, Mabey DC, Raynes J, Conway DJ. Polymorphisms in the IkappaB-alpha promoter region and risk of diseases involving inflammation and fibrosis. *Genes Immun* 2001; **2**: 153–5.
40. Corre S, Galibert MD. Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors. *Pigment Cell Res* 2005; **18**: 337–48.
41. Wood K, Goto R. Mechanisms of rejection: current perspectives. *Transplantation* 2012; **33**: 1–10.
42. Gobin SJP, Biesta P, van den Elsen PJ. Regulation of human beta 2-microglobulin transactivation in hematopoietic cells. *Blood* 2003; **101**: 3058–64.
43. Muhlethaler-Mottet A, Di Berardino W, Otten LA, Mach B. Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon-gamma requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1. *Immunity* 1998; **8**: 157–66.
44. Li R-N, Hung Y-H, Lin C-H, Chen Y-H. Inhibitor IkappaBalpha promoter functional polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol* 2010; **30**: 676–80.
45. Babina M, Schülke Y, Kirchhof L *et al.* The transcription factor profile of human mast cells in comparison with monocytes and granulocytes. *Cell Mol Life Sci* 2005; **62**: 214–26.
46. Sharifi BG, Zeng Z, Wang L *et al.* Pleiotrophin induces transdifferentiation of monocytes into functional endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; **26**: 1273–80.
47. Conne B, Stutz A, Vassalli JD. The 3' untranslated region of messenger RNA: a molecular "hotspot" for pathology? *Nat Med* 2006; **6**: 637–41.
48. Newman LS, Rose CS, Maier LA. Sarcoidosis. *N Engl J Med* 1997; **336**: 1224–34.
49. Ali S, Hirschfeld AF, Mayer ML *et al.* Functional genetic variation in NFKBIA and susceptibility to childhood asthma, bronchiolitis, and bronchopulmonary dysplasia. *J Immunol* 2013; **190**: 3949–58.
50. Gan MJ, Albanese-o'Neill A, Haller MJ. Type 1 diabetes: current concepts in epidemiology, pathophysiology, clinical care, and research. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2012; **42**: 269–91.
51. Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; **3**: 390–407.
52. Reddy SM, Sadim M, Li J *et al.* Clinical and genetic predictors of weight gain in patients diagnosed with breast cancer. *Br J Cancer* 2013; **109**: 872–81.

2. Hintergrund und Fragestellung

1963 führte Thomas E. Strazl als erster Chirurg weltweit bei drei Patienten eine Lebertransplantation durch. Während die ersten Patienten noch während der Operation bzw. wenige Tage danach verstarben (Strazl et al., 1963), gelang es im Laufe der folgenden Jahrzehnte die Lebertransplantation als erfolgreiche Therapie für terminale Lebererkrankungen zu etablieren. Eine grundlegende Voraussetzung für diesen Fortschritt stellt die kontinuierliche pharmakologische Weiterentwicklung der immunsuppressiven Therapie dar (Geissler & Schlitt, 2009). So wurden in Deutschland im Jahr 2013 nach Angaben der Deutschen Stiftung Organtransplantation 884 Lebertransplantationen nach postmortalen Spenden durchgeführt. Die 5-Jahres-Transplantatfunktionsrate lag für in Deutschland erfolgte Lebertransplantationen nach postmortaler Spende für den Beobachtungszeitraum zwischen 2003 bis 2012 (n=8.682) bei 52,6% (DSO Jahresbericht 2013).

Dennoch bleibt die akute Abstoßungsreaktion mit einer Inzidenz von bis zu 30% eine ernstzunehmende Komplikation nach Lebertransplantation (Shaked et al., 2009). Insbesondere das Auftreten von wiederholten Abstoßungsreaktionen kann eine nachhaltige histologische Schädigung des Transplantates bedingen und so die Transplantatfunktion langfristig reduzieren (Dousset et al., 1998).

Dem gegenüber stehen die typischen Nebenwirkungen immunsuppressiver Medikamente, wie Nephrotoxizität, arterielle Hypertonie oder Hyperlipidämie (Geissler & Schlitt, 2009), welche als typische Auslöser der langfristigen Komorbiditäten nach Organtransplantation wie Niereninsuffizienz oder kardiovaskuläre Erkrankungen gelten (Watt et al., 2010). Es ist daher eine der großen Herausforderungen der Transplantationsmedizin ein optimales Gleichgewicht zwischen einer ausreichenden Immunsuppression zur Vermeidung einer Abstoßungsreaktion auf der einen Seite und der Minimierung langfristiger Schädigung des Patienten durch nebenwirkungsbedingten Komplikationen auf der anderen Seite her zu stellen. Eine mögliche Strategie dies zu erreichen ist die Individualisierung der Immunsuppression.

Dabei zeigt die klinische Erfahrung, dass sich Patienten in ihrer Neigung zur Entwicklung von akuten Abstoßungsreaktionen unterscheiden. Eine Identifizierung typischer Risikofaktoren und Entwicklung immunsuppressiver Protokolle, angepasst an ein individuelles Risikoprofil des einzelnen Transplantatempfängers, könnte so

die Langzeitergebnisse im Bezug auf die Transplantatfunktion aber auch Morbidität der Transplantatempfänger weiter verbessern.

Single Nukleotid Polymorphismen (SNPs), die einen Einfluss auf die Immunreaktion haben, erscheinen als Parameter zu Abschätzung des individuellen Risikos besonders vorteilhaft. Sie sind unveränderlich und bereits vor der Transplantation einfach bestimmbar. Daher analysiert diese Studie Polymorphismen im Nuclear Factor of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer in B-Cells Inhibitor Alpha (NFKBA) Gen, als mögliche genetischen Disposition für das Auftreten von akuten Abstoßungsreaktionen nach Lebertransplantation.

Das NFKBIA Gen kodiert für Inhibitor Kappa B Alpha ($I\kappa B\alpha$), den Inhibitor des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor Kappa B ($NF\kappa B$), der eine zentrale Rolle in der Aktivierungskaskade der zellvermittelten Immunantwort spielt (May & Ghosh, 1997).

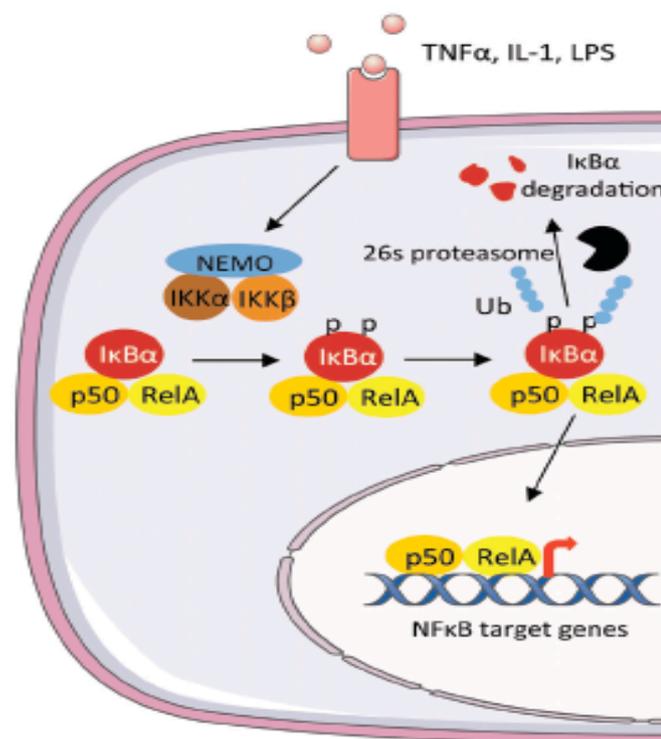


Abbildung 1: Funktion von $I\kappa B\alpha$ bei der Aktivierung des Transkriptionsfaktors $NF\kappa B$ (hier dargestellt durch seine Untereinheiten p50 und RelA) (Viennois, Chen & Merlin, 2013)

In inaktivem Zustand befindet sich $NF\kappa B$, bestehend aus den Untereinheiten p50 und RelA, gebunden an $I\kappa B\alpha$ im Zytoplasma (Li & Verma, 2002). Kommt es nun zur Aktivierung des T-Zellrezeptors wird schließlich im Verlauf der Signalkaskade der

I κ B Kinase Komplexes (IKK) aktiviert. Dies führt zur Phosphorylierung und somit zur Dissoziation von I κ B α und NF κ B. In der weiteren Folge wird I κ B α ubiquitiniert und durch Proteasomen abgebaut. NF κ B liegt so entsprechend mit freigelegter Nukleus-Lokalisierungs-Sequenz (NLS) im Zytosol vor und kann nun in aktivierter Form in den Zellkern diffundieren (Karin & Ben-Neriah, 2000). Dort initiiert NF κ B die Genexpression diverser Gene und führt zu einer Steigerung der Synthese von Interleukin-2, Interleukin-6, Interleukin-12 und TNF α . Diese Chemokine spielen eine zentrale Rolle für die Aktivierung des Immunsystems im Allgemeinen und für die Pathogenese der akuten Abstoßungsreaktion im Speziellen (Wei & Zheng, 2003). So konnte Finn et al. für die Herztransplantation an einem transgenen Mausmodell zeigen, dass das Vorliegen einer potenter inhibierenden Isoform von I κ B α eine akute Abstoßungsreaktion aufhebt und so zu einem längeren Transplantatüberleben führt (Finn et al., 2001).

Das NFKBIA Gen liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms vierzehn. Es besteht aus 3.23 Kilobasenpaaren und ist in sechs Exons organisiert. Insgesamt sind bisher 209 Mutationen beschrieben (NCBI-Gene, 2014). In dieser Arbeit wurden insgesamt drei Polymorphismen in Bezug auf ihr Vorkommen bei Patienten mit akuten Abstoßungsreaktionen nach Lebertransplantation analysiert:

-297 C/T (rs2233409), -826 C/T (rs2233406) und 126 G/A (rs696).

Sie treten in der kaukasischen Bevölkerung mit einer Allelfrequenz von 28% (-297 T-Allel), 30% (-826 T-Allel) bzw. 40% (126 A-Allel) auf (NCBI-SNP, 2014). Zwei der hier analysierten Polymorphismen, -297 C/T und -826 C/T, sind im Promotor des Gens lokalisiert, während sich 126 G/A in der 3' untranslatierten Region (3'UTR) befindet.

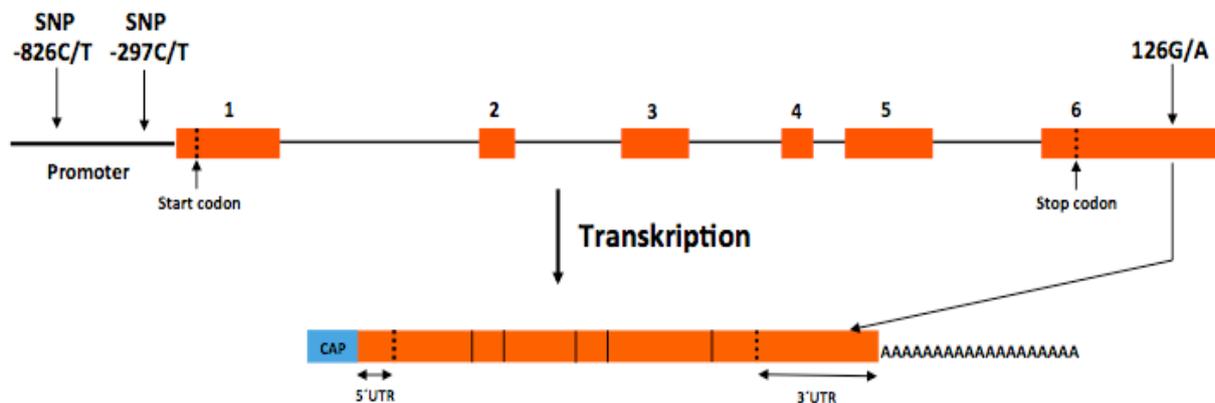


Abbildung 2: Lokalisation der Polymorphismen im NFKBIA-Gen, 3'UTR- 3' untranslatierte Region

Im Fall des Polymorphismus -826 C/T wurde für das T-Allel eine reduzierte Promotoraktivität beschrieben (Hung et al., 2010). Die genaue funktionelle Auswirkung der beiden anderen Polymorphismen ist nicht abschließend geklärt. Jedoch wird für das -297 T-Allel ebenfalls eine reduzierte Promotoraktivität vermutet, da der Polymorphismus in der Nähe der *NFκB* Bindungsstellen κB2 und κB3 lokalisiert ist (Mozzato-Chamay et al., 2001). Im Fall von 126 G/A hingegen wird die Beeinflussung der Proteinbiosynthese auf Ebene der Translation diskutiert (Gao et al., 2007).

Die analysierten SNPs wurden bisher im Zusammenhang mit Karzinogenese (Gao et al., 2007; Y. He et al., 2009), entzündlich oder metabolisch bedingten Krankheitsbildern (Chapman et al., 2007; Cooper et al., 1998) sowie Autoimmunerkrankungen (Abdallah et al., 2003; Hung et al., 2009; Katarina et al., 2007; Klein et al., 2004; Lin et al., 2007; Lin et al., 2008; Ou et al., 2008; Zhang et al., 2011) beschrieben.

Zusammenfassend gehen wir daher davon aus, dass diese Polymorphismen eine Hyperreaktivität des Immunsystems verursacht, welche sich auch in einer erhöhten Neigung zu akuten Abstoßungsreaktionen widerspiegeln könnte. In diesem

Zusammenhang wurden die oben genannten Polymorphismen bisher nicht analysiert. In der Literatur wurden zuletzt Assoziationen von Polymorphismen in den Genen für den TNF α , Interleukin-10, Interleukin-6 und für das zytotoxisches Antigen 4 (CTLA-4) beschrieben (Bathgate et al., 2000; Fernandes et al., 2002; Karimi et al., 2010; Marder et al., 2003; Muro et al., 2008; Slavcheva et al., 2001). Die Ergebnisse sind jedoch widersprüchlich, sodass ein Transfer in die klinische Praxis bisher nicht erfolgte.

3. Material und Methoden

3.1 Kollektive

Wir untersuchten insgesamt 199 Patienten, die zwischen 1993-2010 am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf eine Lebertransplantation erhielten. Darüberhinaus wurden zur Ermittlung der Normverteilung des Polymorphismus als Kontrollgruppe (C) 103 gesunde Blutspender genotypisiert. Diese wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf rekrutiert.

Die eingeschlossenen Individuen stimmten nach ausführlicher Einwilligung schriftlich der genetischen Analyse sowie Auswertung der medizinischen Daten und anonymisierten Speicherung der Ergebnisse zu. Es liegt ein positives Ethikvotum der Ethikkommission Hamburg zur Durchführung der Studie vor.

Die Lebertransplantatempfänger wurden retrospektiv entsprechend ihres Krankheitsverlaufs nach den im Folgenden aufgeführten Kriterien ausgewählt:

Der Beobachtungszeitraum umfasst die Zeitspanne vom Datum der Transplantation bis zum 30.06.2010.

Allgemeine Ausschlusskriterien:

- Unvollständige Dokumentation der Krankengeschichte
- Patienten, die vor 2010 verstarben
- Fehlende Einverständniserklärung oder Untersuchungsmaterial
- Alter < 18 Jahre zum Zeitpunkt der Einwilligung

Die Patienten wurden entsprechend der Frequenz des Auftretens von akuten Abstoßungsreaktionen in drei Gruppen unterteilt. Dabei mussten in jedem Kollektiv alle aufgeführten Kriterien erfüllt sein:

I. Patienten ohne akute Abstoßungsreaktion (NAR) $n=100$:

- Beobachtungszeitraum nach Transplantation von mindestens einem Jahr
- Keine Episoden von erhöhten Transaminasen oder Cholestaseparametern unklarer Genese

II. Patienten mit akuter Abstoßungsreaktion (AR) $n=99$:

- Auftreten innerhalb der ersten 30 Tage nach Lebertransplantation
- Typische laborchemische Veränderungen einer akuten Abstoßung (Erhöhung der Gamma-Glutamyl-Transferase (γ -GT), Alanin-Aminotransferase (ALAT), Aspartat-Aminotransferase (ASAT))
- Transplantatbiopsie mit typischen histologischen Veränderungen (Neil & Hübscher, 2010):
 - Portale oder periportale Hepatitis
Abstoßungsbedingte Cholangitis
 - Endothelitis oder Phlebitis der Portalvenen oder Lebervenen
- Ansprechen auf Glukokortikoid-Bolustherapie mit 500mg Prednisolon intravenös über drei Tage
- Patienten mit einer nachgewiesenen Hepatitis C Virämie (Nachweis in Serum-PCR) nach Transplantation wurden ausgeschlossen

III. Patienten mit mehrfachen akuten Abstoßungsreaktionen (MAR) $n=32$:

- Patienten aus der Gruppe mit akuter Abstoßungsreaktion nach Transplantation, die im Verlauf mindestens eine weitere histologisch gesicherte akute Abstoßungsreaktion entwickelt haben.

3.2 Genotypisierung

Zur Genotypisierung wurde die Polymerase Kettenreaktion- Allelspezifische Restriktionsenzym Analyse (PCR-ASRA) angewendet.

Nach Isolation der Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus den gesammelten EDTA-Vollblutproben unter Verwendung eines kommerziellen Extraktion Säulen Kits (innuPREP Blood DNA Mini Kit, Analytik Jena AG Lifesience, Jena, Deutschland) erfolgte zunächst die Amplifikation der zu untersuchenden Genabschnitte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Im Anschluss wurden die Proben mit einem Polymorphismus spezifischen Restriktionsenzym inkubiert. Je nach Vorliegen des entsprechenden Wildtyps oder Polymorphismus schneidet das Enzym unterschiedlich lange DNA Fragmente. Diese wurden abschließend mit einer Gelelektrophorese aufgetrennt und ausgewertet. Die verwendeten PCR-Protokolle, Primer und Restriktionsenzyme sind Tabelle 1 (siehe zugrundeliegende Publikation Seite sechs) zu entnehmen. Das Prinzip zur Auswertung ist exemplarisch in Abbildung 3 dargestellt. Die Fotografie zeigt ein Elektrophorese-Gel für den Polymorphismus 126 G/A. Das entstandene PCR-Produkt von 424bp wird bei Vorliegen des Wildtyp G-Allels durch das verwendete Restriktionsenzym Hae III (New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) in zwei Fragmente von 306bp und 108bp zerschnitten. Probe eins zeigt somit den Genotyp 126 homozygot A. Die Proben zwei, drei, sechs und sieben sind heterozygot. Wohingegen die Proben vier und fünf den Genotypen 126 homozygot G aufweisen.

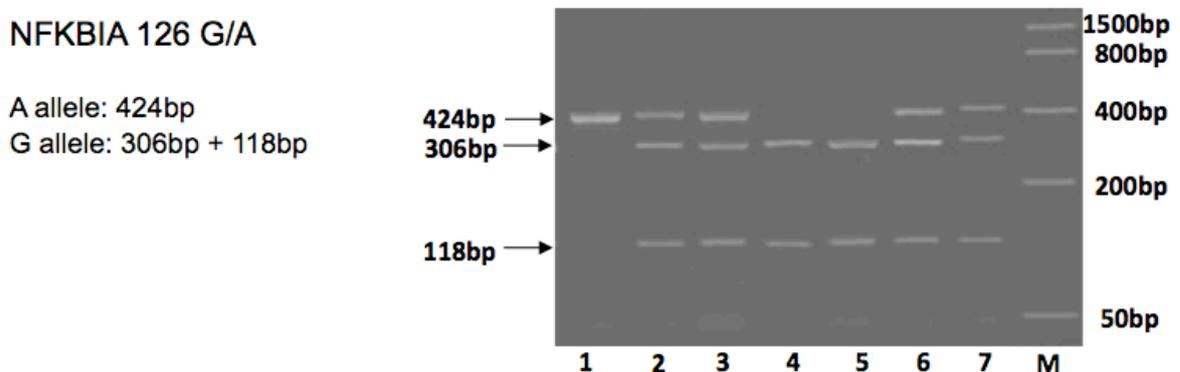


Abbildung 3: Exemplarische Darstellung der Gelelektrophorese-Auswertung für den Polymorphismus 126 G/A; M-Marker, bp- Basenpaare

Zur Überprüfung der Ergebnisse und zur Qualitätssicherung führten wir eine erneute Genotypisierung mittels dynamischer allelspezifischer Hybridisierung, unter Nutzung

des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) zur Visualisierung, durch. Die entsprechenden Primer sowie Anchor- bzw. Sensor-Oligonukleotide finden sich in Tabelle 2 (siehe zugrundeliegende Publikation Seite sechs).

3.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte in Kooperation mit Dr. A. Treszl, der zu diesem Zeitpunkt Mitarbeiter des Institutes für Medizinische Biometrie und Epidemiologie an der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf war. Als statistisch signifikantes Niveau wurde ein p-Wert von ≤ 0.05 festgelegt. Für die statistische Auswertung der Genotypen testeten wir sowohl ein rezessives als auch ein dominantes Modell. Im Falle eines rezessiven Modells bedeutet dies, dass man nur bei Individuen mit einem homozygoten Genotyp des Polymorphismus von einer phänotypischen Ausprägung ausgeht. In diesem Setting also beispielsweise 126 AA versus 126 GA und 126 GG. Bei einem dominanten Modell wird hingegen bereits der heterozygote Genotyp als phänotypisch relevant angesehen und somit im oben genannten Beispiel der Genotyp 126 GG gegen das Restkollektiv getestet.

Zur Auswertung der klinischen und demografischen Charakteristika der eingeschlossenen Individuen sowie der Allel- und Genotypfrequenzen verwendeten wir den Studentischen T-Test, den Chi-Quadrat Test sowie den Fisher Exakt Test, logistische Regression, Receiver Operating Characteristic (ROC) Kurven Analyse unter der Verwendung der Software R 2.13.2 (R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich), SPSS Statistics 22 (IBM, Armonk, New York, USA) und SAS 9.2 (SAS Institute Inc. Cary, North Carolina, USA).

Die Schätzung der Haplotypen erfolgte mit der Genetik Software „Unphased 3.1.5“ (Dudbridge, 2008, MRC Biostatistics Unit, Cambridge, Großbritannien). Zusätzlich führten wir eine Korrektur der Ergebnisse entsprechend der Holm-Bonferroni Methode durch (Holm, 1979).

4. Ergebnisse und Diskussion

Entsprechend der vorrausgehend aufgeführten Kriterien wurden insgesamt 199 Lebertransplantatempfänger analysiert. Hiervon erlitten 99 Patienten eine frühe akute Abstoßung (AR), während 100 Patienten keine Abstoßungsreaktion aufwiesen. Aus der Gruppe mit akuten Abstoßungsreaktionen kam es bei 32

Individuen zu wiederholten histologisch gesicherten akuten Abstoßungsreaktionen ($n \geq 2$). In unserer Studie zeigten sich mit Ausnahme des Alters zum Zeitpunkt der Transplantation keine signifikanten Unterschiede zwischen den verglichenen Kohorten in Bezug auf Geschlecht, Grunderkrankung oder verwendetes immunsuppressives Regime (siehe Tabelle 3 zugrundeliegende Publikation Seite sieben). Die ausgewerteten Polymorphismen wichen nicht signifikant vom Hardy Weinberg Gleichgewicht ab. Die Ergebnisse der Allelfrequenzen und Genotypisierung sind in Tabelle 4 (siehe zugrundeliegende Publikation Seite acht) zusammengefasst. Dabei zeigt sich für alle drei untersuchten Polymorphismen eine ähnliche Verteilung der Genotypen im Kollektiv ohne akute Abstoßung im Vergleich zum herangezogenen gesunden Kontrollkollektiv, so dass insgesamt nicht von einem abweichenden Auftreten bei Lebertransplantierten im Allgemeinen auszugehen ist. Für die Promotorpolymorphismen -297 C/T und -826 C/T unterschieden sich weder die Genotypen- noch die Allelfrequenzen signifikant zwischen den verglichenen Kollektiven. Zwar zeigten sich größere Unterschiede zwischen den Individuen mit mehrfachen akuten Abstoßungen und einmaliger akuter Abstoßung im Vergleich zu den Patienten die keine Abstoßung erlitten, jedoch ohne signifikante Relevanz. Dagegen beobachteten wir eine Assoziation mit mehrfach akuten Abstoßungen für das 126 A Allel, welches im Kollektiv mit mehrfach akuter Abstoßungsreaktion mit einer gesteigerten Frequenz von 60%, im Vergleich zu den Transplantatempfängern ohne Abstoßungsreaktion mit nur 40%, auftrat ($P = 0.027$, Odds Ratio (95% Konfidenzintervall): 2.39 (1.34 - 4.25)). Ähnliches zeigte sich auch für den Genotypen 126 AA, der mit einer Häufigkeit von 41% versus 15% in einem rezessiven Modell signifikant häufiger vorlag ($P = 0.002$, Odds Ratio (95% Konfidenzintervall): 3.87 (1.59 - 9.48)).

Der Single Nukleotid Polymorphismus 126 G/A liegt in der 3' untransplantierten Region (3'UTR). Dieser Genabschnitt spielt eine wichtige Rolle im Rahmen der Genexpression und beeinflusst unter anderem den nukleären Export, den Polyadenylierungs-Status, die subzelluläre Adressierung sowie die Translation und Degradierung der messenger Ribonukleinsäure (mRNA) (Conne, Stutz & Vassalli, 2000). In Anbetracht unserer Ergebnisse gehen wir daher davon aus, dass der untersuchte Polymorphismus mit einer verminderten Proteinbiosynthese von $I\kappa B\alpha$ einhergeht und somit eine Neigung zu akuten Abstoßungsreaktionen bedingt. Der

genaue funktionelle Zusammenhang auf Zellebene muss jedoch noch geklärt werden. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Phosphorylierung von I κ B α nur einer von verschiedenen Aktivierungsmöglichkeiten von NF κ B ist (Viennois, Chen & Merlin, 2013). Auch die Auswirkung der zur Immunsuppression verwendeten Glukokortikoiden auf die NF κ B-Signalkaskade könnte die beobachteten Ergebnisse beeinflusst haben (Auphan et al., 1995; Scheinman et al., 1995). Eine Steroidresistenz im Rahmen der Abstoßungstherapie wurde bei den hier untersuchten Patienten jedoch nicht beobachtet. Die Abschätzung der vorliegenden Haplotypen mittels der Genetik-Software „*Unphased 3.1.5*“ ist in Tabelle 5 dargestellt (siehe zugrundeliegende Publikation Seite neun). Diese ergab ein signifikant häufigeres Auftreten des Haplotypen NFKBIA-126G-297C-826C ($P = 0.009$, Odds Ratio (95% Konfidenzintervall): 0.41 (0.2 - 0.81)) in der Gruppe ohne akute Abstoßungsepisoden im Vergleich zu Patienten mit mehrfach akuten Abstoßungen, wohingegen der Haplotyp NFKBIA-126A-297T-826T signifikant seltener vorkam ($P = 0.002$, Odds Ratio (95% Konfidenzintervall): 7.98 (1.75 - 49.41)). Da es insbesondere bei geringer Anzahl von Individuen beziehungsweise niedrigen Haplotypfrequenzen zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann, führten wir zusätzlich Korrektur der Ergebnisse entsprechend der Holm-Bonferroni Methode durch.

Das -826T Allel ist Bestandteil des Haplotypen NFKBIA-297C-519C-550A-826T-881A, der in früheren Studien wiederholt in Zusammenhang mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen beschrieben wurde (Hung et al., 2009, 2010; Chia-Hui Lin et al., 2008). Darüber hinaus wurde für den Haplotyp NFKBIA-297T-826T-881G, welcher wie in unserer Studie die Kombination -297T-826T enthält, eine Assoziation mit Sarkoidose beschrieben (Abdallah et al., 2003). Sarkoidose ist charakterisiert durch eine erhöhte inflammatorische Aktivität und eine Dysregulation der zellvermittelten Immunantwort (Newman, Rose & Maier, 1997). Es wäre daher also eine Hyperreaktivität des Immunsystems, die sich in einer Neigung zu akuten Abstoßungsreaktionen nach Transplantation manifestiert, denkbar. Diese Annahme wird gestützt durch die Ergebnisse von der Arbeitsgruppe von Ali et al., die für den Haplotypen NFKBIA-297T-826T-894G im Vergleich zum Wildtyp eine um die Hälfte reduzierte Gentranskriptionsrate in einem promotorlosen Luziferase-Modell mit CHO-K1 Zellen beobachtete (Ali et al., 2013).

Für den Genotypen 126 AA ist eine Assoziation mit Morbus Crohn sowie latenten autoimmunem Diabetes beschrieben (Katarina et al., 2007; Klein et al., 2004). Bei diesen Erkrankungen steht pathogenetisch, wie auch für die akute Abstoßung anzunehmen, die Dysregulation der zellvermittelten Immunantwort im Vordergrund (Gan et al., 2012; Sartor, 2006). Um die prädiktive Aussagekraft des Genotypen 126 AA für die Entwicklung mehrfacher akuter Abstoßungsreaktionen nach Lebertransplantation einzuordnen führten wir eine ROC-Kurven-Analyse durch. Hier zeigte sich mit einer Area under the curve (AUC) von 0.62 (95% Konfidenzintervall: 0.551-0.769) nur eine mäßige Trennschärfe für den Genotypen 126 AA, um Patienten mit einem hohen Risiko für mehrfache akute Abstoßungsreaktionen von solchen die keine Neigung haben, zu separieren. Dies erklärt sich zum einen durch die für eine genetische Analyse eher kleinen Kollektivgrößen, insbesondere die geringe Anzahl von Transplantatempfängern mit mehrfach akuten Abstoßungen, zum anderen durch die niedrige Frequenz des identifizierten Risikogenotyps 126 AA von 14% in der Normalbevölkerung.

Zusätzlich bleibt bei der Einordnung der Ergebnisse die heterogene Zusammensetzung der Patientenkollektive im Bezug auf Immunsuppression und Grunderkrankung zu berücksichtigen. Zwar konnte in dieser Analyse mit Ausnahme des Alters bei Transplantation kein relevanter klinischer oder demografischer Risikofaktor identifiziert werden, jedoch sind in der Literatur ein erhöhtes Spenderalter, die zu Grunde liegende Lebererkrankung und ihre Ausprägung sowie Unterschiede in der ethnischen Zugehörigkeit als Einflussgrößen der Inzidenz von akuten Abstoßungsreaktionen nach Lebertransplantation beschrieben (Bathgate et al., 1999; Maggard et al., 1998). Die Einbindung des Polymorphismus in ein multivariantes Modell, welches diese Faktoren berücksichtigt, könnte eine Anwendung als Prognoseparameter im klinischen Alltag ermöglichen. Um dies abschließend zu beurteilen und unsere Ergebnisse zu verifizieren werden zukünftig weitere, prospektive Studien mit einer größeren Anzahl von Individuen benötigt werden.

5. Literaturverzeichnis

- Abdallah, A., Sato, H., Grutters, J.C., Veeraraghavan, S., Lympny, P.A., Ruven, H.J.T. et al. (2003). Inhibitor kappa B-alpha (IkappaB-alpha) promoter polymorphisms in UK and Dutch sarcoidosis. *Genes and Immunity*, 4 (6), 450–454.
- Ali, S., Hirschfeld, A.F., Mayer, M.L., Fortuno, E.S., Corbett, N., Kaplan, M. et al. (2013). Functional genetic variation in NFKBIA and susceptibility to childhood asthma, bronchiolitis, and bronchopulmonary dysplasia. *Journal of immunology*, 190 (8), 3949–58.
- Auphan, N., DiDonato, J. A., Rosette, C., Helmborg, A., & Karin, M. (1995). Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science*, 270(5234), 286–290.
- Bathgate, A. J., Hynd, P., Sommerville, D., & Hayes, P. C. (1999). The prediction of acute cellular rejection in orthotopic liver transplantation. *Liver Transplantation and Surgery*, 5(6), 475–479.
- Bathgate, A.J., Pravica, V., Perrey, C., Therapondos, G., Plevris, J.N., Hayes, P.C. et al. (2000). The effect of polymorphisms in tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, and transforming growth factor-beta1 genes in acute hepatic allograft rejection. *Transplantation*, 69 (7), 1514–7.
- Chapman, S.J., Khor, C.C., Vannberg, F.O., Frodsham, A., Walley, A., Maskell, N.A. et al. (2007). IkappaB genetic polymorphisms and invasive pneumococcal disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 176 (2), 181–187.
- Conne, B., Stutz, A. & Vassalli, J.D. (2000). The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular "hotspot" for pathology? *Nature medicine*, 6 (6), 637–41. doi:10.1038/76211.

Cooper, M., Lindholm, P., Pieper, G., Seibel, R., Moore, G., Nakanishi, A. et al. (1998). Myocardial nuclear factor-kappaB activity and nitric oxide production in rejecting cardiac allografts. *Transplantation*, 66 (7), 838–844.

DSO Jahresbericht 2013, S. 77-79; die Daten zur Transplantatfunktionsrate beziehen sie auf die Collaborative Transplant Study (CTS) der Universität Heidelberg (<http://www.ctstransplant.org>). Verfügbar unter: http://www.dso.de/uploads/tx_dsodl/JB_2013_Web_05.pdf; (Stand 20.08.2014; 18.30Uhr).

Dousset, B., Conti, F., Cherruau, B., Louvel, A., Soubrane, O., Houssin, D. et al. (1998). Is acute rejection deleterious to long-term liver allograft function? *Journal of hepatology*, 29 (4), 660–8.

Dudbridge, F. (2008). Likelihood-based association analysis for nuclear families and unrelated subjects with missing genotype data. *Human Heredity*, 66 (2), 87–98.

Fernandes, H., Koneru, B., Fernandes, N., Hameed, M., Cohen, M.C., Raveche, E. et al. (2002). Investigation of promoter polymorphisms in the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genes in liver transplant patients. *Transplantation*, 73 (12), 1886–91.

Finn, P.W., Stone, J.R., Boothby, M.R. & Perkins, D.L. (2001). Inhibition of NF-kappaB-dependent T cell activation abrogates acute allograft rejection. *The Journal of Immunology*, 167 (10), 5994–6001.

Gan, M.J., Albanese-O'Neill, A. & Haller, M.J. (2012). Type 1 Diabetes: Current Concepts in Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Care, and Research. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 42 (10), 269–291.

Gao, J., Pfeifer, D., He, L.-J., Qiao, F., Zhang, Z., Arbman, G. et al. (2007). Association of NFKBIA polymorphism with colorectal cancer risk and prognosis in Swedish and Chinese populations. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 42 (3), 345–350.

- Geissler, E.K. & Schlitt, H.J. (2009). Immunosuppression for liver transplantation. *Gut*, 58 (3), 452–463.
- He, Y., Zhang, H., Yin, J., Xie, J., Tan, X., Liu, S. et al. (2009). IkappaBalpha gene promoter polymorphisms are associated with hepatocarcinogenesis in patients infected with hepatitis B virus genotype C. *Carcinogenesis*, Oxford University Press, 30 (11), 1916–1922.
- Holm, S. (1979). A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*, 6 (2), 65–70.
- Hung, Y.-H., Ou, Tsan-Teng, Lin, Chia-Hui, Li, R.-N., Lin, Y.-C., Tsai, Wen-Chan et al. (2009). IkB α promoter polymorphisms in patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatology International*, 30 (1), 93–97.
- Hung, Y.-H., Wu, Cheng-Chin, Ou, Tsan-Teng, Lin, Chia-Hui, Li, R.-N., Lin, Y.-C. et al. (2010). IkappaBalpha promoter polymorphisms in patients with Behçet's disease. *Disease Markers*, 28 (1), 55–62.
- Karimi, M.H., Daneshmandi, S., Pourfathollah, A.A., Geramizadeh, B., Malekhosseini, S.A., Nikeghbalian, S. et al. (2010). Association of IL-6 promoter and IFN- γ gene polymorphisms with acute rejection of liver transplantation. *Molecular Biology Reports*, 0 (1982), 1–12.
- Karin, M. & Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annual Review of Immunology*, 18, 621–663.
- Katarina, K., Daniela, P., Peter, N., Marianna, R., Pavlina, C., Stepanka, P. et al. (2007). HLA, NFKB1 and NFKBIA gene polymorphism profile in autoimmune diabetes mellitus patients. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes*, 115 (2), 124–9.
- Klein, W., Tromm, A., Folwaczny, C., Hagedorn, M., Duerig, N., Epplen, J.T. et al. (2004). A polymorphism of the NFKBIA gene is associated with Crohn's disease patients lacking a predisposing allele of the CARD15 gene. *International journal of colorectal disease*, 19 (2), 153–6.

- Li, Q. & Verma, I.M. (2002). NF-kappaB regulation in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 2 (10), 725–34. Nature Publishing Group.
- Lin, C-H, Ou, T-T, Wu, C-C, Tsai, W-C, Liu, H-W & Yen, J-H. (2007). IkappaBalph promoter polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis. *International Journal of Immunogenetics*, 34 (1), 51–54.
- Lin, Chia-Hui, Wang, S.-C., Ou, Tsan-Teng, Li, R.-N., Tsai, Wen-Chan, Liu, Hong-Wen et al. (2008). I kappa B alpha promoter polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of Clinical Immunology*, 28 (3), 207–213.
- Maggard, M., Goss, J., Ramdev, S., Swenson, K., & Busuttil, R. W. (1998). Incidence of acute rejection in African-American liver transplant recipients. *Transplantation proceedings*, 30(4), 1492–4.
- Marder, B.A., Schroppel, B., Lin, M., Schiano, Thomas, Parekh, R., Tomer, Yaron et al. (2003). The Impact of Costimulatory Molecule Gene Polymorphisms on Clinical Outcomes in Liver Transplantation. *American Journal of Transplantation*, 3 (4), 424–431.
- May, M.J. & Ghosh, S. (1997). Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Seminars in Cancer Biology*, 8 (2), 63–73.
- Mozzato-Chamay, N., Corbett, E.L., Bailey, R.L., Mabey, D.C., Raynes, J. & Conway, D.J. (2001). Polymorphisms in the IkappaB-alpha promoter region and risk of diseases involving inflammation and fibrosis. *Genes and Immunity*, 2 (3), 153–155.
- Muro, M., Rojas, G., Botella, C., Miras, M., Campillo, J.A., Minguela, A. et al. (2008). CT60 A/G marker of the 3'-UTR of the CTLA4 gene and liver transplant. *Transplant immunology*, 18 (3), 246–9.
- NCBI-Gene. (n.d.). NFKBIA nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4792>; (Stand: 27.09.2014, 20Uhr)

NCBI-SNP. (n.d.). Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs2233409. Verfügbar unter:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2233409;(Stand: 27.09.2014, 20Uhr)

NCBI-SNP. (n.d.). Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs2233406. Verfügbar unter:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2233406;(Stand: 27.09.2014, 20Uhr)

NCBI-SNP. (n.d.). Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs696. Verfügbar unter:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=696;(Stand: 27.09.2014, 20Uhr)

Neil, D.A.H. & Hübscher, S.G. (2010). Current views on rejection pathology in liver transplantation. *Transplant international official journal of the European Society for Organ Transplantation*, 23 (10), 971–983.

Newman, L.S., Rose, C.S. & Maier, L.A. (1997). Sarcoidosis. *The New England journal of medicine*, 336 (17), 1224–34.

Ou, Tsan-Teng, Lin, Chia-Hui, Lin, Y.-C., Li, R.-N., Tsai, Wen-Chan, Liu, Hong-Wen et al. (2008). IkappaBalpha promoter polymorphisms in patients with primary Sjögren's syndrome. *Journal of Clinical Immunology*, 28 (5), 440–444.

Sartor, R.B. (2006). Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nature clinical practice Gastroenterology hepatology*, 3 (7), 390–407.

Scheinman, R. I., Cogswell, P. C., Lofquist, A. K., & Baldwin, A. S. (1995). Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science*, 270(5234), 283–286.

Shaked, A., Ghobrial, R.M., Merion, R.M., Shearon, T.H., Emond, J.C., Fair, J.H. et al. (2009). Incidence and severity of acute cellular rejection in recipients

undergoing adult living donor or deceased donor liver transplantation. *American journal of transplantation*, 9 (2), 301–308.

Slavcheva, E., Albanis, E., Jiao, Q., Tran, H., Bodian, C., Knight, R. et al. (2001). Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene polymorphisms and susceptibility to acute allograft rejection. *Transplantation*, 72 (5), 935–40.

Strazl, T.E., Marchioro, T.L., Vonkaulla, K.N., Hermann, G., Brittain, R.S. & Waddell, W.R. (1963). Homotransplantation of the liver in humans. *Surgery, gynecology & obstetrics*, 117, 659–76.

Viennois, E., Chen, F. & Merlin, D. (2013). NF- κ B pathway in colitis-associated cancers. *Translational gastrointestinal cancer*, 2 (1), 21–29..

Watt, K.D.S., Pedersen, R.A., Kremers, W.K., Heimbach, J.K. & Charlton, M.R. (2010). Evolution of causes and risk factors for mortality post-liver transplant: results of the NIDDK long-term follow-up study. *American journal of transplantation*, 10 (6), 1420–7.

Wei, J.-F. & Zheng, S.-S. (2003). NF-kappa B in allograft rejection. *Hepatobiliary pancreatic diseases international*, 2 (2), 180–183.

Zhang, G.-L., Zou, Y.-F., Feng, X.-L., Shi, H.-J., Du, X.-F., Shao, M.-H. et al. (2011). Association of the NFKBIA gene polymorphisms with susceptibility to autoimmune and inflammatory diseases: a meta-analysis. *Inflammation research*, 60 (1), 11–8.

6. Abkürzungsverzeichnis

ALAT	Alanin-Aminotransferase
AR	Patientenkollektiv mit akuter Abstoßung
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
AUC	Area Under the Curve
AZA	Azathioprin
bp	Basenpaare
C	Kontrollgruppe
CHO	Chinese Hamster Ovary
CSA	Ciclosporin A
CTS	Colaborative Transplant study
DNA	Desoxyribonucleinacid
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
FRET	Förster-Resonanzenergietransfers
γ-GT	Gamma-Glutamyl-Transferase
HAV	Hepatitis A Virus
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HDV	Hepatitis D Virus
IKK	Inhibitor Kappa Kinase Komplex
IκBα	Inhibitor Kappa B Alpha
KI	Konfidenzintervall
M	Marker
MAR	Patientenkollektiv mit mehrfach akuten Abstoßungen
MMF	Mycophenolat Mofetil
mRNA	messenger Ribonucleinacid
NAR	Patientenkollektiv ohne akute Abstoßung
NFKBIA	Nuclear Factor of Kappa Light Polypeptide Gene Enhance in B-Cells Inhibitor Alpha
NFκB	Nuclear Factor Kappa B
NLS	Nukleus Lokalisierungs Sequenz
OR	Odds Ratio
PCR	Polymerasekettenreacion

PCR-ASRA	Polymerasekettenreaction-Allel spezifische Restriktionsenzym Analyse
ROC	Receiver Operatin Characteristic
SD	Standartabweichung
SNP	Single Nukleotid Polymorphismus
TAC	Tacrolimus

7. Lebenslauf

Februar 1988	Geboren in Stuttgart
Juli 2007	Abitur am Gymnasium Renningen
Oktober 2007 bis November 2013	Studium der Humanmedizin am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf <i>vorklinisches Wahlfach: Molekulare Mechanismen der Tumorentstehung und Therapie</i>
September 2009	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung <i>Klinische Wahlfach: Experimentelle Hepatologie</i>
November 2013	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Dezember 2013	Approbation
Seit Januar 2014	Assistenzärztin in der Klinik für Hepatobiliäre Chirurgie Transplantationschirurgie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Publikationen

„Polymorphism in NFKBIA gene is associated with recurrent acute rejections in liver transplant recipients.“ Kramer K, Thye T, Treszl A, Peine S, Koch M, Sterneck M, Nashan B, Thude H.; *Tissue Antigens* 2014 Oct;84(4):370-7.

„Lack of association between CD40 polymorphisms and acute rejection in German liver transplant recipients.“ Thude H, Kramer K, Koch M, Peine S, Sterneck M, Nashan B; *Human Immunology* 2014 Oct 11;75(11):1123-1127

8. Danksagung

Bei der Erstellung dieser Promotion haben mich viele Personen unterstützt und ich möchte gerne an dieser Stelle die Möglichkeit nutzen um mich bei Ihnen zu bedanken. Zunächst danke ich meine Doktormutter Frau Prof. Dr. Martina Sterneck für die Vergabe des Themas und die vorbildliche Betreuung bei der Erstellung dieser Dissertationsschrift. Darüber hinaus danke ich Prof. Dr. med. Nashan für die Möglichkeit der Durchführung meiner Dissertation in seiner Klinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie. Weiterhin danke ich Frau Prof. Dr. Martina Koch sowie Dr. Thorsten Thye für den konstruktiven wissenschaftlichen Austausch, der diese Arbeit sehr bereichert hat.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Hansjörg Thude für die Konzeption dieser spannenden Studie aber vor allem für die kontinuierliche engagierte Betreuung dieser Arbeit sowohl während der experimentellen Phase als auch bei der Publikation unserer Ergebnisse. Diese Dissertation wäre ohne seinen Zuspruch und seinen qualifizierten Rat nicht möglich gewesen.

Jaqueline Triankowski und Anna Schipler danke ich für ihre Hilfe bei der Sammlung der Patientenproben sowie Erhebung der Patientendaten. Ich danke Frau Petra Thiede für große Hilfsbereitschaft während der experimentellen Phase sowohl bei methodischen als auch bei organisatorischen Anliegen.

Bei Dr. Andras Treszl möchte ich mich für die hervorragende statistische Betreuung bei der Analyse meiner Ergebnisse bedanken.

Ferner danke ich herzlich meiner Schwester Anne Kramer und Sebastian Auray, die sich viel Zeit für die Durchsicht sowie Formatierung dieser Arbeit genommen haben und ihre vielen aufmunternden Worten in mühsamen Phasen dieser Dissertation.

Abschließend danke ich ganz besonders meinen Eltern Martina und Gerhard Kramer auf deren bedingungslosen Rückhalt ich mich immer verlassen kann. Sie und meine beiden Großvätern Erwin Renz und Wolfgang Kramer haben mir mein Studium überhaupt erst ermöglicht.

9. Erklärung zum Eigenanteil an der Publikation

Die Konzeption der Studie und deren Planung unterlag Dr. H. Thude, der auch für die praktische Betreuung des gesamten Dissertationsprozesses verantwortlich war. Frau Prof. Dr. M. Koch, Frau Prof. Dr. M. Sterneck sowie Herr Prof. Dr. Nashan waren in der Planungsphase bei der Festlegung der Auswahlkriterien der Kollektive beratend tätig. Die Rekrutierung der Studienteilnehmer erfolgte über die Lebertransplantationsambulanz (unter der Leitung von Frau Prof. Dr. M. Sterneck) sowie die Abteilung für Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie (unter der Leitung von Herr Prof. Dr. B. Nashan) am Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf. Die als Kontrollgruppe genotypisierten Proben der Blutspender wurden in Kooperation mit dem Institut für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf (unter der Leitung von Herr Dr. S. Peine) gesammelt. Die Sammlung der Proben sowie Erhebung der Patientendaten erfolgte gemeinsam mit der damaligen Promotionsstudentin Frau Anna D. Schipler. Diese war neben Frau P. Tiede, der Medizinisch-Technischen Laborassistentin unserer Arbeitsgruppe, und mir selbst auch an der DNA-Isolation aus den gesammelten Blutproben beteiligt. Die Genotypisierung der Proben mittels Polymerase Kettenreaktion- Allelspezifische Restriktionsenzym Analyse (PCR-ASRA) und Auswertung der Ergebnisse erfolgte selbstständig, nach Etablierung der Methodik in Zusammenarbeit mit Dr. H. Thude. In die statistischen Verfahren bin ich durch Dr. A. Treszl eingewiesen worden. Alle statistischen Auswertungen habe ich eigenverantwortlich durchgeführt, mit Ausnahme der logistischen Regressions-Analysen, die von Dr. Treszl berechnet wurden. Die Re-Genotypisierung unter Verwendung von dynamischer allelspezifischer Hybridisierung erfolgte in enger Kooperation mit Herrn Dr. T. Thye am Bernhard-Nocht-Institut Hamburg (Abteilung für Molekulare Medizin). Dieser half darüber hinaus bei der Auswahl einer geeigneten Genetik-Software zur Durchführung der Haplotypenschätzung. Die in der Publikation enthaltenen Tabellen und Abbildungen sowie der Publikationstextes selbst wurden eigenständig erstellt. Herr Dr. H. Thude begleitete den gesamten Publikationsprozess.

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Hamburg, den 24. Januar 2015

Unterschrift: