

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie

Prof. Dr. med. Björn Nashan

Suche nach Genpolymorphismen im CD40- und NFKBIA Gen als Biomarker für akute Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantation

Dissertation

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

vorgelegt von:

Marie Teresa Nawka
aus Hamburg

Hamburg 2015

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 11.02.2016

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
Hamburg.

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: Prof. Dr. Martina Koch

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. Oliver Steinmetz

Prüfungsausschuss, dritter Prüfer: Prof. Dr. Christian Kubisch

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
1. EINLEITUNG	1
1.1. ALLGEMEINES	1
1.2. TRANSPLANTATIONSIMMUNOLOGIE	1
1.2.1. DAS HLA (HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN)-SYSTEM	1
1.2.2. FORMEN DER ABSTOßUNG	5
1.2.2.1. HYPERAKUTE ABSTOßUNGSREAKTION	7
1.2.2.2. AKUTE ABSTOßUNGSREAKTION	8
1.2.2.2.1. AKUTE ZELLULÄRE ABSTOßUNGSREAKTION	9
1.2.2.2.2. AKUTE VASKULÄR-HUMORALE ABSTOßUNGSREAKTION	9
1.2.2.3. CHRONISCHE TRANSPLANTATNEPHROPATHIE	9
1.2.2.4. IMMUNSUPPRESSIVE THERAPIE	10
1.3. BIOMARKER	11
1.3.1. CD40-PROTEIN	11
1.3.2. NFκB UND IκBα	12
1.4. EINZELNUKLEOTID-POLYMORPHISMUS (SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM)	15
1.5. BEDEUTUNG DER UNTERSUCHTEN GENPOLYMORPHISMEN	15
1.6. FRAGESTELLUNG	17
2. MATERIAL UND METHODEN	18
2.1. VERWENDETE MATERIALIEN	18
2.1.1. CHEMIKALIEN	18
2.1.2. VERBRAUCHSMATERIAL	18
2.1.3. GERÄTE	19
2.1.4. PRIMER	19
2.1.5. RESTRIKTIONSENZYME	20
2.1.6. COMPUTERSOFTWARE	21
2.2. PATIENTENDATEN UND PATIENTENKOLLEKTIVE	21
2.3. PATIENTEN-DNA	24
2.4. GENOTYPISIERUNG	25
2.4.1. POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)	26
2.4.2. PRÄZIPITATION DER PCR-AMPLIFIKATE	28
2.4.3. RESTRIKTIONSENZYMVERDAU	29
2.5. GELELEKTROPHORESE	31
2.6. STATISTISCHE METHODEN	32
2.6.1. T-TEST	32
2.6.2. EXAKTER FISHER TEST	33
2.6.3. HARDY-WEINBERG-GESETZ	33
2.6.4. DOMINANTE UND REZESSIVE VERERBUNGSGÄNGE DER POLYMORPHISMEN	33
3. ERGEBNISSE	35
3.1. CHARAKTERISIERUNG DER PATIENTENKOLLEKTIVE	35
3.2. GENOTYPISIERUNG DER SNPs RS1883832 UND RS4810485 IM CD40 GEN	40
UND DER SNPs RS2233409, RS2233408, RS3138053, RS696 UND RS2233406	40
IM NFKBIA GEN	40
3.3. HARDY-WEINBERG-GLEICHGEWICHT	46
3.4. VERGLEICH DER GENOTYP- UND ALLELFREQUENZEN IN DEN VERSCHIEDENEN	48
KOLLEKTIVEN FÜR DIE AUSGEWÄHLTEN SNPs IM CD40 GEN	48

3.5. VERGLEICH DER GENOTYP- UND ALLELFREQUENZEN IN DEN VERSCHIEDENEN KOLLEKTIVEN FÜR DIE AUSGEWÄHLTEN SNPs IM NFKBIA GEN	52
4. DISKUSSION	59
4.1. CD40	59
4.2. NFKBIA	64
4.3. UNTERSCHIEDE VON AKUTEN ZELLULÄREN UND VASKULÄR-HUMORALEN ABSTOßUNGSREAKTIONEN	66
4.4. URSACHEN DES TRANSPLANTATVERLUSTES	67
4.5. WEITERE IMMUNOLOGISCHE URSACHEN FÜR AKUTE ABSTOßUNGSREAKTIONEN ODER RETRANSPLANTATIONEN	68
4.5.1. ALTER ZUM ZEITPUNKT DER LETZTEN TRANSPLANTATION	68
4.5.2. HLA-MISMATCHE	69
4.5.3. GESCHLECHTERVERTEILUNG	69
4.5.4. IMMUNSUPPRESSION	70
4.5.5. GRUNDERKRANKUNG	72
4.6. AUSBLICK	73
5. ZUSAMMENFASSUNG	75
6. LITERATURVERZEICHNIS	76
7. TABELLENVERZEICHNIS	96
8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	97
9. ANHANG	98
9.1. DANKSAGUNG	98
9.2. LEBENSLAUF	99

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
DNA	Desoxyribonukleinsäure
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
PCR	Polymerase Chain Reaction
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
CD	Cluster of Differentiation
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
APC	Antigen Presenting Cell
NFKB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NFKBIA	NFKB-Inhibitorprotein alpha
HLA	Human Leukocyte Antigen
MHC	Major Histocompatibility Complex
rpm	revolutions per minute
TNI	Terminale Niereninsuffizienz
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
ADPKD	Autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung
BKV	Humanes Polyomavirus 1
CMV	Cytomegalievirus
kDa	kilo Dalton
DSA	Donorspezifische Antikörper
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
TBE	TRIS-Borat-EDTA
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
MMF	Mycophenolatmofetil
SD	Standardabweichung
SSP	Sequenzspezifische Primer
SSPO	Sequence Specific Oligonucleotide Probing
G, C, T, A	Guanin, Cytosin, Thymin, Adenin

1. EINLEITUNG

1.1. Allgemeines

Eine Organtransplantation kann einem Menschen das Leben retten, andere dauerhafte Ersatztherapien ersparen und Lebensqualität zurückgeben. Die Nierentransplantation gilt heute bei Patienten im Stadium der terminalen Niereninsuffizienz im Vergleich zur dauerhaften Dialysetherapie als Mittel der Wahl und geht mit einer höheren Lebenserwartung einher (Niemi and Mandelbrot, 2014, Tzvetanov et al., 2015, Weidemann A, 2015). Im Jahr 2015 wurden in Deutschland in dem Zeitraum Januar bis März laut der Deutschen Stiftung für Organtransplantation 410 Nieren transplantiert (DSO, 03.06.2015, 14:36). Im Jahr 2014 waren es laut Eurotransplant in Deutschland 1.384 Organe, insgesamt ist ein leichter Rückgang der Anzahl der Nierentransplantationen in den letzten Jahren zu verzeichnen (DSO, 03.06.2015, 14:36).

Die Transplantationsmedizin ist ein komplexes Gebiet und es gibt viele Mechanismen, die nicht vollständig verstanden sind. Insbesondere der Bereich der Transplantationsimmunologie hat eine große Bedeutung, denn bei der Implantation eines Spenderorgans in einen neuen Organismus können Komplikationen, wie beispielsweise akute Abstoßungsreaktionen, auftreten.

1.2. Transplantationsimmunologie

1.2.1. Das HLA (Human Leukocyte Antigen)-System

Es gibt eine Vielzahl von Antigenen, die zu der Abstoßungsreaktion eines Transplantats beitragen können. Dazu zählen der MHC (Major Histocompatibility Complex, beim Menschen als HLA bezeichnet), der Minor Histocompatibility Complex, ABO-Blutgruppenantigene und Antigene auf Endothelzellen (Lee and Ozawa, 2007, Takemoto et al., 2004, Farid et al., 2015, Filippone and Farber, 2015). HLA-Moleküle werden auf fast allen Oberflächen der kernhaltigen Zellen des Körpers exprimiert (Mahdi, 2013). Man unterscheidet HLA-Klasse-I und HLA-Klasse-II-Antigene (Mahdi, 2013). Zu den Klasse-I-Molekülen zählen HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-G, HLA-E und HLA-F während HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, HLA-DM und HLA-DO als Klasse-II-Moleküle bezeichnet werden (Mahdi, 2013,

Lefaucheur et al., 2009). Die HLA-Typisierung kann durch verschiedene Verfahren wie die Serologie, molekularbiologische Analysen (Sequenz-spezifische Primer, Sequenz-spezifische Oligonukleotide) und durch Sequenzierung erfolgen (Mahdi, 2013, Takemoto et al., 2004).

Die HLA-Kompatibilität zwischen dem Empfänger und Spender eines Organs spielt für das Überleben des Transplantats eine wichtige Rolle (Lefaucheur et al., 2009). Vor der Durchführung einer Nierentransplantation müssen die HLA-Daten vom Spender und Empfänger typisiert werden - nur so kann eine möglichst HLA-kompatible Verteilung der Organe erfolgen. Bei einer Nierentransplantation werden dabei vor allem die Moleküle HLA-A, HLA-B und HLA-DR berücksichtigt (Kosmoliaptsis et al., 2014). Bei kompletter Übereinstimmung der HLA-Genorte HLA-A, HLA-B und HLA-DRB1 kommt es nach der Transplantation zu einem besseren Transplantatüberleben als bei einer Transplantation, bei der es HLA-Unterschiede (HLA-Mismatches) gibt (Lefaucheur et al., 2009, Kosmoliaptsis et al., 2014). Im letztgenannten Fall ist die Wahrscheinlichkeit einer Abstoßungsreaktion erhöht, da HLA-Moleküle eine starke Immunogenität besitzen (Kimball et al., 2011, Markiewicz-Kijewska et al., 2014).

Abbildung 1 zeigt, welche Vorgänge beim Aufeinandertreffen von einer fremden Spenderzelle auf T-Zellen des Empfängers ablaufen wenn es beispielsweise zu einer akuten Abstoßungsreaktion kommt.

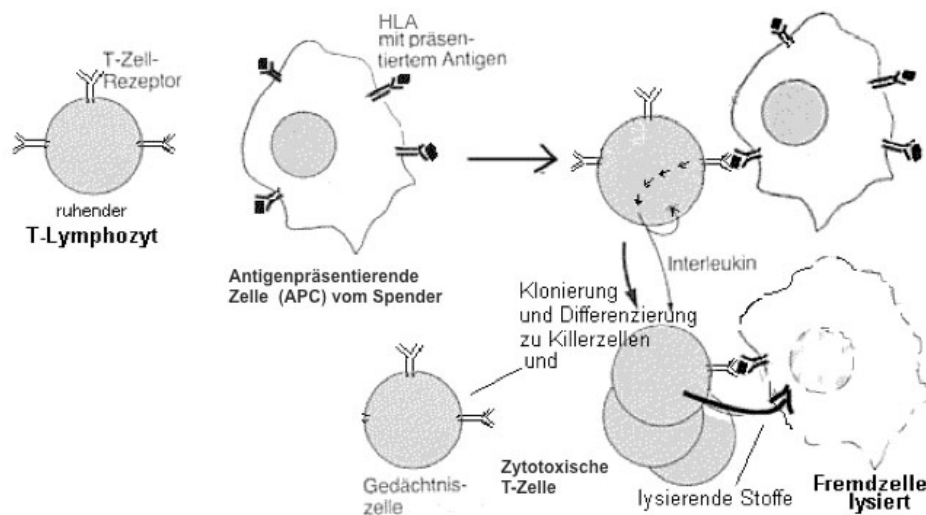


Abb.1: Sensibilisierungs- und Effektorphase einer akuten Transplantat-Abstoßung: trifft eine APC des Organspenders auf eine Zelle des Organempfängers (in diesem Fall ein T-Lymphozyt) kommt es zu einer Interaktion der beiden Zellen bei der das fremde Antigen des Spenders von dem T-Lymphozyten des Empfängers erkannt wird, dies führt zur Proliferation von Lymphozyten im Empfängerorganismus welche die Lyse der Spenderzellen (in diesem Fall die Spenderniere) initiieren (<http://www.scheffel.org.bw.schule.de>, 29.06.2014, 14:26)

Die Präsentation von spenderspezifischen Alloantigenen erfolgt überwiegend durch antigenpräsentierende Zellen des Spenders aus dem Transplantat (Guo et al., 2001, Le Moine et al., 2002). Diese Zellen tragen die HLA-Klasse-I und HLA-Klasse-II-Moleküle des Donors, welche von ruhenden $CD4^+$ - und $CD8^+$ -alloreaktiven T-Zellen erkannt werden (Guo et al., 2001).

$CD4^+$ -T-Zellen erkennen Peptide, die über HLA-Klasse-II-Moleküle präsentiert werden und spielen eine Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen, allergischen Reaktionen und Tumoren (Geginat et al., 2014, Dorhoi et al., 2012, Zhu et al., 2012). Es existieren fünf verschiedene Subtypen von $CD4^+$ -T-Zellen: TH1-, TH2-, TH17-, regulatorische- und folliculäre T-Zellen (Prezzemolo et al., 2014, Zhu et al., 2012). Die Immunantwort wird über TH1-Zellen im Sinne einer Produktion von $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$ und IL-2 ausgelöst, wodurch Monozyten und Granulozyten rekrutiert werden (Geginat et al., 2003, Walzl et al., 2011, Rozot et

al., 2013, Geginat et al., 2014). TH2-Zellen produzieren hingegen vor allem IL-4, IL-5 und IL-13, TH17-Zellen hauptsächlich IL-17A, IL-17F und IL-22 (Zhu et al., 2012, Geginat et al., 2014). Wenn ein Individuum Kontakt zu einem Antigen hat, bildet der Körper parallel zu den oben beschriebenen Mechanismen zusätzlich T-Gedächtniszellen aus, die im Falle eines erneuten Kontakts mit genau demselben Antigen schneller und effektiver eine Immunantwort auslösen können (Prezzemolo et al., 2014, Zhu et al., 2012). Durch die Produktion von IL-2 durch TH1-Zellen wird die Aktivierung von CD8⁺-T-Zellen verstärkt und es bilden sich zytotoxische CD8⁺-T-Effektorzellen, die gegen die HLA-Klasse-I-Moleküle auf dem Transplantat gerichtet sind (Denton et al., 1999, D'Elios et al., 1997, Ganji and Broumand, 2007, Guo et al., 2001, Le Moine et al., 2002). Diese zerstören dann mithilfe von Perforinen, Granzymen und über die Aktivierung des Fas-Liganden die Zellen des Transplantats, indem die Apoptose eingeleitet wird (Strehlau et al., 1997, Guo et al., 2001).

Der zweite wichtige Prozess, welcher durch CD4⁺-T-Zellen getriggert wird, ist nach der Aktivierung von zytotoxischen CD8⁺-T-Effektorzellen die Produktion von Antikörpern durch aktivierte B-Zellen (=Plasmazellen) (Ganji and Broumand, 2007, Le Moine et al., 2002, Geginat et al., 2014).

Der dritte CD4⁺-T-Zell getriggerte Prozess ist die Bildung von autoreaktiven Plasmazellklonen. Abbildung 2 zeigt, dass fremde Antigene (aus dem Spenderorgan) mithilfe von HLA-Klasse-II-Molekülen auf der Oberfläche von B-Zellen präsentiert werden können und darüber in Kontakt zu follikulären CD4⁺-T-Helferzellen treten. Dieser Aktivierungsvorgang führt zur Differenzierung der B-Zelle zu einer Plasmazelle mit der Fähigkeit zur Antikörperproduktion gegen das zuvor erkannte donorspezifische Antigen (Zhu et al., 2012, Geginat et al., 2014).

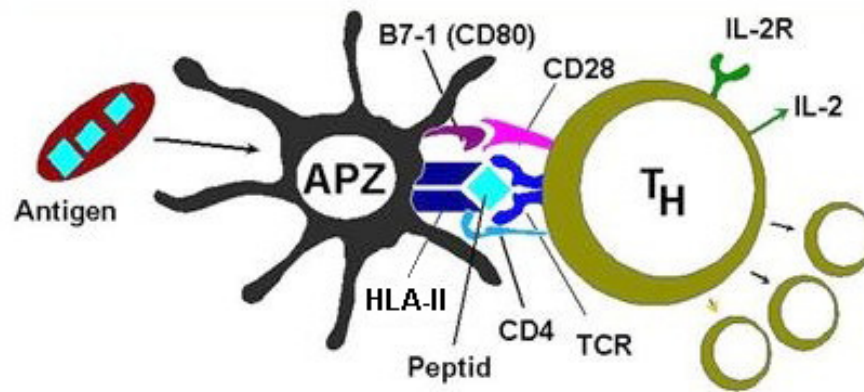


Abb. 2: B-Zellaktivierung: eine APC des Organempfängers (z.b. eine B-Zelle) präsentiert über ihr HLA-Klasse-II-Molekül ein Peptid des zuvor aufgenommenen Antigens des Organspenders, dies führt zur Interaktion mit einer CD4⁺-T-follikulären T-Helferzelle, anschließend erfolgt die Differenzierung in Plasmazellen, welche Antikörpern gegen das zuvor aufgenommene Antigen produzieren können (Pleyer and Ritter, 2003)

Vorangegangene Sensibilisierungsereignisse wie Schwangerschaften, Bluttransfusionen und frühere Transplantationen können zur Ausbildung von präformierten Anti-HLA-Antikörpern gegen fremde HLA-Moleküle führen (Halloran, 2003, Terasaki and Cai, 2005). Man nennt diese Antikörper, wenn sie sich gegen Spendermoleküle richten, Donorspezifische Antikörper (DSA) (Hanajiri et al., 2015). Sie können sowohl zu einer hyperakuten als auch zu einer späten Abstoßungsreaktion führen (Lefaucheur et al., 2009, Burns et al., 2008, Ferrari-Lacraz et al., 2012).

1.2.2. Formen der Abstoßung

Die Banff-Klassifikation teilt die akuten und chronischen antikörpervermittelten Abstoßungsreaktionen bei nierentransplantierten Patienten ein (Haas, 2014, Solez et al., 1993). Die Einteilung enthält histologische, immunhistologische und serologische Kriterien, welche die Diagnose einer Abstoßungsreaktion erlauben (Haas, 2014, Solez et al., 1993). Anhand des Biopsieergebnisses ergeben sich spezifische Empfehlungen zum Therapieverfahren (Weidemann A, 2015). Die letzte Aktualisierung des Schemas erfolgte im Jahr 2013 bei der Banff-Konferenz in Brasilien (Haas, 2014). Neu hinzugefügt wurde die C4d-negative akute

antikörpervermittelte Abstoßungsreaktion und die antikörpervermittelte Intimaarteriitis (Haas, 2014). Die Version von 2013 enthält für die Definition der T-Zell-vermittelten Abstoßungsreaktion keine Neuerungen, sodass in diesem Fall die Version aus dem Jahr 2009 herangezogen werden kann (Weidemann A, 2015).

Banff-Klassifikation von 2009 (Weidemann A, 2015):

1. Unauffälliger Befund
2. Antikörpervermittelte Abstoßung (C4d+, zirkulierende donorspezifische Antikörper und pathologische Veränderungen des Transplantats – akute und chronische antikörpervermittelte Abstoßung)
3. Borderline-Veränderungen: Verdacht auf akute T-Zell-vermittelte Abstoßung
4. Akute und chronisch aktive T-Zell-vermittelte Abstoßung
5. Interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie ohne Hinweis auf spezifische Ätiologie
6. Andere nicht rejektionsbedingte Veränderungen

Banff-Klassifikation von 2013 für die antikörpervermittelte Abstoßung (Punkt 2 von 2009) (Weidemann A, 2015):

- Akute/aktive Antikörpervermittelte Abstoßung; alle 3 Merkmale müssen für die Diagnose vorliegen
 - Histologie, Antikörperinteraktion mit Gefäßendothel, DSA-Nachweis
- Chronisch aktive Antikörpervermittelte Abstoßung; alle 3 Merkmale müssen für die Diagnose vorliegen
 - Chronische Gewebeläsion, Antikörperinteraktion mit Gefäßendothel, DSA-Nachweis
- C4d-Färbung ohne Nachweis einer Abstoßung; alle 3 Merkmale müssen für die Diagnose vorliegen
 - Lineare C4d-Färbung, chronische Glomerulopathie=0, Glomerulitis=0, peritubuläre Kapillaritis=0, Arteriitis=0, keine akute zellvermittelte Abstoßung oder Borderlineveränderung

1.2.2.1. Hyperakute Abstoßungsreaktion

Die hyperakute Abstoßungsreaktion wird meistens innerhalb von Minuten durch präformierte Donorspezifische Antikörper bedingt, die bereits vor der Transplantation im Blut zirkulieren (Tittelbach-Helmrich et al., 2014, Puttarajappa et al., 2012, Patel and Terasaki, 1969). Die Antikörper und Komplementfaktoren führen zu Blutungen und Thrombosen im Transplantat (McGregor et al., 2012). Histologisch zeigen sich Endothelschädigungen, eine transmurale Arteriitis, ein interstitielles Ödem sowie Nekrosen, was in der Gesamtheit meistens eine Nephrektomie notwendig macht (Patel and Terasaki, 1969).

Heute wird vor jeder Nierentransplantation ein Crossmatch durchgeführt, dadurch ist das Auftreten von hyperakuten Abstoßungsreaktionen sehr selten geworden (Tittelbach-Helmrich et al., 2014, Patel and Terasaki, 1969). Die Complement-dependent-cytotoxicity-Technik (CDC) identifiziert signifikante Mengen an Donorspezifischen HLA-Antikörpern im Empfängerorganismus (Mulley and Kanellis, 2011). Das Serum des Organempfängers wird hierbei zusammen mit Spenderlymphozyten (als Quelle für die HLA-Moleküle des Spenders) inkubiert und falls der Empfänger Donorspezifische Antikörper besitzt kommt es zu einer Komplement-vermittelten Lyse der Spenderlymphozyten (Mulley and Kanellis, 2011). Beim Flow-Crossmatch erfolgt das Sichtbarmachen von mit HLA-Antikörpern besetzten Donorlymphozyten durch Fluoreszein-gebundene Anti-HLA-Antikörper (Mulley and Kanellis, 2011).

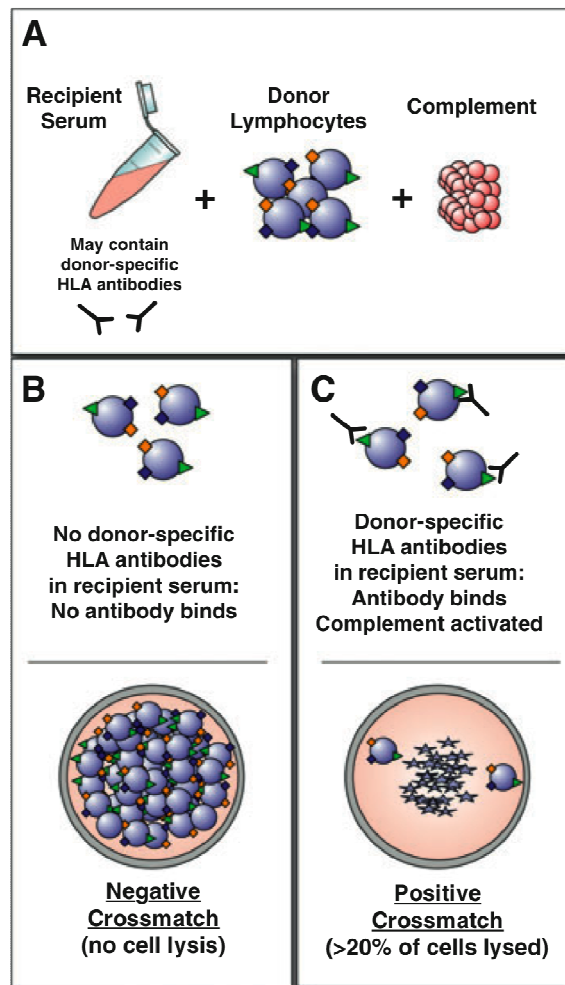


Abb. 3: Prinzip des CDC-Crossmatch: Empfängerserum und Spenderlymphozyten werden zusammen mit Komplementfaktoren inkubiert, beim Vorhandensein von Donorspezifischen Antikörpern kommt es zu einer Lyse der Spenderlymphozyten und der Crossmatch wird als positiv gewertet (Mulley and Kanellis, 2011)

1.2.2.2. Akute Abstoßungsreaktion

Risikofaktoren für eine akute Abstoßungsreaktion sind auf Seiten des Empfängers ein junges Alter und eine afroamerikanische Herkunft, während bei den Organspendern ein hohes Alter ein negativer Prediktor ist (Lebranchu et al., 2013). Während der Transplantation ist eine verspätete Funktionsaufnahme des Transplantats sowie eine Ischämiezeit über 24 Stunden ein Risikofaktor für die Entwicklung einer akuten Abstoßungsreaktion (Lebranchu et al., 2013).

Die Häufigkeit von klinisch relevanten akuten Abstoßungsreaktionen liegt derzeit bei ungefähr 10-15% im ersten Jahr nach der Transplantation und hängt von der immunsuppressiven Therapie ab (USRDS, 2015, Ekberg et al., 2007). Eine adäquate immunsuppressive Therapie vermindert das Risiko, eine akute Abstoßungsreaktion zu entwickeln (Lebranchu et al., 2013).

1.2.2.2.1. Akute zelluläre Abstoßungsreaktion

Hierunter werden die akuten zellulär-interstitiellen und die akuten zellulär-vaskulären Abstoßungsreaktion zusammengefasst. Eine akute zelluläre Abstoßungsreaktion tritt meistens in den ersten Wochen oder Monaten nach einer Transplantation auf (Cotts and Johnson, 2001). Dabei finden sich histologisch Infiltrationen von CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten, die mit einer Tubulitis einhergehen (Ursus-Nikolaus Riede, 2004, Ganji and Broumand, 2007). Die Häufigkeit von akuten zellulären Abstoßungsreaktionen beträgt derzeit weltweit ungefähr 15% pro Jahr (Djamali et al., 2006).

1.2.2.2.2 Akute vaskulär-humorale Abstoßungsreaktion

Die akute vaskulär-humorale Abstoßungsreaktion tritt relativ früh (wenige Stunden bis einige Tage) nach der Transplantation auf und wird durch Donorspezifische Antikörper hervorgerufen, die entweder bereits vor der Transplantation im Empfängerorganismus vorhanden waren oder sich nach der Transplantation neu entwickelt haben (Puttarajappa et al., 2012, Terasaki and Mizutani, 2006, Le Moine et al., 2002). Histologisch zeigen sich Endothelschäden, eine Schwellung der Endothelzellen, eine Infiltration mit neutrophilen Granulozyten in den Glomeruli, Fibrinthrombosen und Blutungen (Trpkov et al., 1996). Die Häufigkeit von akuten vaskulär-humoralen Abstoßungsreaktionen liegt im Durchschnitt bei 5-7% aller Nierentransplantationen (Puttarajappa et al., 2012).

1.2.2.3. Chronische Transplantatnephropathie

Die chronische Transplantatdysfunktion ist die häufigste Ursache für einen Funktionsverlust einer Transplantatniere (Briganti et al., 2002, Hariharan et al., 2000). In der Regel dauert es einige Monate bis Jahre bis zur terminalen Niereninsuffizienz der Transplantatniere (Stallone et al., 2005). Histopathologisch

besteht eine Trias aus Tubulusatrophie, Fibrose und Intimafibrose (Halloran et al., 1999, Hertig et al., 2008). Das Auftreten einer vorigen akuten Abstoßungsreaktion stellt ein Risikofaktor für die Entwicklung einer chronischen Abstoßungsreaktion dar (Matas et al., 1994, Humar et al., 1999, Almond et al., 1993, Pelletier et al., 1998). Die Häufigkeit von chronischen Abstoßungsreaktionen liegt über einen Zeitraum von 10 Jahren bei ungefähr 40% (Hertig et al., 2008).

1.2.2.4. Immunsuppressive Therapie

Die verschiedenen Abstoßungsreaktionen sind sehr schwere Formen der möglichen Komplikationen. Nach einer Nierentransplantation ist deshalb in der Regel eine lebenslange Immunsuppression erforderlich (Gonzalez-Molina et al., 2014, Lebranchu et al., 2013, Ganji and Broumand, 2007, Ahmad et al., 2009, Halloran, 2004). In den meisten Fällen schreiben Leitlinien eine standardisierte Form vor, die zwar durch das individuelle Risiko des Patienten teilweise modifizierbar ist, ansonsten aber weitere Eigenschaften einer Person nicht berücksichtigt. An diesem Punkt wäre es sinnvoll, durch Erforschung der relevanten Risikofaktoren eines Menschen, die dazu beitragen in bestimmter Art und Weise auf ein Transplantat zu reagieren, die immunsuppressive Therapie noch besser zu individualisieren. Diese könnte bereits bei der präoperativen Vorbereitung ansetzen und auch während und nach einem Eingriff weitergeführt werden. Gleichzeitig würden so die vielfältigen gravierenden Nebenwirkungen der Medikamente vermindert werden. Entsprechende Biomarker, die das Risiko der Komplikationen vor Behandlungsbeginn voraussagen können, existieren derzeit noch nicht.

Typische Nebenwirkungen von Immunsuppressiva sind unter anderem eine Knochenmarksuppression bis hin zur Panzytopenie, opportunistische Infektionen mit Pilzen, Bakterien oder Viren und die oft schwer verlaufende Sepsis (Halloran, 2004, Orlicka et al., 2013, Srinivas and Meier-Kriesche, 2008). Nebenwirkungen von Mycophenolatmofetil sind beispielsweise Diarrhö, Erbrechen, opportunistische Infektionen und Leukopenie (Gummert et al., 1999). Calcineurininhibitoren gehören zur Basismedikation nach Nierentransplantationen und besitzen eine hohe Wirksamkeit, gleichzeitig schädigen sie

allerdings die Niere nach längerer Einnahme, sodass es zu einer chronischen Transplantatnephropathie kommen kann (siehe Punkt 1.2.2.3.) (Snanoudj et al., 2009).

1.3. Biomarker

Ein Biomarker ist ein objektiv messbares Produkt eines Organismus, welches als Indikator für das Auftreten einer Krankheit herangezogen werden kann (Schlitt et al., 2011, Fuentes-Arderiu, 2013). Biomarker können beispielsweise Blutwerte, Zellen oder auch Gene und deren Produkte sein (Gudenus R, 2010, Fuentes-Arderiu, 2013). Man kann zwischen krankheitsbezogenen und arzneimittelbezogenen Biomarkern unterscheiden. Ein krankheitsbezogener Biomarker gibt Aufschlüsse über das Auftreten und die Entwicklung einer Erkrankung (Schlitt et al., 2011). Anhand eines arzneimittelbezogenen Biomarkers kann man Vorhersagen über die Wirkung von Medikamenten in einem Organismus treffen (Bayer, 29.07.2013, 13:49). Auch Genpolymorphismen können aufgrund ihrer Eigenschaften (Rahimi et al., 2013) als Biomarker dienen und stehen möglicherweise im Zusammenhang mit der Prädisposition zu bestimmten Erkrankungen (Neil A. Campbell, 2003, Zervou et al., 2011, Lee et al., 2014a). Die in dieser Arbeit untersuchten Genpolymorphismen befinden sich in Genen, die in der Pathophysiologie von akuten Abstoßungsreaktionen eine Schlüsselrolle einnehmen.

1.3.1. CD40-Protein

Das CD40 Antigen ist ein transmembranöses Glykoprotein vom Typ 1 mit einem Molekulargewicht von 47-48 kDa, welches aus 277 Aminosäuren besteht und auf der Zelloberfläche als Monomer, Dimer oder Trimer vorliegen kann (Chatzigeorgiou et al., 2009). Das Gen für das CD40 Molekül liegt auf Chromosom 20q12-q13.2 (Ramesh et al., 1993). CD40 existiert in einer transmembranösen und einer löslichen Form, wobei die lösliche Form über einen negativen Rückkopplungsmechanismus die Blockade des CD40/CD40L-Signalwegs bewirkt (Chatzigeorgiou et al., 2009). Diese durch alternatives Spleißen hervorgerufene Produktion ist die wirkungsvollste Methode der Zelle, ihre CD40-Konzentration zu modulieren (Chatzigeorgiou et al., 2009).

Das CD40 Antigen befindet sich auf einer Vielzahl an Zellen, darunter Antigen-präsentierende Zellen (APC) wie Monozyten und B-Zellen, aber auch auf Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Kupfferzellen, Thymusepithelzellen, aktivierten T-Zellen, Keratinozyten und Fibroblasten (Schonbeck and Libby, 2001, Maemura et al., 2005, Hollenbaugh et al., 1995). Der CD40-Ligand (CD154) ist ein transmembranöses Protein vom Typ 2 und besteht aus 261 Aminosäuren (Chatzigeorgiou et al., 2009). Er befindet sich auf der Oberfläche von CD4⁺-T-Lymphozyten, NK-Zellen, Eosinophilen und Thrombozyten (Grewal and Flavell, 1998). Die Bindung von CD40 an seinen Liganden CD40L(CD154) führt über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB zur Produktion von Zytokinen, Chemokinen, Matrixmetalloproteinasen, Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmolekülen (Chatzigeorgiou et al., 2009). Außerdem ist diese Bindung essentiell für die Aktivierung von B-Zellen und den „class switch“ während der Antikörperproduktion (O'Connor et al., 2003, Clark et al., 1996). Ein weiterer Aspekt ist die Generierung eines immunologischen Gedächtnisses in Form von CD8⁺-T-Gedächtniszellen, dazu trägt das CD40 Protein durch seine kostimulatorische Wirkung bei (Bourgeois et al., 2002). Alle diese genannten Faktoren sind von zentraler Bedeutung für den Entzündungsprozess. Abstoßungsreaktionen im Rahmen von Organtransplantationen gehen oft mit Entzündungen einher und zeigen diverse Parallelen in der Pathogenese. Dies erklärt, weshalb die Bedeutung von CD40 für die Transplantationsimmunologie so immens ist (Nathan et al., 2002).

1.3.2. NFκB und IκBα

Das Molekül NFκB (nuclear factor 'kappa light chain enhancer' of activated B-cells) ist ein pleiotroper spezifischer Transkriptionsfaktor, der ubiquitär in den Zellkernen von Säugetieren vorkommt (Molinero and Alegre, 2011). NFκB reguliert Gene, deren Produkte vorwiegend Aufgaben bei immunologischen Prozessen erfüllen (Molinero and Alegre, 2011, Thakur et al., 1994, Romzova et al., 2006). Dazu gehört die Bildung von Faktoren für die Immunantwort und die Produktion von Apoptosefaktoren, Entzündungsmediatoren und die Produktion von Genprodukten, die den Zellzyklus regulieren (Romzova et al., 2006, Molinero and Alegre, 2011). NFκB ist außerdem beteiligt an der Entwicklung von Organen,

an der Zellproliferation und an der Differenzierung von Gewebe (Molinero and Alegre, 2011). Des Weiteren ist NF κ B an der Entstehung von Autoimmunkrankheiten beteiligt (Romzova et al., 2006). Zur Familie der NF κ B-Transkriptionsfaktoren gehören fünf Komplexe: RelA, RelB, c-Rel, p105/p50 (=NF κ B1) und p100/p52 (=NF κ B2) (Hayden and Ghosh, 2008, Molinero and Alegre, 2011, Ghosh and Karin, 2002). Die Einheiten p50 und p52 müssen sich mit anderen Faktoren aus der NF κ B-Familie zusammenlagern, um an die DNA binden und dort die Transkription aktivieren zu können (Molinero and Alegre, 2011). Die beiden bekanntesten Dimere sind RelA/p50 und RelB/p52 (Vallabhapurapu and Karin, 2009).

In Ruhenden Zellen liegt NF κ B im Zytoplasma an ein Inhibitorprotein gebunden vor (Mozzato-Chamay et al., 2001). Somit wird sichergestellt, dass NF κ B nur dann aktiv wird, wenn der richtige Stimulus auf die Zelle trifft. Diese Inhibitormoleküle heißen I κ B. Zur Familie der I κ B-Moleküle gehören I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B δ , I κ B ϵ , I κ B ι , I κ B-R, Bcl-3, p100 und p105 (May and Ghosh, 1997). I κ B α ist das klassische Produkt aus dieser Vielzahl an Molekülen, enthält sechs Ankyrinwiederholungen und wird durch das Gen NFKBIA codiert (Chia-Hui Lin, 2008). I κ B α ist für das Beenden der NF κ B-Antwort notwendig und somit in einer normal funktionierenden Zelle essentiell (Abdallah et al., 2003). Kommt es zu einer Aktivierung der Zelle folgt die Phosphorylierung von I κ B α , was zu einer Dissoziation des I κ B α /NF κ B-Komplexes führt (Demchenko and Kuehl, 2010). NF κ B wird frei und kann dann im Zellkern die Transkription der entsprechenden Gene aktivieren (Spink et al., 2007, Romzova et al., 2006, Demchenko and Kuehl, 2010). Dazu wird eine I κ B-Kinase (IKK) aktiviert, welche I κ B α phosphoryliert und es so für den Abbau im Proteasom kennzeichnet (Molinero and Alegre, 2011, Demchenko and Kuehl, 2010). Eine solche Aktivierung kann beispielsweise durch Zytokine, Lipopolysaccharide, reaktive Sauerstoffradikale, Viren, Antigenrezeptoren, Ischämie oder Reperfusion erfolgen (Chia-Hui Lin, 2008, Molinero and Alegre, 2011, Ghosh and Karin, 2002).

Abbildung 4 gibt einen Überblick über die wichtigsten Stimuli und Effekte bei einer NF κ B-Aktivierung.

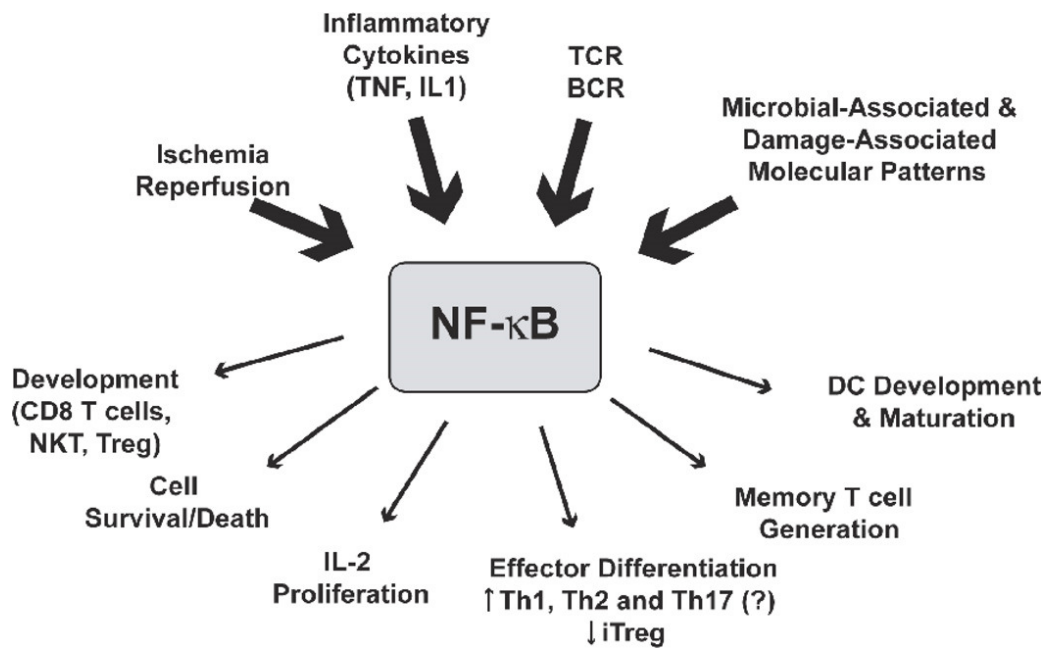


Abb. 4: Transplantationsabhängige Stimuli und Funktionen von NFκB (Molinero and Alegre, 2011)

Innerhalb einiger Stunden nach der Transplantation von Organen wird NFκB durch die zellulären Vorgänge während ischämischer Phasen und der Reperfusion im Transplantat aktiviert (Molinero and Alegre, 2011). Ferner führen auch, wie bereits zuvor erwähnt, bestimmte bakterielle oder virale Strukturen und die Zytokinausschüttung bei entzündlichen Prozessen zur Aktivierung von NFκB (Molinero and Alegre, 2011, Ghosh and Karin, 2002).

Trifft ein äußerer Stimulus auf eine T-Zelle, kann über den T-Zell-Rezeptor (TCR) eine intrazelluläre Kaskade in Gang gesetzt werden, welche zur Sekretion von IL-2 führt (Molinero and Alegre, 2011). Dadurch kommt es zur Differenzierung von zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen, welche eine Schlüsselrolle im Prozess der akuten Abstoßungsreaktion einnehmen (siehe Punkt 1.2.1.). Außerdem führt die Aktivierung über den T-Zell-Rezeptor zu einem längeren Zellüberleben, zur Differenzierung von Th1/Th2-Zellen und zur Ausbildung eines T-Gedächtniszell-Pools (Molinero and Alegre, 2011). Des weiteren wird bei diesem Vorgang die Ausdifferenzierung von natürlichen Killerzellen (NK) und T-Regulator-Zellen (TREG) initiiert (Molinero and Alegre, 2011).

1.4. Einzelnukleotid-Polymorphismus (Single Nucleotide Polymorphism)

Vergleicht man die Genome von zwei menschlichen Individuen, so sind ca. 99,9% davon identisch (Cooper et al., 1985). Die Unterschiede zwischen zwei Genomen werden vor allem durch Einzelnukleotid-Polymorphismen, die in der internationalen Nomenklatur als Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) bezeichnet werden, bedingt und liegen überwiegend in nicht-kodierenden Genabschnitten auf der DNA (Kwok and Chen, 2003, Barreiro et al., 2008, Collins et al., 1997). SNPs haben zwei unterschiedliche Ausprägungen auf der DNA (Allele) und kommen mit einer Häufigkeit von >1% in einer Population vor; liegt die Häufigkeit darunter so spricht man von einer Mutation (Thomas et al., 2011). Oftmals besitzen sie keine biologische Funktion oder Konsequenz für den Organismus (Collins et al., 1997, Kwok and Chen, 2003). Es wurden jedoch eine Reihe an SNPs detektiert, die eine Assoziation zu verschiedenen Erkrankungen aufweisen (Risch, 2000, Lin et al., 2007, Thomas et al., 2011, Wang et al., 2010, Zervou et al., 2011, Kurylowicz et al., 2009, Chia-Hui Lin, 2008, Johnson and Todd, 2000).

1.5. Bedeutung der untersuchten Genpolymorphismen

Im Gen von CD40 liegen 341 SNPs (NCBI, 03.08.2014, 13:52), während das NFKBIA Gen 209 SNPs (NCBI, 03.08.2014, 13:53) enthält. Aus dieser großen Anzahl von SNPs wurden für die Arbeit solche ausgewählt, die nachweislich die Expressionsrate beeinflussen. Dies ist im Folgenden für jeden SNP dargestellt.

Für das CD40 Gen wurden die SNPs **rs1883832** und **rs4810485** ausgewählt.

Der SNP **rs1883832** (C/T₋₁) liegt in der Promotorregion des CD40 Gens und betrifft damit die Kozak-Sequenz (5'-UTR) der entsprechenden mRNA (Buck et al., 2006). Im eukaryotischen Genom ist die Kozak-Sequenz A/GCCACCAUGG für den Start der Translation wichtig (Lifetechnologies, 06.07.2014). Die Kozak-Sequenz wird durch die umgebende TIS (translation initiation site) zwischen den Basenpositionen -3 bis +4 identifiziert, wobei +1 der Position der ersten Base des Startcodons AUG entspricht (Ferreira et al., 2013). Die Variabilität der das

Startcodon umgebenden Basen modifiziert die Expressionsrate des Gens (Ferreira et al., 2013).

- a) 5'-AC**C**AUGG-3' = Wildtyp (**C**)
- b) 5'-AC**T**AUGG-3' = mutiertes Allel (**T**)

Abb. 5: Kozak-Sequenz bei Eukaryonten: AUG=Startcodon

Beim Auftreten des T-Allels im Polymorphismus kommt es zu einer verminderten CD40 Expression (Buck et al., 2006).

Der SNP **rs4810485** liegt im zweiten Intron des CD40 Gens. Er nimmt Einfluss auf die Expression des CD40-Moleküls in CD14⁺ Monozyten und CD19⁺ B-Zellen (Vazgiourakis et al., 2011). Beim Auftreten von den Genotypen GT und TT kommt es zu einer verminderten Proteinexpression gegenüber dem Genotyp GG (Vazgiourakis et al., 2011).

Für das NFKBIA Gen wurden die SNPs **rs3138053**, **rs2233406**, **rs2233408**, **rs2233409** und **rs696** ausgewählt.

An der Position -881 im Promotor des NFKBIA Gens liegt der SNP **rs3138053**. Er beeinflusst die Affinität des Proteins ROR- α 2 (RAR-Related Orphan Receptor) und modifiziert die Transkriptionsrate (Spink et al., 2007).

Der SNP **rs2233406** liegt an der Position -826 im Promotor des NFKBIA Gens und modifiziert möglicherweise die Transkriptionsrate des Gens (Ali et al., 2013, Romzova et al., 2006, Gao et al., 2007).

Der SNP **rs2233408** des NFKBIA Gens befindet sich an Position -519 im Promotor und verändert die Affinität des Moleküls C/EBP (CCAAT/Enhancer-Binding-Proteine) und die Transkriptionsrate des Gens (Lin et al., 2007).

Der SNP **rs2233409** liegt an Position -297 im Promotor des NFKBIA Gens und modifiziert die Transkriptionsrate des Gens (Ali et al., 2013, Romzova et al., 2006, Gao et al., 2007). Die Genotypen GA und AA gehen mit einer erhöhten Sekretion von inflammatorischen Zytokinen einher und beeinflussen somit die Aktivität des Immunsystems (Grunau et al., 2013)

Der SNP **rs696** befindet sich an der Position +2756 in der 3'-UTR des Gens (Romzova et al., 2006). Diese 3'-UTR ist eine regulatorische Region, die für die korrekte Genexpression und die Stabilität und Lebensdauer der entsprechenden mRNA verantwortlich ist (Conne et al., 2000).

1.6. Fragestellung

In dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob die unter Punkt 1.5. genannten SNPs im CD40 Gen und NFKBIA Gen mit akuten Nierenabstoßungsreaktionen und der Anzahl von wiederholten Transplantationen assoziiert sind. Eine solche Assoziation könnte ein Hinweis dafür sein, dass diese SNPs geeignete genetische Biomarker sind, um eine Nierenabstoßungsreaktion zu prognostizieren. Außerdem könnte eine Assoziation zur Retransplantationshäufigkeit anzeigen, dass die SNPs weitere immunologische Reaktionen begünstigen, die dem Nierentransplantat schaden. Derartige Assoziationen sind Voraussetzung für die Etablierung eines Biomarkers als Instrument in der medizinischen Praxis. Bei erfolgreicher Biomarkersuche wäre das Fundament zu einer individualisierten immunsuppressiven Therapie gelegt. Dadurch könnten die zum Teil schwerwiegenden Nebenwirkungen der verwendeten Medikamente auf ein Minimum reduziert und die Medikation an das individuelle immunologische Risiko angepasst werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Verwendete Materialien

2.1.1. Chemikalien

Diethylpyrocarbonate D5758 (DEPC-Wasser: 0,1%-ig)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Gel Loading Buffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tango Buffer	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
NEBuffer 3	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
NEBuffer 4	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
FastDigest Green Buffer	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Rotiphorese 10x TBE-Puffer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
UltraPure Agarose	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Ethidiumbromid, 1%-Lösung in Wasser, 10 mg/ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutsch- land

2.1.2. Verbrauchsmaterial

Reaktionsgefäße (Tubes) 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße (Tubes) 1,0 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spitzen 0,1-10 µl Biosphere	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Filter Tips	
Spitzen 2 -100 µl Biosphere	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Filter Tips	
Spitzen 2 -200 µl Biosphere	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Filter Tips	
Spitzen 1000 µl	Nerbe plus, Winsen/Luhe, Deutschland
PCR-Tubes (0,2 ml Tubes)	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Examination Gloves Nitra-Tex	Ansell, Richmond, VIC, Australien

Autoklavierband Comply Steam
Indicator Tape

3M, St. Paul, MN, USA

2.1.3. Geräte

Waage Adventurer

Ohaus, Parsippany, NJ, USA

T3-Thermocycler

Biometra, Göttingen, Deutschland

Mastercycler gradient

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Centrifuge 5417R

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Centrifuge 5424R

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Concentrator 5301

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Thermomixer comfort

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Power Supply (Power Pac 1000)

Bio-Rad, Hercules, CA, USA

Gelkammer Sub-Cell GT

Bio-Rad, Hercules, CA, USA

Geldokumentationsgerät

Cell Biosciences, Santa Clara, CA, USA

Mikrowelle

Robert Bosch GmbH, Stuttgart, Deutschland

Kühlschrank (4 °), Liebherr profiline

Liebherr International AG, Bulle, Schweiz

Gefrierschrank (-20 °), Liebherr
Premium

Liebherr International AG, Bulle, Schweiz

Magnetrührer IKAMAG REO

IKA, Staufen, Deutschland

Pipette 0,5-10 µl

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Pipette 10-100 µl

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Pipette 100-1000 µl

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Digital Graphic Printer UP D887

Sony, Minato, TKY, Japan

2.1.4. Primer

Eurofins MWG, Ebersberg, Deutschland

rs1883832 Vorwärts-Primer

5'-CCTCTTCCCCGAAGTCTTCC-3'

Rückwärts-Primer

5'-GAAACTCCTGCGCGGTGAAT-3'

rs4810485 Vorwärts-Primer

5'-CCTGGCTCCTTCATCCCAGC-3'

Rückwärts-Primer

5'-CCTCCCTGTTCCCTAAGAGC-3'

rs2233409	Vorwärts-Primer Rückwärts-Primer	5'-GAGAAACTCCCTGCGATGAG-3' 5'-CCAGCCATCATTTCCTCT-3'
rs696	Vorwärts-Primer Rückwärts-Primer	5'-GTACACCATTACAGGAGGG-3' 5'-GGCTGAAAGAACATGGACTTG-3'
rs2233408	Vorwärts-Primer Rückwärts-Primer	5'-TGGGGTTTGCCAACCTGCCG-3' 5'-AGTTCCTTTGCTGCAAAGAGCC-3'
rs2233406	Vorwärts-Primer Rückwärts-Primer	5'-GGTGGTGTGGATACCTTGCAATG-3' 5'-AGGTCCAATCGCGGTTAAG-3'
rs3138053	Vorwärts-Primer Rückwärts-Primer	5'-GTTGTGGATACCTTGCACTA-3' 5'-GGTCCTTAAGGTCCAATCG-3'

2.1.5. Restriktionsenzyme

NcoI	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
HpaII (<i>Fastdigest</i>)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Hpy8I=Hpy166II=MjaIV	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
HaeIII=BsuRI (<i>Fastdigest</i>)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
MnII (<i>Fastdigest</i>)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
BsII (<i>Fastdigest</i>)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
HpyCH4III	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Fast Ruler Low Range DNA-Ladder	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland

Herstellung von Gebrauchslösungen:

Die Primer wurden in einer Stammlösung von 100 pmol/µl geliefert. Zur Herstellung der Gebrauchslösung wurde die Primerstammlösung im Verhältnis 1:10 mit PCR-Wasser verdünnt. Die Gebrauchslösung hatte eine Konzentration von 10 pmol/µl.

Zur Herstellung der 1x TBE Pufferlösung (Gebrauchslösung) wurde die Stammlösung (1,0 M Tris-Borat, 20 mM EDTA) im Verhältnis 1:10 mit DEPC-Wasser verdünnt.

2.1.6. Computersoftware

Soarian Clinicals®	Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland
Alphamager ®Mini	BioExpress, Kaysville, UT, USA
MS Excel mac 2008	Microsoft, Redmond, WA, USA
Hardy-Weinberg 2-Allele Calculator	©Had2Know
IBM SPSS 20 Statistics	IBM, New York, NY, USA
R 2.13.0.	R Foundation for Statistical Computing, Technische Universität Wien, Österreich

2.2. Patientendaten und Patientenkollektive

In dem Zeitraum vom 01.01.2008 bis zum 31.12.2011 wurden im Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf 246 Patienten nierentransplantiert. Von diesen Patienten gaben 220 ihre schriftliche Einverständniserklärung zur Verwendung von Blutproben zu Forschungszwecken. Ein positives Ethikvotum von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg (PV-Nummer 3248) lag vor. Von dem Gesamtkollektiv der 220 Patienten wurde nachträglich ein Kollektiv von 57 Patienten ausgeschlossen, welches sich folgendermaßen zusammensetzt: für 19 Patienten war die histologische Einteilung der Abstoßungsreaktion lückenhaft dokumentiert, für 18 Patienten wurden die Einschlusskriterien aufgrund unzureichender Informationen aus der Patientenakte nicht erfüllt (fehlende Medikamenten- und HLA-Dokumentation), 7 Patienten erhielten eine Medikation die nicht den von uns ausgewählten Kriterien der Medikamenteneinteilung entsprach, 6 Patienten zeigten eine fehlende Funktionsaufnahme des

Transplantats (um die transplantierten Patienten nach dem Eingriff ausreichend lange beobachten und Abstoßungsreaktionen festhalten zu können, wurden nur diejenigen Patienten in die Arbeit eingeschlossen, die noch während der Operation eine Funktionsaufnahme des Transplantats zeigten), bei 5 Patienten lag das Datum der Operation außerhalb des von uns gewählten Zeitraums und bei 2 Patienten existierten keine Angaben zur 1-Jahres-Kontrolle nach der Operation.

In der vorliegenden Arbeit wurden folglich insgesamt 163 nierentransplantierte Patienten retrospektiv genotypisiert.

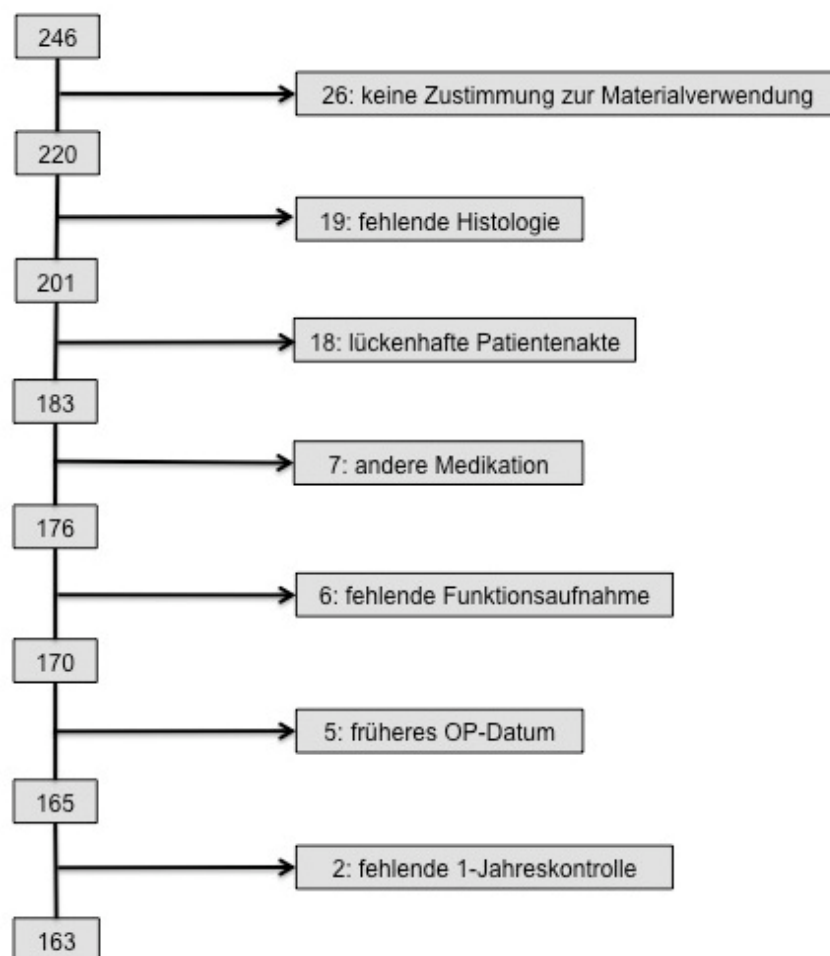


Abb. 6: Zusammensetzung des Patientenkollektivs: Darstellung der ausgeschlossenen Patienten aus dem Gesamtkollektiv aller nierentransplantierten Patienten und Bildung des Kollektivs der vorliegenden Arbeit von 163 Patienten

Zusätzlich wurden folgende Merkmale bei der Patientenauswahl berücksichtigt:

- Geschlecht
- Geburtsdatum
- Transplantationsdatum
- Datum der Abstoßungsreaktion und histologische Sicherung
- Retransplantationen (nur Nierentransplantationen)
- Alter zum Zeitpunkt der letzten Nierentransplantation
- Grunderkrankung
- Immunsuppression
- HLA-Differenz

Da nicht für alle Patienten mit einer akuten Abstoßungsreaktion eine Biopsie mit der zugehörigen Klassifikation nach den Banff-Kriterien vorlag, wurde die Art der Abstoßungsreaktion nicht weiter eingeteilt.

Der Zeitraum der Nachbeobachtung für die Kriterien „keine Abstoßung“ und „akute Abstoßung“ und die daraus folgende Einteilung der Patienten in bestimmte Kollektive wurde mit einem Jahr nach dem Datum der letzten Nierentransplantation festgelegt.

Bei den HLA-Differenzen wurden die drei HLA-Loci A, B und DR berücksichtigt.

Die Daten zur Immunsuppression stammten aus dem jeweils letzten Entlassungsbrief des Patienten nach dem stationären Aufenthalt im Rahmen der Transplantation.

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die Einteilung der Patienten in insgesamt fünf Kollektive.

Tabelle 1: Patientenkollektive

Kollektiv-nummer	Beschreibung des Kollektivs	Anzahl (n)	männlich (m)	weiblich (w)
1	Keine Abstoßungsreaktion	106	62	44
2	Akute Transplantatabstoßung	57	39	18
3	Multiple akute Transplantatabstoßung	78	50	28
4	Einmalig nierentransplantiert	124	78	46
5	Mehrmalig nierentransplantiert	39	23	16

1. Im ersten Kollektiv befinden sich Patienten, die innerhalb eines Jahres nach der letzten Nierentransplantation keine akute Abstoßung und keinen Transplantatverlust erlitten (n=106).
2. Das Kollektiv Nummer 2 enthält Patienten, die unabhängig von der Anzahl der Häufigkeit innerhalb eines Jahres nach der letzten Nierentransplantation eine akute Abstoßungsreaktion (zelluläre Abstoßung und/oder vaskulär-humorale Abstoßung) zeigten (n=57).
3. Das Kollektiv Nummer 3 umfasst Patienten, die einen Transplantatverlust durch Abstoßung erlitten (histologisch gesichert) und/oder Patienten mit mindestens zwei histologisch gesicherten Abstoßungen im ersten Jahr nach Transplantation (n=78).
4. Im Kollektiv Nummer 4 sind Patienten eingeschlossen, die bisher nur einmal nierentransplantiert wurden (n=124).
5. Das Kollektiv Nummer 5 umfasst alle Patienten, die bereits mehrfach nierentransplantiert wurden (n=39).

2.3. Patienten-DNA

Die Patienten-DNA lag isoliert und anonymisiert vor. Um eine erneute Isolierung von DNA im Falle von Retypisierungen zu ermöglichen, wurden die dazugehörigen Blutproben bei -20° gelagert. Die Intaktheit der isolierten DNA wurde durch die Lagerung bei -20° gewährleistet. Von allen eingefrorenen DNA-Originalproben wurden einige Mikroliter abgefüllt und für die Zeit der Versuche bei 4° im Kühlschrank aufbewahrt. Das ergab den Vorteil, dass die DNA nicht vor

jeder PCR aufgetaut und wieder weggefroren werden musste, wodurch die DNA nicht degradiert wurde.

Anhand der DNA-Konzentration in der Probe ergab sich eine Einteilung in sechs Gruppen, die in der Tabelle 2 gezeigt sind. Ziel bei der Berechnung der erforderlichen DNA-Menge für den praktischen Versuch war, in jedem PCR-Ansatz ein DNA-Gehalt von 120 ng zu erhalten.

Tabelle 2: Gruppen der DNA-Proben nach Konzentration

Gruppe	DNA-Konzentration in der Originalprobe	Probenanzahl
1	<10ng/μl	12
2	<20ng/μl	69
3	<30ng/μl	51
4	<40ng/μl	26
5	40-60/μl	15
6	>60/μl	11

2.4. Genotypisierung

Die Strategie der Genotypisierung nach dem PCR-ASRA-Prinzip umfasste vier Schritte. Zuerst wurde eine PCR durchgeführt und das entstandene Amplifikat gefällt, um es danach mithilfe eines passenden Restriktionsenzym zu verdauen. Im letzten Schritt wurden die DNA-Fragmente nach Anfärbung unter dem UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

Die Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten Genpolymorphismen, die als Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) bezeichnet werden:

Tabelle 3: Genpolymorphismen

Gen	Polymorphismus (SNP)
CD40	rs1883832
CD40	rs4810485
NFKBIA	rs2233409
NFKBIA	rs696
NFKBIA	rs2233408
NFKBIA	rs2233406
NFKBIA	rs3138053

2.4.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA-Sequenzen basierend auf dem Prinzip der enzymatischen DNA-Replikation aus den Bestandteilen der DNA (Stanek, 2013, Schorderet, 1994).

Jeder Reaktionszyklus besteht aus den drei Schritten Denaturierung, Annealing und Kettenverlängerung (Elongation) (Schorderet, 1994). Der zu amplifizierende Genabschnitt muss von zwei bekannten Sequenzen eingerahmt werden die als Bindungssequenzen für die Primer dienen (Schorderet, 1994). Die Synthese der neuen DNA erfolgt durch die hitzestabile Taq-Polymerase, wobei diese am 3'-Ende die Primer mithilfe von dNTPS entlang der vorhandenen einzelsträngigen Ausgangs-DNA verlängert (Dang and Jayasena, 1996).

Das Gemisch eines PCR-Ansatzes setzte sich wie folgt zusammen:

4 µl Hin-Primer (10pmol/µl)

4 µl Rück-Primer (10pmol/µl)

25 µl PCR-Master-Mix (Taq-Polymerase)

x µl H₂O (x = abhängig von der verwendeten DNA-Menge)

y µl DNA (120 ng DNA)

50 µl Gesamtansatz

Nachdem die einzelnen Bestandteile nach obigem Schema auf Eis pipettiert und gut gemischt wurden, konnte die PCR gestartet werden. Die Abläufe der einzelnen PCR-Programme zeigt die nachstehende Tabelle 4.

Tabelle 4: PCR-Programme

Polymorphismus	PCR-Programm	
rs1883832	Init. Denaturierung	94° 7min
	Denaturierung	94° 30sec
	Annealing	56° 30sec
	Elongation	72° 30sec
	Zyklen	29
rs4810485	Init. Denaturierung	94° 5 min
	Denaturierung	94° 20sec
	Annealing	60° 30sec
	Elongation	72° 45sec
	Zyklen	40
	Fin. Elongation	72° 7min
rs2233409	Init. Denaturierung	94° 5min
	Denaturierung	94° 1min
	Annealing	59° 1min
	Elongation	72° 1min
	Zyklen	34
	Fin. Elongation	72° 5min
rs696	Init. Denaturierung	94° 5min
	Denaturierung	94° 30sec
	Annealing	61° 30sec
	Elongation	72° 30sec
	Zyklen	34
	Fin. Elongation	72° 5min
rs2233408	Init. Denaturierung	95° 3min
	Denaturierung	95° 1min
	Annealing	58° 1min
	Elongation	72° 1min
	Zyklen	35
	Fin. Elongation	72° 5min

rs2233406	Init. Denaturierung	94° 5min
	Denaturierung	94° 1min
	Annealing	53° 1min
	Elongation	72° 1min
	Zyklen	34
	Fin. Elongation	72° 5min
rs3138053	Init. Denaturierung	95° 3min (1)
	Denaturierung	95° 1min (2)*
	Annealing	56° 1min (3)
	Elongation	72° 1min (4)
		95° 1min (5)**
		54° 1min (6)
		72° 1min (7)
	Fin. Elongation	72° 7min (8)

*Schritt 2-4: 5 Zyklen

**Schritt 5-7: 35 Zyklen

2.4.2. Präzipitation der PCR-Amplifikate

Bei diesem Verfahren wurden die PCR-Amplifikate von unverbrauchten störenden Substanzen aus dem PCR-Ansatz getrennt, um sie anschließend mit einem Restriktionsenzym optimal zu verdauen.

Im ersten Schritt wurden jeweils zu 30 µl Amplifikat folgende Substanzen hinzugegeben:

3 µl 3-molares Natriumacetat

75 µl 96%-iger Ethanol

Das Gemisch wurde gevortext und über Nacht bei -20° im Tiefkühlschrank gelagert. Im nächsten Schritt wurde das gefällte Amplifikat gewaschen. Das Gemisch wurde dafür zunächst für 15 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand anschließend abpipettiert. Danach wurden 200 µl 80%-iger Ethanol hinzugegeben. Nach erneutem Zentrifugieren für 15 Minuten bei 13000 rpm wurde der Überstand wieder abpipettiert, sodass am Ende des Vorgangs

das präzipitierte und gewaschene DNA-Pellet am Boden des Eppendorf-Tubes verblieb. Im letzten Schritt wurden die Proben geöffnet und für 30 Minuten in den Concentrator gestellt. In diesem Gerät wurde der restliche Alkohol durch die Erzeugung eines Vakuums bei 45° verdampft. Das gefällte und gereinigte Amplifikat wurde in 8 µl molekularbiologischem H₂O aufgenommen.

2.4.3. Restriktionsenzymverdau

Restriktionsendonukleasen können die zuvor in der PCR vervielfältigte DNA-Menge zerschneiden, wenn in dem Amplifikat eine für die entsprechende Restriktionsendonuklease spezifische Erkennungssequenz präsent ist. Anschließend können die DNA-Fragmente nach gelelektrophoretischer Auftrennung die Präsenz eines SNPs anzeigen (Ota et al., 2007).

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden bei -20° gelagert. Die Tabelle 5 gibt einen Überblick über die verwendeten Enzyme und deren Charakteristika. Die angegebenen Mengen an Enzym, Puffer und Wasser wurden für jede Probe in ein Tube pipettiert und anschließend wurde die Probe nach den Zeitangaben in der Tabelle 5 im Thermomixer inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Ansatz für 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert und die Ansätze für die SNPs rs1883832, rs2233409 und rs3138053 mit Gel Loading Buffer versehen. Danach wurden die Proben auf das Gel aufgetragen.

Tabelle 5: Eigenschaften der verwendeten Restriktionsenzyme

Polymorphismus	rs1883832	rs4810485	rs2233409	rs696	rs2233408	rs2233406	rs3138053
Restriktionsenzym	NcoI		Hpy8I				HpyCH4III
Restriktionsenzym (<i>Fastdigest</i>)		HpaII		HaeIII	MnII	BsII	
Spezifische Erkennungssequenz	CC ATGG	C CGG	GTN NAC	GG CC	I(N)6GAGG	CCNNNNNN NN GG	ACN GT
Inkubationszeit	4 Stunden	30 Minuten	4 Stunden	30 Minuten	30 Minuten	30 Minuten	4 Stunden
Inkubationstemperatur	37°	37°	37°	37°	37°	37°	37°
Verwendete Menge Enzym	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Verwendete Menge Puffer	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Verwendete Menge H ₂ O	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl
Verwendete Menge Gel Loading Buffer	2,5 µl	-	2,5 µl	-	-	-	2,5 µl
Schüttelfrequenz (Thermomixer)	350 rpm	350 rpm	350 rpm	350 rpm	350 rpm	350 rpm	350 rpm

2.5. Gelelektrophorese

Das Gel für die Gelelektrophorese wurde aus in TBE-Puffer (=Tris-Bor-EDTA-Puffer) gelöster Agarose hergestellt. Um die Agarose aufzulösen, musste das Gemisch in der Mikrowelle erwärmt werden, bis keine Flocken mehr zu sehen waren. Für die kleinen Gelvorrichtungen wurden 100 ml, für die großen 200 ml Gesamtansatz verwendet. Um die Banden nachher in dem Gel sichtbar zu machen und detektieren zu können mussten 8 bzw. 16 µl Ethidiumbromid nach Abkühlen zu der Flüssigkeit hinzugefügt werden. Die verwendete Gelkammer wurde mit Autoklavierband abgeklebt, um ein Herauslaufen der Flüssigkeit zu vermeiden. Beim Gießen der Mischung in den Gelträger mit den bereits gesteckten Kämmen war darauf zu achten, dass das Gel blasenfrei abkühlte und nicht herauslief. Nach 25-minütiger Aushärtung des Gels wurden die Gelkämme entfernt, der Gelträger mit dem Gel in die Elektrophoresekammer gelegt und die Proben aufgetragen. In die letzte Geltasche jeder Gelreihe wurden 5 µl des Fast Ruler Low Range DNA-Ladder gegeben, um die Bandenlänge der DNA-Fragmente ablesen und zuordnen zu können. Das Sichtbarmachen der DNA-Banden gelang mit UV-Licht (Wellenlänge: 302 nm) in einem Geldokumentationsgerät (Blende $\emptyset$ f/3, Belichtungszeit $\emptyset$ 154 ms). Das Bandenmuster der Fragmente zeigte die Präsenz des jeweiligen SNPs an.

Die Geleigenschaften unterschieden sich bei den einzelnen Polymorphismen. Die Agarosekonzentration richtete sich nach den Bandenlängen der DNA-Fragmente, die beim Restriktionsenzymverdau entstanden. Je ähnlicher die Längen der DNA-Fragmente waren, desto besser musste ihre Auftrennung im Gel erfolgen. Dies konnte mit einer höheren Agarosekonzentration erreicht werden. Beispielsweise wurden bei einer geforderten Agarosekonzentration von 2% 2 Gramm Agarose in 100ml Puffer bzw. 4 Gramm Agarose in 200ml Puffer aufgelöst. Entsprechendes galt für andere Agarosekonzentrationen. Bei ähnlich langen DNA-Fragmenten konnte eine bessere Auftrennung zusätzlich durch eine längere Laufzeit des Gels ermöglicht werden. An dem Gelelektrophoresegerät wurden die Stromstärke und die Zeitdauer eingegeben. Die Tabelle 6 zeigt die gewählten Einstellungen für jeden einzelnen Genpolymorphismus.

Tabelle 6: Geleigenschaften für die Polymorphismen

Polymorphismus	Agarosekonzentration (%)	Ø Stromstärke (Volt)	Ø Dauer (min)
rs1883832	2,0	180	35
rs4810485	2,5	165	35
rs2233409	2,0	180	40
rs696	2,0	170	40
rs2233408	2,0	160	45
rs2233406	3,0	170	40
rs3138053	2,0	165	40

2.6. Statistische Methoden

Für die Auswertung und Interpretation der Genotypisierungsergebnisse wurden mehrere statistische Tests ausgewählt, die im Folgenden kurz erläutert sind. Das Signifikanzniveau wurde bei sämtlichen statistischen Verfahren in dieser Arbeit mit $p < 0,05$ festgelegt.

2.6.1. T-Test

Die Durchführung eines *T-Tests* beruht auf der Annahme, dass die vorliegenden Daten einer t-Verteilung folgen. Diese Verteilung zeigt für kleine Werte des Parameters n eine größere Breite und Flankenbetonung als die Normalverteilung. Durch eine t-Verteilung gelingt die Berechnung der Verteilung der Differenz vom Mittelwert der Stichprobe zum wahren Mittelwert der Grundgesamtheit (McDonald, 2009).

Die Berechnungen mit dem *T-Test* erfolgten für die Variable „Alter zum Zeitpunkt der letzten Transplantation“.

2.6.2. Exakter Fisher Test

Mit dem *exakten Fisher Test* wurden die Parameter „Geschlecht“, „Grunderkrankung“, „HLA-Mismatche“ und „Immunsuppression“ zwischen den Kollektiven verglichen.

2.6.3. Hardy-Weinberg-Gesetz

Das Hardy-Weinberg-Gesetz beschreibt den Genpool in einer Idealpopulation, die nicht der natürlichen Evolution unterliegt (Spektrum, 2015). Solche Populationen gibt es in der Realität nicht (Spektrum, 2015). Anhand der Hardy-Weinberg-Gleichung $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ können Allelfrequenzen und Genotypenhäufigkeiten berechnet werden, vorausgesetzt eine der beiden Größen ist bekannt (Neil A. Campbell, 2003, Lee, 2015, Mayo, 2008, Stern, 1943, Spektrum, 2015). Geprüft wurde, ob die in der Arbeit experimentell ermittelten Allel- und Genotypenfrequenzen der einzelnen Polymorphismen mit den tatsächlich in der Bevölkerung vorkommenden Häufigkeiten übereinstimmten.

2.6.4. Dominante und Rezessive Vererbungsgänge der Polymorphismen

Bei den sieben untersuchten Polymorphismen wurde definitionsgemäß das häufiger vorkommende Allel als dominant gewertet. Allgemein ergeben sich dann folgende Modelle, wenn A das häufigere Allel und B das seltenere Allel ist:

AA+AB vs. BB: *Dominantes Modell*

AA vs. AB+BB: *Rezessives Modell.*

Konkret ist dies nachfolgend für den Polymorphismus rs696 im NFKBIA Gen erklärt. Bei dem Polymorphismus rs696 kommt das Allel C mit 61% in der europäischen Bevölkerung mit einer höheren Frequenz vor als das Allel T mit 39% (Ensembl, 20.08.2013; 15:40). Die dazugehörigen Modelle stellen sich demnach folgendermaßen dar:

CC+CT vs. TT: *Dominantes Modell*

TT+CT vs. CC: *Rezessives Modell.*

Kodominante Modelle der Polymorphismen wurden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Charakterisierung der Patientenkollektive

Zunächst wurden die klinischen und demographischen Charakteristika für die einzelnen Kollektive von nierentransplantierten Patienten ermittelt und verglichen. Die Ergebnisse dazu sind im Folgenden dargestellt. Tabelle 7 zeigt den Vergleich der beiden Patientenkollektive „keine Abstoßung“ und „akute Abstoßung“.

Tabelle 7: Klinische und demographische Parameter für die Kollektive „keine Abstoßung“ und „akute Abstoßung“

Parameter	Keine Abstoßung (n=106)	Akute Abstoßung (n=57)	p-Wert
Geschlecht (m/w)	62 (58,0%)/ 44 (42,0%)	39 (68,0%)/ 18 (32,0%)	0,239
Alter bei der letzten Transplantation (Durchschnittsalter ±SD)	52,72±16,61	48,72±16,29	0,142
Grunderkrankung			
Glomerulonephritis	13 (12,3%)	9 (15,8%)	0,632
Diabetische Nephropathie	14 (13,2%)	5 (8,8%)	0,455
ADPKD	16 (15,1%)	5 (8,8%)	0,330
IgA-Nephritis	9 (8,5%)	8 (14,0%)	0,291
Schrumpfnieren	4 (3,8%)	5 (8,8%)	0,279
Sonstige*	36 (34,0%)	25 (43,9%)	0,237
HLA-Mismatche**			
HLA-A/B/DR	2,98±1,66	3,42±1,38	1,000
Immunsuppression			
Gruppe 1***	70 (66,0%)	30 (52,6%)	0,127

Gruppe 2****	36 (34,0%)	27 (47,4%)	0,127
--------------	------------	------------	-------

- * Sonstige = Zusammengefasste Gruppe von Grunderkrankungen, die bei weniger als 4 Patienten im jeweiligen Kollektiv vorkamen (für „akute Abstoßung“ n=15, für „keine Abstoßung“ n=26). Zusätzlich zählen hierzu alle Patienten, die aufgrund der Dokumentationen in der Patientenakte keiner Erkrankung eindeutig zugeordnet werden konnten und deren Krankheitsgenese als „unklar“ bewertet wurde (für „akute Abstoßung“ n=10, für „keine Abstoßung“ n=10).
- ** Beim Vergleich der HLA-Mismatche sind die Durchschnittswerte für die Summe aus den drei Mittelwerten der Differenzen der Loci HLA-A, HLA-B und HLA-DR mit der zugehörigen Standardabweichung angegeben.
- ** Gruppe 1 = Calcineurininhibitoren, Steroide, Mycophenolatmofetil und/oder mTOR-Inhibitoren, Basiliximab
- ***Gruppe 2 = Calcineurininhibitoren, Steroide, Mycophenolatmofetil und/oder mTOR-Inhibitoren, Antithymozytenglobulin und/oder Rituximab, mit/ohne Basiliximab

Für den Vergleich der Grunderkrankungen gilt, dass nur für Erkrankungen ein p-Wert berechnet wurde, die in beiden Kollektiven mehr als vier mal vorkamen, da ein Vergleich mit zu kleinen Mengen (unter 4 Patienten pro Erkrankung) statistisch nicht aussagekräftig ist. Addiert man die Anzahl der Grunderkrankungen im Kollektiv „keine Abstoßung“ ergibt sich n=96. 5 Patienten mit der Grunderkrankung „Medikamenten/-Therapieassoziierte Nierenerkrankung“ und 5 Patienten mit der Grunderkrankung „SLE“ wurden in den Vergleich nicht miteinbezogen, da diese Erkrankungen in dem Kollektiv „akute Abstoßung“ zu selten (weniger als 4 Patienten) auftraten.

Bei der Gegenüberstellung der beiden Kollektive „keine Abstoßung“ und „akute Abstoßung“ zeigte sich kein signifikanter p-Wert.

In Tabelle 8 sind die Patientenkollektive „keine Abstoßung“ und „multiple akute Abstoßung“ einander gegenübergestellt.

Tabelle 8: Klinische und demographische Parameter für die Kollektive „keine Abstoßung“ und „multiple akute Abstoßung“

Parameter	Keine Abstoßung (n=106)	Multiple akute Ab- stoßung (n=78)	p-Wert
Geschlecht (m/w)	62 (58,0%)/ 44 (42,0%)	50 (64,0%)/ 28 (36,0%)	0,450
Alter bei der letzten Transplantation (Durchschnittsalter ±SD)	52,72±16,61	48,96±14,76	0,114
Grunderkrankung			
Glomerulonephritis	13 (12,3%)	11 (14,1%)	0,825
Diabetische Nephropathie	14 (13,2%)	8 (10,3%)	0,648
ADPKD	16 (15,1%)	8 (10,3%)	0,382
IgA-Nephritis	9 (8,5%)	8 (10,3%)	0,798
Vesikourethraler Reflux	4 (3,8%)	4 (5,1%)	0,724
Schrumpfniere	4 (3,8%)	4 (5,1%)	0,724
Sonstige*	36 (34,0%)	35 (44,9%)	0,168
HLA-Mismatche**			
HLA-A/B/DR	2,98±1,66	3,31±1,56	1,000
Immunsuppression			
Gruppe 1***	70 (66,0%)	25 (32,1%)	6,487* e ⁻⁶
Gruppe 2****	36 (34,0%)	53 (67,9%)	6,487* e ⁻⁶

* Sonstige = Zusammengefasste Gruppe von Grunderkrankungen, die bei weniger als 4 Patienten vorkamen (für „keine Abstoßung“ n=26, für „multiple Abstoßung“ n=31). Zusätzlich zählen hierzu alle Patienten, die aufgrund der Dokumentationen in der Patientenakte keiner Erkrankung eindeutig zugeordnet werden konnten und deren Krankheitsgenese als „unklar“ bewertet wurde (für „keine Abstoßung“ n=10, für „multiple Abstoßung“ n=12).

** Beim Vergleich der HLA-Mismatche sind die Durchschnittswerte für die Summe aus den drei Mittelwerten der Differenzen der Loci HLA-A, HLA-B und HLA-DR mit der zugehörigen Standardabweichung angegeben.

*** Gruppe 1 = Calcineurininhibitoren, Steroide, Mycophenolatmofetil und/oder mTOR-Inhibitoren, Basiliximab

****Gruppe 2 = Calcineurininhibitoren, Steroide, Mycophenolatmofetil und/oder mTOR-Inhibitoren, Antithymozytenglobulin und/oder Rituximab, mit/ohne Basiliximab

Für den Vergleich der Grunderkrankungen gilt, dass nur für Erkrankungen ein p-Wert berechnet wurde, die in beiden Kollektiven mehr als vier mal vorkamen, da ein Vergleich mit zu kleinen Mengen (unter 4 Patienten pro Erkrankung) statistisch nicht aussagekräftig ist.

Beim Vergleich der Kollektive „keine Abstoßung“ und „multiple akute Abstoßung“ zeigten sich signifikante p-Werte in beiden Gruppen der Immunsuppression ($p=6,487 \cdot 10^{-6}$). In der Gruppe 1 wurden dabei 70 (**66,0%**) Patienten ohne Abstoßung 25 (**32,1%**) Patienten, die eine akute Abstoßung erlitten haben, gegenübergestellt. Die Gruppe 2 verglich 36 (**34,0%**) Patienten ohne Abstoßung mit 53 (**67,9%**) Patienten, die eine akute Abstoßung aufwiesen. Alle übrigen p-Werte waren bei diesem Vergleich statistisch nicht signifikant.

Tabelle 9 zeigt die Gegenüberstellung der Kollektive „einmalig Transplantierte“ und „mehrmalig Transplantierte“.

Tabelle 9: Klinische und demographische Parameter für die Kollektive „einmalig Transplantierte“ und „mehrmalig Transplantierte“

Parameter	Einmalig Transplantierte (n=124)	Mehrmalig Transplantierte (n=39)	p-Wert
Geschlecht (m/w)	78 (63,0%)/ 46 (37,0%)	23 (59,0%)/ 16 (41,0%)	0,707

Alter bei der letzten Transplantation (Durchschnittsalter $\pm$ SD)	52,19 $\pm$ 17,17	48,54 $\pm$ 14,13	0,230
Grunderkrankung			
Glomerulonephritis	18 (14,5%)	4 (10,3%)	0,600
Diabetische Nephropathie	14 (11,3%)	5 (12,8%)	0,780
ADPKD	17 (13,7%)	4 (10,3%)	0,785
Sonstige*	33 (26,6%)	26 (66,7%)	1,506* e ⁻⁵
HLA-Mismatche**			
HLA-A/B/DR	3,11 $\pm$ 1,62	3,21 $\pm$ 1,47	1,000
Immunsuppression			
Gruppe 1***	92 (74,2%)	8 (20,5%)	2,993* e ⁻⁹
Gruppe 2****	32 (25,8%)	31 (79,5%)	2,993* e ⁻⁹

* Sonstige = Zusammengefasste Gruppe von Grunderkrankungen, die bei weniger als 4 Patienten vorkamen (für „einmalig Transplantierte“ n=18, für „mehrmalig Transplantierte“ n=21). Zusätzlich zählen hierzu alle Patienten, die aufgrund der Dokumentationen in der Patientenakte keiner Erkrankung eindeutig zugeordnet werden konnten und deren Krankheitsgenese als „unklar“ bewertet wurde (für „einmalig Transplantierte“ n=15, für „mehrmalig Transplantierte“ n=5).

** Beim Vergleich der HLA-Mismatche sind die Durchschnittswerte für die Summe aus den drei Mittelwerten der Differenzen der Loci HLA-A, HLA-B und HLA-DR mit der zugehörigen Standardabweichung angegeben.

*** Gruppe 1 = Calcineurininhibitoren, Steroide, Mycophenolatmofetil und/oder mTOR-Inhibitoren, Basiliximab

**** Gruppe 2 = Calcineurininhibitoren, Steroide, Mycophenolatmofetil und/oder mTOR-Inhibitoren, Antithymozytenglobulin und/oder Rituximab, mit/ohne Basiliximab

Für den Vergleich der Grunderkrankungen gilt, dass nur für Erkrankungen ein p-Wert berechnet wurde, die in beiden Kollektiven mehr als vier mal vorkamen, da ein Vergleich mit zu kleinen Mengen (unter 4 Patienten pro Erkrankung) statistisch nicht aussagekräftig ist. Addiert man die Anzahl der Grunderkrankungen im Kollektiv „einmalig Transplantierte“ ergibt sich $n=82$. 14 Patienten mit der Grunderkrankung „IgA-Nephritis“, jeweils 6 Patienten mit der Grunderkrankung „vesikourethraler Reflux“, „benigne Nephrosklerose“ und „Schrumpfniere“ sowie jeweils 5 Patienten mit der Grunderkrankung „Medikamenten/-Therapieassoziierte Nierenerkrankung“ und „SLE“ wurden in den Vergleich nicht miteinbezogen, da diese Erkrankungen in dem Kollektiv „mehrmalig Transplantierte“ zu selten (weniger als 4 Patienten) auftraten.

Bei der Gegenüberstellung der beiden Kollektive zeigte sich bei den Grunderkrankungen ein signifikanter p-Wert in der Gruppe „Sonstige“ ($p=1,506 \cdot 10^{-5}$). Hier wurden 33 (26,6%) einmalig transplantierte Patienten mit 26 (66,7%) mehrmalig Transplantierten verglichen.

Beim Vergleich der Kollektive „einmalig Transplantierte“ und „mehrmalig Transplantierte“ zeigten sich signifikante p-Werte in beiden Gruppen der Immunsuppression ($p=2,993 \cdot 10^{-9}$). In der Gruppe 1 wurden dabei 92 (74,2%) einmalig nierentransplantierte Patienten 8 (20,5%) Patienten, die mehrmalig transplantiert wurden, gegenübergestellt. Die Gruppe 2 verglich 32 (25,8%) einmalig Transplantierte mit 31 (79,5%) mehrmalig Transplantierten.

Alle übrigen p-Werte waren bei diesem Vergleich statistisch nicht signifikant.

3.2. Genotypisierung der SNPs rs1883832 und rs4810485 im CD40 Gen und der SNPs rs2233409, rs2233408, rs3138053, rs696 und rs2233406 im NFKBIA Gen

Die Genotypisierung aller 163 nierentransplantierten Patienten erfolgte nach dem PCR-ASRA-Prinzip (siehe Punkt 2.4.). Die Gelelektrophoresebilder für die Genotypisierung sind mit den Abbildungen 7 bis 13 exemplarisch für jeden Polymorphismus dargestellt. Unter den Gelbildern sind die Gelspuren markiert, jede Bildunterschrift benennt das bei dem entsprechenden Genpolymorphismus

verwendete Restriktionsenzym und die Pfeile am linken Bildrand zeigen die Bandenlängen der Restriktionsfragmente an. Auf jedes Gel wurde zusätzlich zu der DNA ein DNA-Marker (MA) aufgetragen, um eine korrekte Zuordnung der Banden zu gewährleisten. Die nebenstehenden Basenpaarlängen am rechten Bildrand zeigen die Bandenlängen des Markers an und wurden zur Orientierung der Bandenlängen des Restriktionsverdaus verwendet.

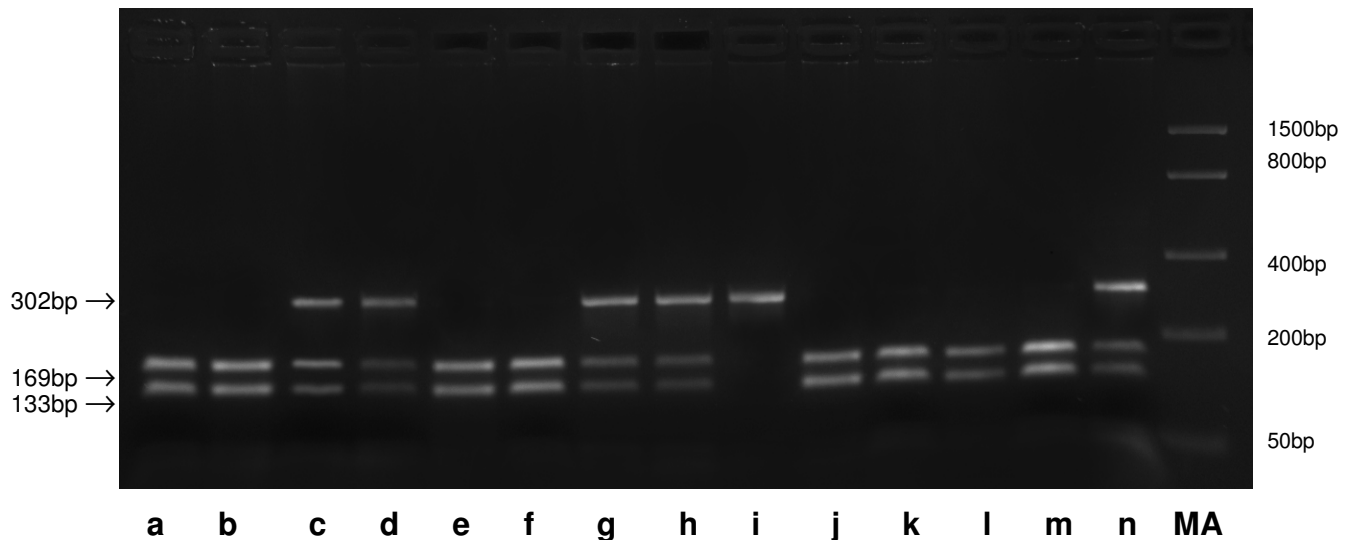


Abb. 7: Nachweis des SNPs rs1883832 im CD40 Gen durch den Verdau der PCR-Amplifikate mit dem Restriktionsenzym NcoI, Spur MA = Marker, Spuren a-n = Patientenproben

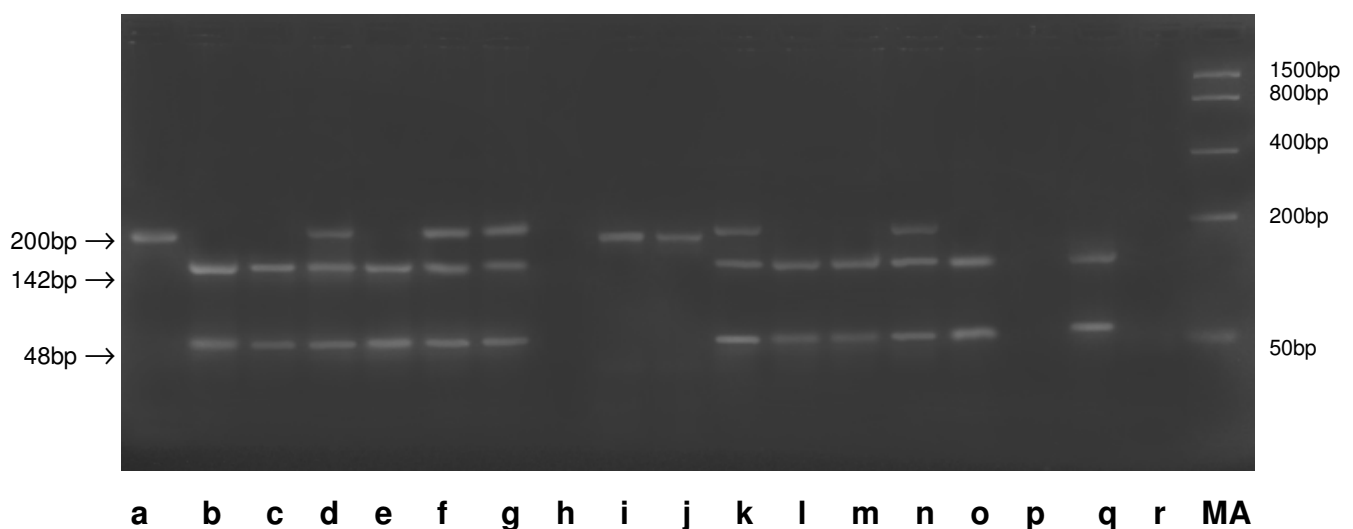


Abb. 8: Nachweis des SNPs rs4810485 im CD40 Gen durch den Verdau der PCR-Amplifikate mit dem Restriktionsenzym HpaI, Spur MA = Marker, Spuren a-r = Patientenproben

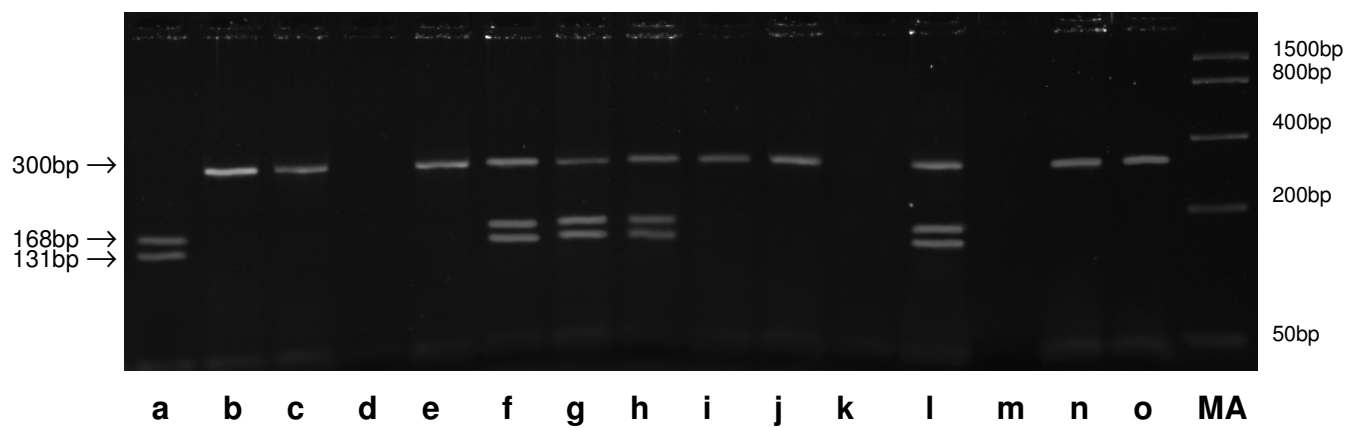


Abb. 9: Nachweis des SNPs rs2233409 im NFKBIA Gen durch den Verdau der PCR-Amplifikate mit dem Restriktionsenzym Hpy8I, Spur MA = Marker, Spuren a-o = Patientenproben

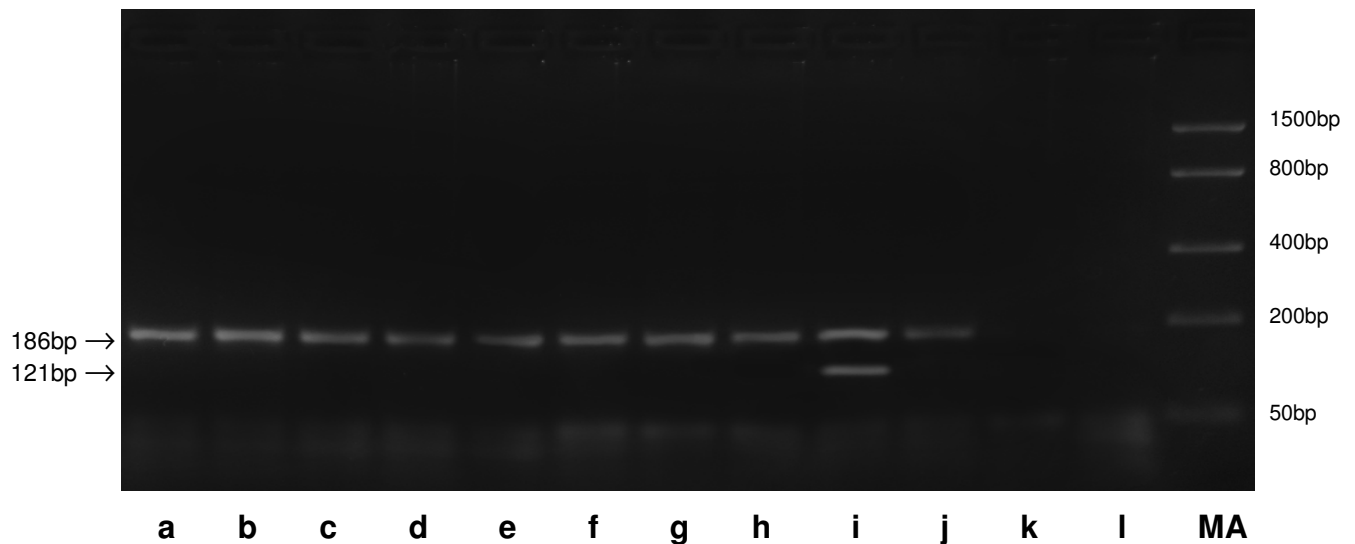


Abb. 10: Nachweis des SNPs rs2233408 im NFKBIA Gen durch den Verdau der PCR-Amplifikate mit dem Restriktionsenzym MnlI, Spur MA = Marker, Spuren a-l = Patientenproben

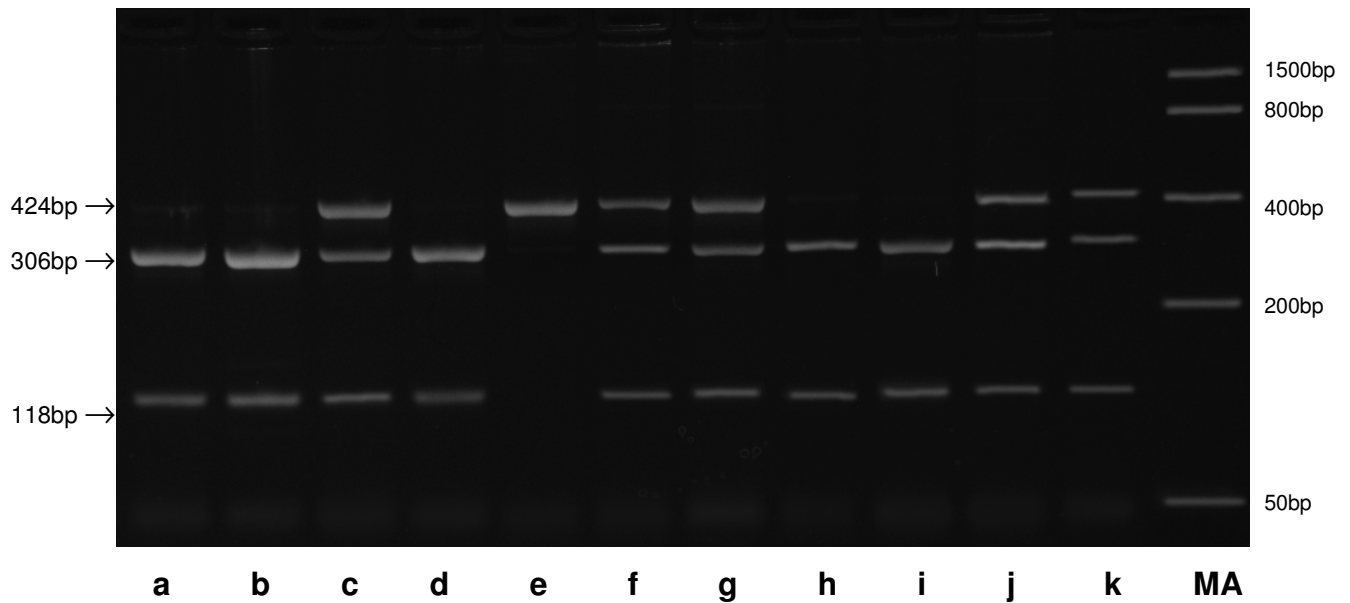


Abb. 11: Nachweis des SNPs rs696 im NFKBIA Gen durch den Verdau der PCR-Amplifikate mit dem Restriktionsenzym HaeIII, Spur MA = Marker, Spuren a-k = Patientenproben

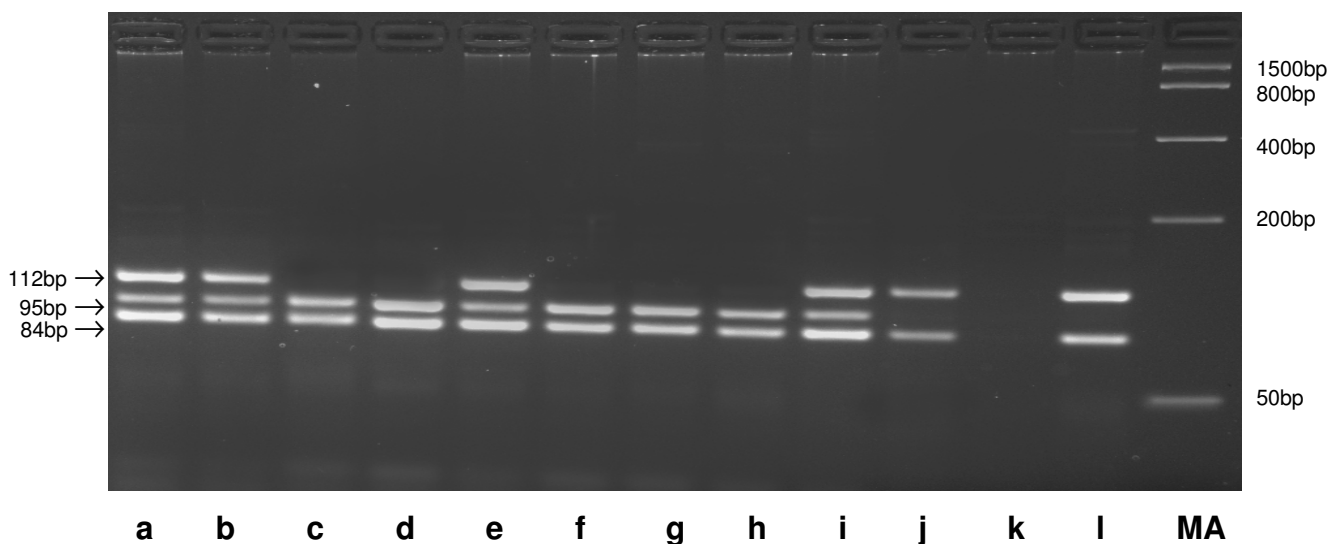


Abb. 12: Nachweis des SNPs rs2233406 im NFKBIA Gen durch den Verdau der PCR-Amplifikate mit dem Restriktionsenzym BslI, Spur MA = Marker, Spuren a-l = Patientenproben

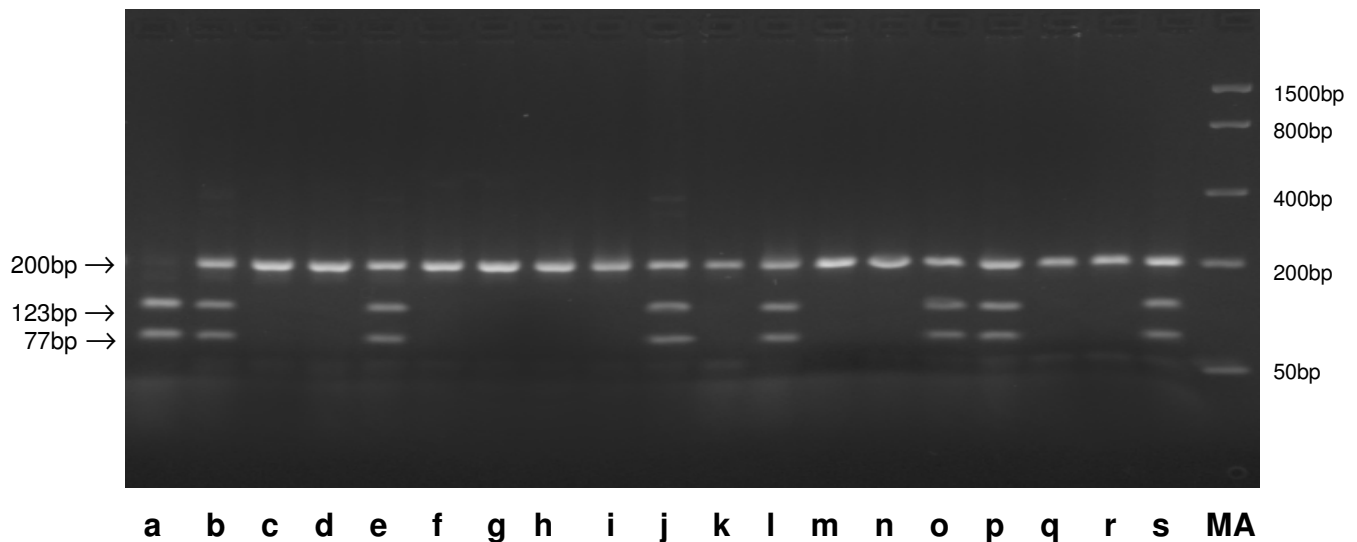


Abb. 13: Nachweis des SNPs rs3138053 im NFKB1A Gen durch den Verdau der PCR-Amplifikate mit dem Restriktionsenzym HpyCH4III, Spur MA = Marker, Spuren a-s = Patientenproben

Im Folgenden ist anhand des SNPs rs1883832 (siehe Abbildung 7) beispielhaft erklärt wie sich die Genotypisierungsergebnisse aus den Gelbildern ableiten ließen:

Nach dem Verdau der PCR-Amplifikate mit dem spezifischen Restriktionsenzym lag die DNA in Form von geschnittenen Fragmenten vor. Die zu erwartenden Fragmentlängen wurden durch die Auswahl des Enzyms festgelegt. Das Restriktionsenzym NcoI schnitt die DNA so, dass beim Vorliegen des homozygoten Genotyps CC Fragmente mit den Längen 133bp+169bp entstanden. Lag der homozygote Genotyp TT vor, findet das Enzym keine Schnittstelle und die DNA blieb mit einer Länge von 302bp ungeschnitten. Beim Auftreten des heterozygoten Genotyps CT entstanden alle drei Fragmente mit den Längen 133bp+169bp+302bp. Durch die Lage der Banden in den Gelbildern gelang unter Berücksichtigung des Markers eine eindeutige Zuordnung der Fragmentlängen. Somit ließ das Vorliegen der beiden Fragmente 133bp+169bp in den Gelspuren a, b, e, f, j, k, l und m in Abbildung 6 auf den homozygoten Genotyp CC schließen, während das Vorhandensein einer einzigen Bande mit der Länge 302bp in der Gelspur i auf den homozygoten Genotyp TT hinwies. In den Gelspuren c, d, g, h, und n waren alle drei Bandenlängen zu identifizieren,

sodass es sich bei diesen Proben um den heterozygoten Genotypen CT handeln musste.

Analog wurden nach diesem Prinzip die anderen SNPs ausgewertet. In einzelnen Fällen kam es durch Versagen der PCR-ASRA-Methode zu Ausfällen und in der entsprechenden Gelspur waren keine Banden sichtbar (siehe Tabelle 10). Diese Ausfälle wurden dann so oft retypisiert bis brauchbare Ergebnisse vorlagen. Der SNP rs2233406 wies eine Besonderheit beim Restriktionsenzymverdau auf. Sowohl beim Auftreten des Allels G als auch beim Vorkommen des Allels A existierte für das verwendete Restriktionsenzym eine obligate Schnittstelle in der DNA. Dadurch entstand bei einem erfolgreichen Verdau in beiden Fällen ein Fragment mit der Länge von 84bp. Tabelle 10 auf der nachfolgenden Seite zeigt die erzielten Genotypisierungsergebnisse anhand der Gelelektrophoresebilder. Durch die PCR-ASRA-Methode entstanden für jeden Genpolymorphismus spezifische DNA-Fragmente, welche mit den dazugehörigen erwarteten Basenpaarlängen angegeben sind.

Tabelle 10: Genotypisierungsergebnisse

SNP	Fragmente (bp*)	Ausfälle	Spuren in den Gelbildern		
			Homozygot (Wildtyp)	Heterozygot	Homozygot (Mutation)
rs1883832 (CD40)	C Allel: 133+169 T Allel: 302	keine	CC: a, b, e, f, j, k, l, m	CT: c, d, g, h, n	TT: i
rs4810485 (CD40)	G Allel: 48+142 T Allel: 200	h, p, r	GG: b, c, e, l, m, o, q	GT: d, f, g, k, n	TT: a, i, j
rs2233409 (NFKBIA)	G Allel: 300 A Allel: 131+168	d, k, m	GG: b, c, e, i, j, n, o	GA: f, g, h, l	AA: a
rs2233408 (NFKBIA)	G Allel: 186 A Allel: 65+121	k, l	GG: a, b, c, d, e, f, g, h, j	GA: i	AA: -
rs3138053 (NFKBIA)	T Allel: 200 C Allel: 77+123	keine	TT: c, d, f, g, h, i, k, m, n, q, r	TC: b, e, j, l, o, p, s	CC: a
rs696 (NFKBIA)	C Allel: 118+306 T Allel: 424	keine	CC: a, b, d, h, i	CT: c, f, g, j, k	TT: e
rs2233406 (NFKBIA)	G Allel: 17+84+95 A Allel: 84+112	k	GG: c, d, f, g, h	GA: a, b, e, i	AA: j, l

bp*=Basenpaare

3.3. Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Um zu kontrollieren, ob die experimentell ermittelten Genotypisierungsergebnisse aus der Arbeit im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht lagen, wurden die Ergebnisse aller 163 Patienten berücksichtigt. Tabelle 11 zeigt die beobachteten Genotypen, die erwarteten Genotypen, die ermittelten Frequenzen und die dazugehörigen p-Werte. Es gab keine signifikanten p-Werte. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Genotypisierungsdaten korrekt sind, da die beobachteten Genotypen mit den erwarteten Genotypen übereinstimmen.

Tabelle 11: Hardy-Weinberg-Berechnungen

SNP	Beobachtete Genotypen	Erwartete Genotypen	Hardy-Weinberg-Frequenz	p-Wert
rs4810485	GG=92 GT=62 TT=9	GG=92,8 GT=60,4 TT=9,8	57,0% 37,0% 6,0%	0,730
rs1883832	CC=79 CT=75 TT=9	CC=83,2 CT=66,5 TT=13,3	51,1% 40,8% 8,1%	0,101
rs2233409	GG=103 GA=54 AA=6	GG=103,7 GA=52,6 AA=6,7	63,6% 32,3% 4,1%	0,741
rs2233408	GG=162 GA=1 AA=0	GG=162,0 GA=1,0 AA=0,0	99,4% 0,6% 0,0%	0,969
rs696	CC=59 CT=70 TT=34	CC=54,2 CT=79,6 TT=29,2	33,3% 48,8% 17,9%	0,124
rs2233406	GG=89 GA=58 AA=16	GG=85,4 GA=65,2 AA=12,4	52,4% 40,0% 7,6%	0,161
rs3138053	TT=98 TC=53 CC=12	TT=95,1 TC=58,8 CC=9,1	58,3% 36,1% 5,6%	0,207

3.4. Vergleich der Genotyp- und Allelfrequenzen in den verschiedenen Kollektiven für die ausgewählten SNPs im CD40 Gen

Die Tabellen 12, 13 und 14 zeigen die Genotyp- und Allelfrequenzen für die beiden SNPs rs1883832 und rs4810485 im CD40 Gen für die einzelnen Patientenkollektive.

Dabei wurden die Kollektive „keine Abstoßung“ – „akute Abstoßung“, die Kollektive „keine Abstoßung“ – „multiple akute Abstoßung“ sowie „einmalig Transplantierte“ – „mehrmalig Transplantierte“ verglichen und die angenommenen rezessiven und dominanten Vererbungsgänge (siehe Punkt 2.6.4.) dargestellt.

Tabelle 12: Genotyp- und Allel-Frequenzen der CD40 Genpolymorphismen in den Kollektiven „keine Abstoßung“ und „akute Abstoßung“

SNP	Genotyp/Allel	Keine Abstoßung (n=106)	Akute Abstoßung (n=57)	Vererbung
rs4810485	GG	60	32	dominant
	GT	42	20	rezessiv
	TT	4	5	
	G T	162 50	84 30	
rs1883832	CC	51	28	dominant
	CT	51	24	rezessiv
	TT	4	5	
	C T	153 59	80 34	

OR (95% KI)	p-Wert
0,981 (0,488-1,982)	1,000
0,825 (0,397-1,687)	0,615
2,437 (0,501-12,830)	0,279
0,865 (0,497-1,519)	0,592
1,41 (0,520-2,085)	1,000
0,785 (0,388-1,576)	0,512
2,437 (0,501-12,830)	0,279
0,908 (0,535-1,553)	0,702

Bei dem Vergleich der Kollektive „keine Abstoßung“ – „akute Abstoßung“ mithilfe des exakten Fisher Tests zeigte sich im rezessiven und dominanten Vererbungsgang sowie bei den Allelhäufigkeiten kein signifikanter p-Wert.

Tabelle 13: Genotyp- und Allel-Frequenzen der CD40 Genpolymorphismen in den Kollektiven „keine Abstoßung“ und „multiple akute Abstoßung“

SNP	Genotyp/Allel	Keine Abstoßung (n=106)	Multiple akute Abstoßung (n=78)	Vererbung
rs4810485	GG	60	50	dominant
	GT	42	23	rezessiv
	TT	4	5	
	G	162	123	
	T	50	33	
rs1883832	CC	51	41	dominant
	CT	51	32	rezessiv
	TT	4	5	
	C	153	114	
	T	59	42	

OR (95% KI)	p-Wert
0,732 (0,382-1,389)	0,362
1,565 (0,807-3,086)	0,164
0,574 (0,110-2,769)	0,498
0,870 (0,510-1,470)	0,615
0,838 (0,447-1,566)	0,655
1,331 (0,709-2,514)	0,371
0,574 (0,110-2,769)	0,498
0,956 (0,583-1,557)	0,906

Bei dem Vergleich der Kollektive „keine Abstoßung“ und „multiple akute Abstoßung“ mithilfe des exakten Fisher Tests zeigte sich im rezessiven und dominanten Vererbungsgang sowie bei den Allelhäufigkeiten kein signifikanter p-Wert.

Tabelle 14: Genotyp- und Allel-Frequenzen der CD40 Genpolymorphismen in den Kollektiven „einmalig Transplantierte“ und „mehrmalig Transplantierte“

SNP	Genotyp/Allel	Einmalig Transplantierte (n=124)	Mehrmalig Transplantierte (n=39)	Vererbung
rs4810485	GG	65	27	dominant rezessiv
	GT	51	11	
	TT	8	1	
	G T	181 67	65 13	
rs1883832	CC	57	22	dominant rezessiv
	CT	59	16	
	TT	8	1	
	C T	173 75	60 18	

OR (95% KI)	p-Wert
2,034 (0,899-4,828)	0,095
0,564 (0,231-1,298)	0,186
0,383 (0,008-3,018)	0,688
1,848 (0,933-3,897)	0,071
1,517 (0,693-3,368)	0,275
0,768 (0,343-1,684)	0,581
0,383 (0,008-3,018)	0,688
1,444 (0,777-2,781)	0,252

Bei dem Vergleich der Kollektive „einmalig Transplantierte“ und „mehrmalig Transplantierte“ mithilfe des exakten Fisher Tests zeigte sich im rezessiven und dominanten Vererbungsgang sowie bei den Allelhäufigkeiten kein signifikanter p-Wert. Bei dem SNP rs4010485 zeigten sich zwei p-Werte Nahe des Signifikanzniveaus, sodass hier von einem Trend gesprochen werden kann (p=0,095, p=0,071).

3.5. Vergleich der Genotyp- und Allelfrequenzen in den verschiedenen Kollektiven für die ausgewählten SNPs im NFKBIA Gen

Die Tabellen 15, 16 und 17 zeigen die Kollektivvergleiche für die untersuchten SNPs des NFKBIA Gens. Dabei wurden die Kollektive „keine Abstoßung“ – „akute Abstoßung“, die Kollektive „keine Abstoßung“ – „multiple akute Abstoßung“ sowie „einmalig Transplantierte“ – „mehrmalig Transplantierte“ verglichen und die angenommenen rezessiven und dominanten Vererbungsgänge (siehe Punkt 2.6.4.) dargestellt.

Tabelle 15: Genotyp- und Allel-Frequenzen der NFKBIA Genpolymorphismen in den Kollektiven „keine Abstoßung“ und „akute Abstoßung“

SNP	Genotyp/ Allel	Keine Abstoßung (n=106)	Akute Abstoßung (n=57)	Vererbung
rs2233409	GG	70	33	dominant
	GA	33	21	rezessiv
	AA	3	3	
	G A	173 39	87 27	
rs2233408	GG	105	57	dominant
	GA	1	0	rezessiv
	AA	0	0	
	G A	211 1	114 0	
rs2233406	GG	61	28	dominant
	GA	37	21	rezessiv
	AA	8	8	
	G A	159 53	77 37	
rs696	CC	35	24	dominant
	CT	47	23	rezessiv
	TT	24	10	
	C T	117 95	71 43	
rs3138053	TT	67	31	dominant
	TC	34	19	rezessiv
	CC	5	7	
	T C	168 44	81 33	

OR (95% KI)	p-Wert
0,709 (0,347-1,451)	0,313
1,288 (0,616-2,671)	0,489
1,899 (0,246-14,675)	0,423
0,727 (0,404-1,322)	0,312
Inf (0,0138-Inf)	1,000
0 (0,000-72,445)	1,000
0 (0-Inf)	1,000
Inf (0,0138-Inf)	1,000
0,714 (0,355-1,431)	0,326
1,087 (0,524-2,233)	0,864
1,991 (0,611-6,495)	0,269
0,695 (0,409-1,185)	0,156
1,472 (0,717-3,012)	0,306
0,850 (0,417-1,713)	0,740
0,728 (0,285-1,747)	0,546
1,340 (0,821-2,199)	0,241
0,696 (0,343-1,409)	0,315
1,058 (0,500-2,209)	0,863
2,808 (0,726-11,817)	0,114
0,644 (0,369-1,127)	0,103

Bei dem Vergleich der Kollektive „keine Abstoßung“ – „akute Abstoßung“ mithilfe des exakten Fisher Tests zeigte sich im rezessiven und dominanten Vererbungsgang sowie bei den Allelhäufigkeiten kein signifikanter p-Wert. Bei der Durchführung des exakten Fisher Tests für den SNP rs2233408 ergaben sich aufgrund der Genotypen- und Allelverteilung irreguläre Werte (=Inf.), sodass hier keine adäquate Auswertung möglich war.

Tabelle 16: Genotyp- und Allel-Frequenzen der NFKBIA Genpolymorphismen in den Kollektiven „keine Abstoßung“ und „multiple akute Abstoßung“

SNP	Genotyp/ Allel	Keine Abstoßung (n=106)	Multiple akute Abstoßung (n=78)	Vererbung
rs2233409	GG	70	46	dominant rezessiv
	GA	33	30	
	AA	3	2	
	G A	173 39	122 34	
rs2233408	GG	105	77	dominant rezessiv
	GA	1	1	
	AA	0	0	
	G A	211 1	155 1	
rs2233406	GG	61	39	dominant rezessiv
	GA	37	30	
	AA	8	9	
	G A	159 53	108 48	
rs696	CC	35	28	dominant rezessiv
	CT	47	40	
	TT	24	10	
	C T	117 95	96 60	
rs3138053	TT	67	42	dominant rezessiv
	TC	34	30	
	CC	5	6	
	T C	168 44	114 42	

OR (95% KI)	p-Wert
1,350 (0,706-2,585)	0,356
0,725 (0,374-1,402)	0,347
1,106 (0,124-13,552)	1,000
1,236 (0,713-2,135)	0,430
1,361 (0,017-107,956)	1,000
0,735 (0,009-58,279)	1,000
0 (0-Inf)	1,000
1,360 (0,017-107,269)	1,000
1,353 (0,722-2,544)	0,369
0,859 (0,448-1,649)	0,644
0,627 (0,200-1,934)	0,442
1,332 (0,818-2,168)	0,238
0,881 (0,456-1,709)	0,754
0,758 (0,404-1,418)	0,373
1,983 (0,843-4,987)	0,124
0,770 (0,494-1,198)	0,241
1,469 (0,777-2,785)	0,226
0,757 (0,392-1,461)	0,434
0,596 (0,138-2,443)	0,532
1,405 (0,840-2,351)	0,173

Bei dem Vergleich der Kollektive „keine Abstoßung“ und „multiple akute Abstoßung“ mithilfe des exakten Fisher Tests zeigte sich im rezessiven und dominanten Vererbungsgang sowie bei den Allelhäufigkeiten kein signifikanter p-Wert. Bei der Durchführung des exakten Fisher Tests für den SNP rs2233408 ergaben sich aufgrund der Genotypen- und Allelverteilung irreguläre Werte (=Inf.), sodass hier keine adäquate Auswertung möglich war.

Tabelle 17: Genotyp- und Allel-Frequenzen der NFKBIA Genpolymorphismen in den Kollektiven „einmalig Transplantierte“ und „mehrmalig Transplantierte“

SNP	Genotyp/ Allel	Einmalig Transplantierte (n=124)	Mehrmalig Transplantierte (n=39)	Vererbung
rs2233409	GG	81	22	dominant rezessiv
	GA	38	16	
	AA	5	1	
	G A	200 48	60 18	
rs2233408	GG	124	38	dominant rezessiv
	GA	0	1	
	AA	0	0	
	G A	248 0	77 1	
rs2233406	GG	70	19	dominant rezessiv
	GA	43	15	
	AA	11	5	
	G A	183 65	53 25	
rs696	CC	45	14	dominant rezessiv
	CT	49	21	
	TT	30	4	
	C T	139 109	49 29	
rs3138053	TT	78	20	dominant rezessiv
	TC	37	16	
	CC	9	3	
	T C	193 55	56 22	

OR (95% KI)	p-Wert
0,689 (0,311-1,540)	0,345
1,570 (0,692-3,512)	0,246
0,628 (0,013-5,867)	1,000
0,801 (0,491-1,576)	0,519
0 (0,000-12,266)	0,239
Inf (0,110-Inf)	0,190
0 (0-Inf)	1,000
0 (0,000-12,266)	0,239
0,734 (0,334-1,608)	0,462
1,176 (0,516-2,622)	0,704
1,507 (0,383-5,117)	0,538
0,754 (0,420-1,374)	0,314
0,983 (0,427-2,200)	1,000
1,780 (0,811-3,942)	0,139
0,360 (0,086-1,130)	0,072
1,324 (0,763-2,327)	0,358
0,623 (0,282-1,374)	0,261
1,631 (0,718-3,655)	0,240
1,064 (0,176-4,571)	1,000
0,726 (0,395-1,363)	0,287

Bei dem Vergleich der Kollektive „einmalig Transplantierte“ und „mehrmalig Transplantierte“ mithilfe des exakten Fisher Tests zeigte sich im rezessiven und dominanten Vererbungsgang sowie bei den Allelhäufigkeiten kein signifikanter p-Wert. Bei dem SNPs rs696 zeigte sich ein p-Werte Nahe des Signifikanzniveaus, sodass hier von einem Trend gesprochen werden kann ($p=0,072$). Bei der Durchführung des exakten Fisher Tests für den SNP rs2233408 ergaben sich aufgrund der Genotypen- und Allelverteilung irreguläre Werte (=Inf.), sodass hier keine adäquate Auswertung möglich war.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es beim Vergleich der Patientenkollektive im CD40 und NFKBIA Gen **keine** statistisch signifikanten p-Werte gab.

4. DISKUSSION

Genpolymorphismen als Biomarker für akute Nierenabstoßungsreaktionen haben sich in der heutigen Transplantationsmedizin noch nicht etabliert. Eben so wenig wird die immunsuppressive Therapie an individuelle genetische Merkmale eines Patienten angepasst, sondern meistens nach allgemein gebräuchlichen Protokollen ausgewählt. In dieser Arbeit wurde die Assoziation zwischen sieben Genpolymorphismen in zwei Genen (CD40 und NFKBIA) und der Ausprägung von akuten Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantation sowie die Assoziation zu Retransplantationen untersucht. Eine solche Assoziation wäre die Voraussetzung für die Etablierung eines Biomarkers als Instrument in der medizinischen Praxis. Die erfolgreiche Biomarkersuche könnte dann die Grundlage einer individualisierten immunsuppressiven Therapie mit Reduzierung der Nebenwirkungen und Anpassung an unterschiedliche immunologische Risiken bieten.

4.1. CD40

Das CD40-Molekül spielt eine entscheidende Rolle im Immunsystem (Chatzigeorgiou et al., 2009, Zervou et al., 2011). Damit verbunden sind viele Mechanismen wie die Entstehung von Entzündungen, das Auftreten von Abstoßungsreaktionen sowie die Ausbildung von diversen Erkrankungen (Chatzigeorgiou et al., 2009, Zervou et al., 2011, Suttles and Stout, 2009, Burdon et al., 2006, Onouchi et al., 2004). Die Aktivierung von CD40-tragenden Zellen erfolgt über den Kontakt mit Zellen, die den CD40-Liganden (CD154) auf ihrer Oberfläche tragen (Chatzigeorgiou et al., 2009). Über eine intrazelluläre Signalkaskade, bei der u.a. die Moleküle TRAF6, TRAF2 und NFκB eine Rolle spielen, werden verschiedene Signaltransduktionskaskaden aktiviert (ERK1/2-Signalweg, NFκB-Signalweg) die zur Ausbildung einer proinflammatorischen Immunantwort führen (Suttles and Stout, 2009). Dazu gehört die Produktion von Zytokinen, Chemokinen, Matrixmetalloproteinasen, Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmolekülen (Chatzigeorgiou et al., 2009). Außerdem trägt CD40 zur Aktivierung von B-Zellen (O'Connor et al., 2003, Clark et al., 1996) und zur Produktion von CD8⁺-T-Gedächtniszellen bei (Bourgeois et al., 2002) – zwei

Mechanismen, die während eines Abstoßungsprozesses eine entscheidende Rolle spielen.

Die beiden in dieser Arbeit untersuchten SNPs aus dem CD40 Gen haben Einfluss auf die Expressionsrate des Gens. Der SNP rs1883832 betrifft die Kozak-Sequenz (5'-UTR) und beeinflusst somit die Translationsintensität (Buck et al., 2006). Der SNP rs4810485 nimmt Einfluss auf die Expression des CD40-Moleküls bei CD14⁺ Monozyten und CD19⁺ B-Zellen (Vazgiourakis et al., 2011).

In dieser Arbeit wurde keine Assoziation zwischen den ausgewählten SNPs und dem Auftreten von akuten Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantationen oder der Retransplantationshäufigkeit gefunden. Diese Resultate lassen die Interpretation zu, dass die untersuchten SNPs des CD40 Gens offenbar keine Bedeutung für die Neigung zur Ausprägung von akuten Abstoßungsreaktionen und Retransplantationen haben. Aufgrund der fehlenden Assoziation können die SNPs nicht als Biomarker im Zusammenhang mit einer individualisierten Immuntherapie verwendet werden.

Im Folgenden werden verschiedene Aspekte dargestellt, welche diese fehlende Assoziation zu erklären versuchen.

1. Aktuell bietet die Forschung zu der Fragestellung wie sie in dieser Arbeit dargestellt wurde keine vergleichbaren Ergebnisse. Da keine Vergleichsdaten existieren, ergibt sich kein eindeutiger Bezugspunkt für die Resultate dieser Studie. Eine Abschätzung der Wahrscheinlichkeit für das Erlangen signifikanter Ergebnisse im Vorfeld war somit kaum möglich und die Bewertung der Ergebnisse ist unter diesem Aspekt eingeschränkt. Möglicherweise wäre zur Abklärung einer Signifikanz für einen der untersuchten SNPs im Zusammenhang mit akuten Abstoßungsreaktionen und Retransplantationshäufigkeiten die (nachträgliche) Berechnung der Power und die damit im Zusammenhang stehende Veränderung des Studiendesigns, beispielsweise im Sinne der Verwendung eines größeren Patientenkollektivs, ein Ansatz für eine zukünftige Studie.

2. Da alle Hardy-Weinberg-Berechnungen im Gleichgewicht lagen, können methodische Fehler in der Genotypisierung mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden.
3. Die ethnische Herkunft der Patienten spielt eine wichtige Rolle. Andere Populationen, darunter Afrikanische Stämme, Asiaten und US-Amerikaner zeigen ein anderes Verteilungsmuster von SNPs als die in dieser Arbeit untersuchte kaukasische Bevölkerung. Für die SNPs rs1883832 und rs4810485 gilt beispielsweise, dass durchschnittlich ca. 55% der Europäer den Genotyp CC (rs1883832) bzw. GG (rs4810485), 42% den Genotyp CT (rs1883832) bzw. GT (rs4810485) und nur 3% den Genotyp TT (rs1883832, rs4810485) aufweisen. Es gibt jedoch Bevölkerungsgruppen aus Afrika, die Häufigkeiten von um die 85%-100% für den Genotyp CC bzw. GG zeigen. In der japanischen Bevölkerungsgruppe tragen nur ca. 24% den Genotyp CC des SNPs rs1883832 und ca. 29% den Genotyp GG des SNPs rs4810485. Die unterschiedlichen Verteilungsmuster der SNPs deuten darauf hin, dass Assoziationen möglicherweise von der ethnischen Herkunft des Organempfängers abhängen (NCBI, 03.08.2014, 13:52, NCBI, 03.08.2014, 13:53).
4. Im CD40 Gen liegen 341 SNPs, davon 53 im Promotor (NCBI, 03.08.2014, 13:52). Der Einfluss dieser SNPs auf die Genexpression ist unbekannt. Denkbar ist, dass sich hierunter weitere SNPs befinden, die die Expression von CD40 funktionell beeinflussen. Möglicherweise zeigt einer dieser SNPs eine Assoziation. Außerdem können auch außerhalb der CD40 Genregion SNPs lokalisiert sein, die die Expression von CD40 modifizieren. Diese SNPs sind allerdings bisher noch nicht identifiziert worden, sodass eine Assoziationsanalyse im Augenblick noch nicht möglich ist.
5. Nicht nur die in dieser Arbeit untersuchten Transplantatempfänger, sondern auch die dazugehörigen Organspender tragen das CD40 Molekül auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen. Ein Zusammenhang mit dem Auftreten von akuten Abstoßungsreaktionen im entsprechenden Empfängerorganismus ist somit wahrscheinlich und sollte in weiteren Studien analysiert werden, da für diese Arbeit leider kein Material von Organspendern zur Verfügung stand.

Das CD40-Molekül ist an der Ausprägung von Entzündungsprozessen beteiligt und kann durch übermäßige Bildung von Zytokinen und weiteren Immunfaktoren zu einer immunologischen Hyperaktivität führen (Chatzigeorgiou et al., 2009). Dies kann neben der Gefahr von Transplantationskomplikationen auch die Entstehung von Autoimmunerkrankungen begünstigen (Suttles and Stout, 2009, Steinman, 2001, Zervou et al., 2011). Die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen ist in einem hohen Maße auf die genetisch festgelegten HLA-Moleküle zurückzuführen, die den T-Lymphozyten Peptide präsentieren (siehe Punkt 1.2.1.) (D'Elios et al., 1997, Guo et al., 2001, Denton et al., 1999, Ganji and Broumand, 2007). Wenn dabei körpereigene Peptide präsentiert werden, die als fremd erkannt werden, kommt es zu einer Autoimmunreaktion (Steinman, 2001). Bei der zellulär vermittelten akuten Abstoßungsreaktion spielen CD8⁺-T-Lymphozyten eine Rolle indem sie fremde HLA-Merkmale auf den Oberflächen der Zellen des Spenderorgans erkennen und daraufhin ihr zytotoxisches Potential gegen die Transplantatzellen richten (siehe Punkt 1.2.2.2.1.) (Ganji and Broumand, 2007, Guo et al., 2001, D'Elios et al., 1997, Denton et al., 1999). Da eine Assoziation zwischen den hier untersuchten SNPs und der Ausbildung von Autoimmunerkrankungen besteht (siehe unten), würde man auch einen Zusammenhang zum Auftreten von akuten Abstoßungsreaktionen erwarten. Die akute vaskulär-humorale Abstoßungsreaktion und die chronische Transplantatdysfunktion unterscheiden sich in ihren Mechanismen von der zellulären Abstoßung, wobei die chronische Transplantatdysfunktion pathophysiologisch weniger Ähnlichkeit zu der Entstehung von Autoimmunerkrankungen zeigt (Halloran et al., 1999, Hertig et al., 2008).

Wie bereits erwähnt, findet sich eine Assoziation zwischen einigen Autoimmunerkrankungen und den ausgewählten SNPs. Die SNPs scheinen daher eine größere Bedeutung für die Ausprägung von Autoimmunerkrankungen als für akute Abstoßungsreaktionen und Retransplantationshäufigkeiten zu haben.

Zervou et al. zeigten 2011 in einer Studie beispielsweise den Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus rs4810485 und der Anfälligkeit, an Psoriasis zu erkranken. Psoriasis ist eine chronisch-entzündliche dermatologische

Erkrankung, bei deren Genese die Expression von proinflammatorischen Zytokinen und die Aktivierung von T-Zellen und Keratinozyten eine Rolle spielt (Wang et al., 2014). Das Allel G dieses SNPs war im Vergleich zu der Kontrollgruppe bei erkrankten Personen überrepräsentiert (Zervou et al., 2011). Die Polymorphismen rs1883832 und rs6074022 sind zudem mit der Ausprägung der Multiplen Sklerose assoziiert (Sokolova et al., 2013). Mikrogliazellen und Makrophagen spielen bei der Demyelinisierung der Nerven bei Multipler Sklerose eine wichtige Rolle, die Faktoren für deren Aktivierung sind jedoch bisher nur unzureichend erfasst (Bsibsi et al., 2014).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keine Assoziation für die von uns untersuchten CD40 SNPs mit dem Auftreten von akuten Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantationen oder der Retransplantationshäufigkeit gefunden werden konnte.

Im Gegensatz zu den von uns untersuchten SNPs im CD40 Gen zeigen aber eine Reihe von SNPs in anderen Genen eine Assoziation zu akuten Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantation. Dazu zählt z.B. der SNP rs5498 im ICAM1 Gen. Die Genpolymorphismen rs5498 im ICAM1 Gen und die SNPs rs1041163 und rs3170794 im VCAM1 Gen wurden bezüglich des Auftretens von akuten Abstoßungsreaktionen sowie einer verspäteten Funktionsaufnahme des Transplantats untersucht. Diese Adhäsionsmoleküle spielen eine Rolle bei der Entstehung der chronischen Transplantatnephropathie. Die Ergebnisse der Arbeit führen zu der Annahme, dass der SNP rs5498 ICAM1 GG mit einem langen Transplantatüberleben assoziiert ist (Kloda et al., 2013). In einer koreanischen Studie von 2013 wurden 347 Nierentransplantatempfänger auf den Zusammenhang zwischen zwei Genpolymorphismen im TGFBR2 Gen und der Ausbildung einer akuten Abstoßungsreaktion untersucht. Das TGFBR2 Gen ist ein Tumorsuppressorgen und kodiert den „transforming growth factor beta receptor 2“.

Der SNP rs2228048 des TGFBR2 Gens spielt bei der Entstehung von akuten Transplantatabstoßungen eine wichtige Rolle. Er ist signifikant mit akuten Abstoßungsreaktionen assoziiert (Kim et al., 2013b). Eine weitere Arbeit aus dem

Jahr 2013 untersuchte zwei Genpolymorphismen im TLR9 Gen und deren Rolle bei der Entstehung von akuten Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantationen. Die Polymorphismen rs187084 und rs352140 des TLR9 Gens zeigen eine Assoziation zu dem Risiko der Entwicklung von akuten Abstoßungsreaktionen (Kim et al., 2013a). Grinyó et al. belegten 2008 einen Zusammenhang zwischen den vier Genpolymorphismen ABCB1 2677T (rs2032582=ABCB1 2677T/A), IMPDH2 3757C (rs11706052=IMPDH2 3757T/C), IL-10 -592A (rs1800872=IL-10 -592A/C), TNF- α G-308A (rs1800629=TNF- α -308A/G) und dem Auftreten von akuten Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantation (Grinyo et al., 2008).

4.2. NFKBIA

NF κ B reguliert Gene, deren Produkte im Immunsystem eine Rolle spielen (Molinero and Alegre, 2011, Romzova et al., 2006, Thakur et al., 1994). Dazu gehört neben der Bildung von Apoptosefaktoren und Entzündungsmediatoren die Sekretion von IL-2 durch T-Lymphozyten (Molinero and Alegre, 2011, Romzova et al., 2006). Letztgenanntes reguliert die Differenzierung von zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen, die eine Schlüsselrolle im Prozess der akuten Abstoßungsreaktion einnehmen (siehe Punkt 1.2.1) (Denton et al., 1999, D'Elis et al., 1997, Ganji and Broumand, 2007, Guo et al., 2001).

Die in dieser Arbeit untersuchten SNPs aus dem NFKBIA Gen haben Einfluss auf die Expressionsrate des Gens. Der SNP rs3138053 beeinflusst die Affinität des Proteins ROR (RAR-Related Orphan Receptor) und modifiziert, genauso wie der SNP rs2233406 (Ali et al., 2013, Romzova et al., 2006, Gao et al., 2007), die Transkriptionsrate des Gens (Spink et al., 2007). Der SNP rs2233408 verändert die Affinität des Transkriptionsfaktors C/EBP (CCAAT/Enhancer-Binding-Proteine) und die Transkriptionsrate des Gens (Lin et al., 2007). Der SNP rs2233409 modifiziert ebenfalls die Transkriptionsrate des Gens (Ali et al., 2013, Romzova et al., 2006, Gao et al., 2007). Der SNP rs696 befindet sich an der Position +2756 in der 3'-UTR des Gens (Romzova et al., 2006). Diese 3'-UTR ist eine regulatorische Region, die für die Stabilität und Lebensdauer der entsprechenden mRNA verantwortlich ist (Conne et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde keine Assoziation zwischen den ausgewählten SNPs und dem Auftreten von akuten Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantationen oder der Retransplantationshäufigkeit gefunden. Diese Resultate lassen die Interpretation zu, dass die untersuchten SNPs des NFKBIA Gens keine Bedeutung für die Neigung zur Ausprägung von akuten Abstoßungsreaktionen und Retransplantationen haben. Aufgrund der fehlenden Assoziation können die SNPs nicht als Biomarker im Zusammenhang mit einer individualisierten Immuntherapie verwendet werden.

Im Gegensatz zu den hier gefundenen Ergebnissen gibt es Arbeiten, in denen die Bedeutung der untersuchten SNPs aus dem NFKBIA Gen zu anderen Erkrankungen dargestellt wurde und in denen signifikante Werte gefunden werden konnten. Kurylowicz et al. untersuchten beispielsweise den Zusammenhang zwischen sechs SNPs in zwei Genen und dem Auftreten von Morbus Basedow. Dabei zeigten die drei untersuchten SNPs aus dem NFKBIA Gen (rs2233409, rs2233406, rs696) zwar keinen signifikanten Zusammenhang zur Anfälligkeit an M. Basedow zu erkranken, die Allele rs2233409T und rs2233406T waren jedoch signifikant häufiger mit der Entwicklung von endokrinen Ophthalmopathien assoziiert (Kurylowicz et al., 2009). Wang et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen dem SNP rs2233408 und der Inzidenz von Magenkrebs. Menschen aus Südchina mit dem homozygoten rs2233408 TT Genotyp und dem heterozygoten rs2233408 TC Genotyp haben im Vergleich zu Homozygoten CC-Trägern ein signifikant niedrigeres Risiko, an Magenkrebs zu erkranken (Wang et al., 2010). Die rheumatoide Arthritis ist eine „chronisch-entzündliche Systemerkrankung, die durch Synovialitis zu Arthritis, Bursitis und Tendovaginitis führt“ (Herold, 2012). Lin et al. zeigten, dass bei Patienten mit rheumatoider Arthritis der Genotyp -826C/T im Vergleich zu -826C/C-Trägern signifikant öfter vorkommt ist ($p=0,009$). Das gilt auch für die Allelfrequenz des -826T-SNPs. Das Allel -550A kommt ebenfalls signifikant öfter bei Patienten mit einer rheumatoiden Arthritis vor. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Allele -826T und -550A mit einem erhöhten Risiko, an rheumatoider Arthritis zu erkranken, einhergehen (Lin et al., 2007). 2007 untersuchten Gao et al. die Assoziation zwischen dem SNP rs696 und dem Auftreten von kolorektalen Tumoren in der schwedischen und chinesischen

Bevölkerung. Der Genotyp GG führte zu einer verminderten Überlebenszeit bei den schwedischen Patienten (Gao et al., 2007). Der Genotyp AG kam bei chinesischen Patienten häufiger vor als bei der chinesischen Kontrollgruppe (Gao et al., 2007). Der Systemische Lupus Erythematoses (SLE) ist eine „immunologische Systemerkrankung mit Beteiligung der Haut und des Gefäßbindegewebes zahlreicher Organe mit Vaskulitis der kleinen Arterien und Arteriolen, verbunden mit der Ablagerung von Immunkomplexen, die aus DNA, Anti-DNA, Komplement und Fibrin bestehen“ (Herold, 2012). Lin et al. zeigten 2008 den Zusammenhang zwischen bestimmten Genotypen und der Ausprägung eines Systemischen Lupus Erythematoses. Es wurden fünf Promotorpolymorphismen im NFKBIA Gen (-881A/G, -826C/T, -550A/T, -519C/T, -297C/T) untersucht, wobei die Häufigkeit des Genotyps NFKBIA 826C/T bei SLE-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht war (Chia-Hui Lin, 2008).

Die ausgewählten SNPs spielen folglich beim Auftreten von bestimmten Erkrankungen eine Rolle, ein Zusammenhang zu akuten Abstoßungsreaktionen oder Retransplantationen konnte jedoch (auch in anderen Studien) nicht nachgewiesen werden.

4.3. Unterschiede von akuten zellulären und vaskulär-humoralen Abstoßungsreaktionen

Die verschiedenen Arten von akuten Abstoßungsreaktionen unterscheiden sich in ihrer Pathophysiologie (siehe Punkt 1.2.2.). Möglicherweise könnte dies für den Zusammenhang zu den ausgewählten SNPs wichtig sein, da diese wiederum selbst verschieden im Organismus agieren (siehe Punkt 1.5.). Die akute zelluläre Abstoßungsreaktion wird vor allem durch CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten hervorgerufen (Ursus-Nikolaus Riede, 2004, Ganji and Broumand, 2007), während die akute vaskulär-humorale Abstoßungsreaktion durch Donorspezifische Antikörper entsteht, die entweder bereits vor der Transplantation im Empfängerorganismus vorhanden waren oder sich nach der Transplantation neu entwickelt haben (Puttarajappa et al., 2012, Terasaki and Mizutani, 2006). Diese beiden Formen der akuten Abstoßung können auch

gleichzeitig auftreten (Agarwal et al., 2011). Weiterhin wird bei der akuten zellulären Abstoßungsreaktion zwischen einer frühen (≤ 6 Monate) und einer späten Form (> 6 Monate) unterschieden (Wu et al., 2014).

Eine Berücksichtigung dieser Unterschiede in Form einer weiteren Aufgliederung des Kollektivs „akute Abstoßung“ in die verschiedenen Unterformen der akuten Abstoßungsreaktionen mit ausreichend großen Patientenzahlen wäre für eine zukünftige Arbeit denkbar.

4.4. Ursachen des Transplantatverlustes

Ein Verlust des Transplantats, der im weiteren Verlauf zu der Notwendigkeit einer erneuten Transplantation führt, kann verschiedene Ursachen haben. Ein Verlust aufgrund operativer Komplikationen wurde im Vorfeld anhand der klinischen Dokumentation ausgeschlossen. Darunter fallen z.B. thrombotische oder hämorrhagische Ereignisse, Stenosen, Leckagen und Infektionen, die den Transplantationserfolg beeinträchtigen (Hernandez et al., 2006).

Somit ergeben sich immunologische und einige nicht-immunologische Ursachen, die nach einer erfolgreichen Operation für ein Transplantatversagen infrage kommen. Immunologische Gründe für eine Nephrektomie können eine hyperakute Abstoßungsreaktion aufgrund von präformierten zytotoxischen Antikörpern oder eine akute Abstoßungsreaktion durch T-Lymphozyten sein (Terasaki and Mizutani, 2006, Ganji and Broumand, 2007, Puttarajappa et al., 2012, Le Moine et al., 2002). Die chronische Transplantatnephropathie, welche häufig durch die Einnahme von Calcineurininhibitoren bedingt ist (Morozumi et al., 2004, Issa et al., 2013) und die BK-Nephropathie, eine virale Infektion die durch die immunsupprimierte Lage des Organismus von nierentransplantierten Patienten begünstigt wird (Hirsch et al., 2002, Masutani, 2014), sind beispielsweise nicht-immunologisch bedingt und führen ebenfalls zu einem Verlust des transplantierten Organs und damit unter Umständen zu mehrmaligen Transplantationen (Issa et al., 2013, Hirsch et al., 2002, Morozumi et al., 2004, Masutani, 2014). Auch das Auftreten einer CMV-Infektion kann durch eine Abstoßungsreaktion zu einem Transplantatverlust führen (Reinke et al., 1994, Stern et al., 2014, Lee et al., 2014b).

Dass die verschiedenen immunologischen und nicht-immunologischen Gründe für einen Transplantatverlust in der vorliegenden Arbeit nicht weiter unterteilt wurden, könnte eine Erklärung für die fehlende Signifikanz bei dem Kollektivvergleich „keine Abstoßung“ – „multiple akute Abstoßung“ darstellen.

4.5. Weitere immunologische Ursachen für akute Abstoßungsreaktionen oder Retransplantationen

SNPs sind nur zu einem gewissen Teil als kausaler Grund für akute Abstoßungsreaktionen und das Transplantatüberleben verantwortlich. Im Folgenden sind weitere – in der Arbeit berücksichtigte – Ursachen aufgeführt, die ebenfalls als Ursache für die Entstehung von akuten Abstoßungsreaktionen eine Rolle spielen.

4.5.1. Alter zum Zeitpunkt der letzten Transplantation

Ältere Transplantatempfänger haben eine reduzierte immunologische Aktivität und damit ein geringeres Risiko für Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantationen (Tullius et al., 2010, Friedman et al., 2004, de Fijter, 2005, Palomar et al., 2002).

Das Durchschnittsalter der Patienten im Gesamtkollektiv zum Zeitpunkt der letzten Transplantation lag bei etwa 51 Jahren. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Kollektiven zu verzeichnen, sodass unsere Studie diese publizierte Abhängigkeit vom Alter nicht findet. Möglicherweise kristallisiert sich dieser Zusammenhang bei einem deutlich größeren Patientenkollektiv heraus. Zusätzlich könnte auch die Beziehung zwischen dem Alter der Organspender und dem Auftreten von akuten Abstoßungsreaktionen untersucht werden. Auf Seiten der Organspender gilt ein Spendealter von >50 Jahren als Risikofaktor für das Auftreten von akuten zellulären Abstoßungsreaktionen im Empfängerorganismus und die Wahrscheinlichkeit, das Transplantat im Falle einer solchen Abstoßung erhalten zu können, ist gering (de Fijter, 2005, Hricik et al., 2013, Palomar et al., 2002).

4.5.2. HLA-Mismatche

Für die Nierentransplantation sind die drei HLA-Loci A, B und DR von zentraler Bedeutung (Kosmoliaptsis et al., 2014). Eine HLA-Differenz führt eher zum Auftreten von akuten Abstoßungsreaktionen nach der Transplantation (Opelz and Dohler, 2007, Kosmoliaptsis et al., 2014, Opelz et al., 1999). Patienten, die ein Transplantat mit einer niedrigen Anzahl an HLA-Mismatchen erhalten, produzieren weniger HLA-Antikörper als Diejenigen, bei denen das transplantierte Organ eine größere HLA-Differenz zum eigenen Genom aufweist (Dankers et al., 2004, Kosmoliaptsis et al., 2014, Opelz et al., 1999). In solch günstigen Fällen ist der Erfolg einer Retransplantation zu einem späteren Zeitpunkt aufgrund eines Transplantatverlustes als hoch einzuschätzen (Sanfilippo et al., 1987, Hourmant et al., 2005), denn bei einer Retransplantation können HLA-Antikörper die Ausprägung von akuten Abstoßungsreaktionen begünstigen und das Transplantatüberleben begrenzen, insbesondere wenn sie donorspezifisch sind (Akalın and Pascual, 2006, Dankers et al., 2004, Dinis et al., 2014). HLA-Antikörper können vor einer Transplantation durch die Sensibilisierungsereignisse Schwangerschaft, Transfusion und vorangegangene Transplantationen gebildet werden (Lucas et al., 2014, Iyer et al., 2013, Gralla et al., 2013).

Bei der Gegenüberstellung der durchschnittlichen HLA-Mismatche der Patienten zeigten sich in keinem Kollektivvergleich signifikante p-Werte. Eine Überprüfung mit größeren Patientenkollektiven wäre ratsam, um die Ergebnisse zuverlässig mit der aktuellen Literatur vergleichen zu können.

4.5.3. Geschlechterverteilung

In dem Gesamtkollektiv der vorliegenden Arbeit befanden sich 101 männliche (62%) und 62 (38%) weibliche Patienten. Weltweit durchgeführte Studien bestätigen die Tatsache, dass eine Ungleichheit zwischen Männern und Frauen besteht was den Empfang von Nierentransplantaten angeht (Jindal et al., 2005, Kayler et al., 2002, Kayler et al., 2003, Bal and Saikia, 2007). Frauen haben eine geringere Chance auf Hämodialyse und Transplantation als Männer, die Gründe dafür liegen in ökonomischen und sozialen Unterschieden zwischen den beiden

Geschlechtern (Jindal et al., 2005). Zudem spenden Frauen häufiger eine Niere an Männer als umgekehrt (Jindal et al., 2005, Bal and Saikia, 2007). Des weiteren stehen Frauen mit einer terminalen Niereninsuffizienz einer Transplantation nicht so positiv gegenüberstehen wie Männer, da sie Bedenken haben was die Immunsuppression und ihre Nebenwirkungen angeht (Sabatini, 1997). Im Falle der Inanspruchnahme von Angeboten des Gesundheitssystems zeigen Frauen jedoch ein größeres Interesse und eine bessere Compliance gegenüber Therapieregimen als Männer (Baines et al., 2005).

Dass das Geschlecht möglicherweise ein entscheidender Faktor bei der Ausprägung von akuten Abstoßungsreaktionen sein könnte, wird durch diverse Arbeiten nahegelegt. Einer der wichtigsten Punkte in diesem Zusammenhang ist, dass das Geschlecht die Aktivität des Immunsystems beeinflusst (Bhatia et al., 2014, Bouman et al., 2005, Bouman et al., 2004, Marriott and Huet-Hudson, 2006). Auf einigen Immunzellen befinden sich Hormonrezeptoren, welche teilweise die geschlechterspezifischen Unterschiede erklären (Wira and Sandoe, 1980). Dabei spielen Östrogen und Testosteron eine wichtige Rolle (Bhatia et al., 2014). Frauen zeigen eine höhere Rate an zellvermittelter und humoraler Immunantwort als Männer, wobei letztere eine aggressivere und schädlichere Abwehr aufweisen (Marriott and Huet-Hudson, 2006, Bouman et al., 2005, Ansar Ahmed et al., 1985). Frauen haben ein erhöhtes Risiko an Autoimmunerkrankungen zu leiden (Marriott and Huet-Hudson, 2006, Bouman et al., 2005, Ansar Ahmed et al., 1985), andererseits leiden sie seltener an viralen, bakteriellen oder parasitären Infektionen (Bhatia et al., 2014).

Inwieweit diese komplexen Zusammenhänge zwischen der Rolle des Geschlechts und der möglichen Ausbildung von (akuten) Abstoßungsreaktionen von Bedeutung sind, werden zukünftige Arbeiten zeigen müssen.

4.5.4. Immunsuppression

Die immunsuppressive Therapie ist der entscheidende Faktor für ein langes Transplantatüberleben und eine Reduzierung der immunologischen Komplikationen (Hall et al., 2015, Yabu and Vincenti, 2009, Bakr et al., 2014).

Dazu gehören auch (akute) Abstoßungsreaktionen (Hall et al., 2015, Yabu and Vincenti, 2009, Bakr et al., 2014).

Alle in dieser Arbeit untersuchten Patienten wurden in zwei Gruppen mit immunsuppressiver Medikation eingeteilt. Dabei bildete das immunologische Risiko die Grundlage.

Beide Gruppen erhielten standardmäßig Steroide. Patienten, die keine Vorerkrankungen aufwiesen, keine anderen Medikamente einnahmen und die sich erstmalig in ihrem Leben einer Transplantation unterzogen, wiesen ein geringes immunologisches Risiko auf. Sie wurden deshalb in die Gruppe 1 eingeteilt und erhielten zusätzlich Calcineurininhibitoren, Mycophenolatmofetil und/oder mTOR-Inhibitoren und Basiliximab. Patienten mit einem hohem immunologischen Risiko aufgrund von bereits durchgemachten Transplantationen und Komorbiditäten hatten ein größeres Risiko das Transplantat abzustößen und erhielten deshalb eine stärkere Medikation (Humar et al., 2000). Sie wurden durch die Gruppe 2 charakterisiert und erhielten außerdem Calcineurininhibitoren, Mycophenolatmofetil und/oder mTOR-Inhibitoren, Antithymozytenglobulin und/oder Rituximab mit oder ohne Basiliximab.

Beim klinischen Vergleich der Kollektive „keine Abstoßung“ gegen „akute Abstoßung“ zeigte sich bezüglich der Immunsuppression kein signifikanter Unterschied ($p=0,127$).

Bei den Kollektiven „keine Abstoßung“ und „multiple akute Abstoßung“ führte der Vergleich der beiden Gruppen der Immunsuppression zu einem signifikanten Wert ($p=6,487 \cdot 10^{-6}$). Patienten, die mit der Immunsuppression aus der Gruppe 1 behandelt wurden, zeigten mit einer Häufigkeit von 66% keine Abstoßungsreaktion. Diejenigen, die eine immunsuppressive Therapie der Gruppe 2 erhielten und damit von vornherein ein größeres immunologisches Risiko hatten, wiesen mit einer Häufigkeit von 67,9% eine multiple akute Abstoßungsreaktion auf. Diese Beobachtung führt zu der Annahme, dass die Chance, eine (multiple) akute Abstoßungsreaktion zu erleiden bei Patienten, die aufgrund ihres sowieso schon vorhandenen hohen immunologischen

Grundrisikos eine stärkere Immunsuppression bekommen, so hoch ist, dass die immunsuppressive Therapie dieses Risiko nicht ausreichend minimieren kann. Dies lässt vermuten, dass multiple akute Abstoßungsreaktionen eine große Herausforderung für eine adäquate immunsuppressive Therapie darstellen. Nachgewiesenermaßen haben Organempfänger mit multiplen akuten (>1) Rejektionen tatsächlich signifikant niedrigere Überlebensraten des Transplantats als Patienten mit nur einer oder gar keiner Abstoßungsreaktion (Humar et al., 2000, Tejani et al., 1996, Flechner et al., 1996).

Für den Kollektivvergleich „einmalig Transplantierte“ gegen „mehrmalig Transplantierte“ ergab sich bei den beiden Gruppen der Immunsuppression ebenfalls ein signifikanter Wert ($p=2,993 \cdot 10^{-9}$). Patienten, die mit der Immunsuppression aus der Gruppe 1 behandelt wurden, zeigten mit einer Häufigkeit von 74,2% ein einmaliges Transplantationsereignis, während 20,5% aus dieser Gruppe mehrmals transplantiert wurden. Die Annahme, dass Patienten mit einem niedrigeren immunologischen Risiko (Gruppe 1) häufiger nur einmalig transplantiert werden, ist damit bestätigt. Von den Patienten, die mit den Medikamenten aus der Gruppe 2 behandelt wurden, mussten 79,5% mehrfach transplantiert werden, wohingegen 25,8% mit ihrem ersten Transplantat auskamen. Ein hohes immunologisches Risiko geht mit einer höheren Komplikationsrate einher, die mehrfache Transplantationen erfordert (Tejani et al., 1996, Humar et al., 2000, Matas et al., 1994, Flechner et al., 1996). Das immunologische Risiko ist somit ein Kriterium für die Transplantationshäufigkeit.

4.5.5. Grunderkrankung

Die verschiedenen Grunderkrankungen, die bei den untersuchten Patienten zur Ausbildung einer terminalen Niereninsuffizienz geführt und sie damit dialysebeziehungsweise transplantationspflichtig gemacht haben, wurden nach der Häufigkeit eingeteilt und anschließend verglichen. Hier zeigte sich bei dem Vergleich der Kollektive „einmalig Transplantierte“ gegen „mehrmalig Transplantierte“ ein signifikanter Wert bei der Gruppe „Sonstige“ ($p=1,506 \cdot 10^{-5}$). Diese Gruppe enthält Patienten, deren Erkrankungen als „unklar“ definiert wurden und die insgesamt seltener als vier mal pro Kollektiv vorkamen. Diese

Konstellation der Gruppe hat damit keine ausreichende Aussagekraft im Bezug auf die Unterschiede der Grunderkrankungen der Patienten.

Alternativ wäre eine Einteilung der Erkrankungen nach der Genese erwägenswert. Der pathophysiologische Aspekt ließe eine Klassifikation in Erkrankungen mit immunologischer Genese (z.B. Glomerulonephritiden, IgA-Nephritis, SLE) und in Erkrankungen ohne immunologisches Geschehen (z.B. HUS, ADPKD, Alport-Syndrom) zu. Bei Patienten, die aufgrund von immunologisch bedingten Glomerulonephritiden transplantiert werden, besteht ein Zusammenhang zwischen dem erneuten Auftreten der Grunderkrankung und einem Transplantatverlust nach der Operation (Sprangers and Kuypers, 2013, Lorenz et al., 2010, Angelo et al., 2011, Jeon et al., 2012). Auch das wiederholte Erkranken an einer IgA-Nephritis und die Ausbildung einer (chronischen) Abstoßungsreaktion nach erfolgreicher Nierentransplantation scheinen in einem Zusammenhang zu stehen (Yaginuma et al., 2011, Sumethkul et al., 2001). Prinzipiell ist die Rekurrenz der Grunderkrankung, die ursprünglich zu einer Nierentransplantation geführt hat, ein häufiges Phänomen und Problem (Ponticelli et al., 2014, Hariharan et al., 1999). Somit müsste eine Signifikanz bei einer derartigen Einteilung wiederum kritisch beurteilt und mit geeigneten statistischen Methoden überprüft werden, um letztendlich den tatsächlichen Einfluss der SNPs zu detektieren.

4.6. Ausblick

In der vorliegenden Dissertation wurde die Bedeutung von der Suche nach Biomarkern für die Entwicklung einer spezifischen Transplantationsmedizin im Sinne einer individuellen Immuntherapie herausgearbeitet und die Rolle von sieben Genpolymorphismen aus zwei Genen in diesem Zusammenhang untersucht.

Die Arbeit ist ein erster Schritt zur Identifizierung von solchen Biomarkern. Es müssen aber zukünftig weitere Studien zu diesem Thema durchgeführt werden, um den Einfluss der CD40 und NFKBIA SNPs noch detaillierter zu verstehen. Dabei sollte die Bedeutung der SNPs für die Entwicklung von chronischen Abstoßungsreaktionen geprüft werden, wozu sich der Beobachtungszeitraum der

Patienten jedoch deutlich verlängern würde. Interessant wäre es außerdem, Vergleichsstudien mit einem größeren Probenumfang durchzuführen, andere ethnische Gruppen hinzuzuziehen, die Organspender für diese SNPs zu typisieren und eine Auswahl an weiteren SNPs aus dem CD40 und NFKBIA Gen zu untersuchen, um die hier erhobenen Ergebnisse zu reproduzieren (siehe hierzu auch Punkt 4.1.). Weiterhin könnte der Fokus der Analysen auf Nierenfunktionsparameter im Blut und Urin (Kreatinin, Cystatin C, Harnstoff, Albumin, Transferrin, IgG, α -1-Mikroglobulin, Retinolbindendes Protein, γ -Glutamyl-transferase, α -2-Makroglobulin, Lipocalin-2, Tamm-Horsfall-Protein, Thrombozyten) gelegt werden, um zu kontrollieren, ob die ausgewählten SNPs mit der Funktion der transplantierten Niere assoziiert sind (Fu et al., 2014, Shlipak et al., 2013, Dharnidharka et al., 2002, Xia et al., 2012, Wu et al., 2012, Bang et al., 1996, Stubendorff et al., 2014, Cain et al., 2012, Viau et al., 2010, Chakraborty et al., 2004). Die Glomeruläre Filtrationsrate ist ein weiterer wichtiger Aspekt für die Beurteilung der Transplantatfunktion und sollte in weiteren Arbeiten zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Nierentransplantation dokumentiert werden (Andersen et al., 2013, Soares et al., 2009).

5. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob die SNPs **rs1883832** und **rs4810485** im CD40 Gen sowie die SNPs **rs2233409**, **rs696**, **rs2233408**, **rs2233406** und **rs3138053** im NFKBIA Gen mit akuten Nierenabstoßungsreaktionen oder Retransplantationen assoziiert sind. Diese SNPs wurden ausgewählt, weil sie die Expression von CD40 und NFKBIA modifizieren, welche eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie von akuten Abstoßungsreaktionen einnehmen. Bei einer Assoziation könnten die SNPs als Biomarker dienen und zur Etablierung einer individualisierten Immuntherapie für Patienten nach einer Nierentransplantation beitragen.

Es wurden retrospektiv DNA-Proben von 163 nierentransplantierten Patienten untersucht. Dazu erfolgte die Einteilung der Patienten in insgesamt fünf Kollektive: Keine Abstoßung (n=106), akute Abstoßung (n=57), multiple akute Abstoßung (n=78), einmalige Nierentransplantation (n=124) und mehrmalige Nierentransplantation (n=39).

Die SNPs wurden mit dem PCR-ASRA Verfahren nachgewiesen. Für die Auswertung und Interpretation der Genotypisierungen wurden die statistischen Verfahren T-Test und exakter Fisher Test durchgeführt. Beim Vergleich der Genotyp- und Allelfrequenzen in den einzelnen Patientenkollektiven ergaben sich für die SNPs im CD40- und NFKBIA Gen keine Signifikanzen.

Diese Resultate lassen die Interpretation zu, dass die untersuchten SNPs des CD40- und NFKBIA Gens von geringer Bedeutung für die Ausprägung von akuten Abstoßungsreaktionen und Retransplantationen auf Seiten der Organempfänger sind. Daher sind diese SNPs als Biomarker für eine individualisierte immunsuppressive Therapie ungeeignet.

Um den Einfluss der untersuchten SNPs weiter zu charakterisieren sollten in Zukunft auch Organspender typisiert, andere ethnische Gruppen miteinbezogen und weitere SNPs aus dem CD40- und NFKBIA Gen auf den Zusammenhang zu akuten Abstoßungen und Retransplantationen geprüft werden. Ergänzend müsste auch die Bedeutung der SNPs für die Entwicklung von chronischen Abstoßungsreaktionen untersucht werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- ABDALLAH, A., SATO, H., GRUTTERS, J. C., VEERARAGHAVAN, S., LYMPANY, P. A., RUVEN, H. J., VAN DEN BOSCH, J. M., WELLS, A. U., DU BOIS, R. M. & WELSH, K. I. (2003) Inhibitor kappa B-alpha (IkappaB-alpha) promoter polymorphisms in UK and Dutch sarcoidosis. *Genes Immun*, 4, 450-4.
- AGARWAL, D. K., HOTA, J. K. & MALHOTRA, V. (2011) Acute mixed cellular and humoral rejection of renal allograft with leucopenia. *J Assoc Physicians India*, 59, 524-6.
- AHMAD, N., AHMED, K. & MAMODE, N. (2009) Does nephrectomy of failed allograft influence graft survival after re-transplantation? *Nephrol Dial Transplant*, 24, 639-42.
- AKALIN, E. & PASCUAL, M. (2006) Sensitization after kidney transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol*, 1, 433-40.
- ALI, S., HIRSCHFELD, A. F., MAYER, M. L., FORTUNO, E. S., 3RD, CORBETT, N., KAPLAN, M., WANG, S., SCHNEIDERMAN, J., FJELL, C. D., YAN, J., AKHABIR, L., AMINUDDIN, F., MARR, N., LACAZE-MASMONTEIL, T., HEGELE, R. G., BECKER, A., CHAN-YEUNG, M., HANCOCK, R. E., KOLLMANN, T. R., DALEY, D., SANDFORD, A. J., LAVOIE, P. M. & TURVEY, S. E. (2013) Functional genetic variation in NFKBIA and susceptibility to childhood asthma, bronchiolitis, and bronchopulmonary dysplasia. *J Immunol*, 190, 3949-58.
- ALMOND, P. S., MATAS, A., GILLINGHAM, K., DUNN, D. L., PAYNE, W. D., GORES, P., GRUESSNER, R. & NAJARIAN, J. S. (1993) Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients. *Transplantation*, 55, 752-6; discussion 756-7.
- ANDERSEN, T. B., JODAL, L., ERLANDSEN, E. J., MORSING, A., FROKIAER, J. & BROCHNER-MORTENSEN, J. (2013) Detecting reduced renal function in children: comparison of GFR-models and serum markers. *Pediatr Nephrol*, 28, 83-92.
- ANGELO, J. R., BELL, C. S. & BRAUN, M. C. (2011) Allograft failure in kidney transplant recipients with membranoproliferative glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis*, 57, 291-9.

- ANSAR AHMED, S., PENHALE, W. J. & TALAL, N. (1985) Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *Am J Pathol*, 121, 531-51.
- BAINES, L. S., ZAWADA, E. T., JR. & JINDAL, R. M. (2005) Psychosocial profiling: a holistic management tool for non-compliance. *Clin Transplant*, 19, 38-44.
- BAKR, M. A., NAGIB, A. M. & DONIA, A. F. (2014) Induction immunosuppressive therapy in kidney transplantation. *Exp Clin Transplant*, 12 Suppl 1, 60-9.
- BAL, M. M. & SAIKIA, B. (2007) Gender bias in renal transplantation: are women alone donating kidneys in India? *Transplant Proc*, 39, 2961-3.
- BANG, L. E., HOLM, J. & SVENDSEN, T. L. (1996) Retinol-binding protein and transferrin in urine. New markers of renal function in essential hypertension and white coat hypertension? *Am J Hypertens*, 9, 1024-8.
- BARREIRO, L. B., LAVAL, G., QUACH, H., PATIN, E. & QUINTANA-MURCI, L. (2008) Natural selection has driven population differentiation in modern humans. *Nat Genet*, 40, 340-5.
- BAYER (29.07.2013, 13:49) <http://www.bayerpharma.com/de/forschung-und-entwicklung/technologien-trends/biomarker/index.php>. Hamburg, Bayer Health Care.
- BHATIA, A., SEKHON, H. K. & KAUR, G. (2014) Sex Hormones and Immune Dimorphism. *ScientificWorldJournal*, 2014, 159150.
- BOUMAN, A., HEINEMAN, M. J. & FAAS, M. M. (2005) Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update*, 11, 411-23.
- BOUMAN, A., SCHIPPER, M., HEINEMAN, M. J. & FAAS, M. M. (2004) Gender difference in the non-specific and specific immune response in humans. *Am J Reprod Immunol*, 52, 19-26.
- BOURGEOIS, C., ROCHA, B. & TANCHOT, C. (2002) A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science*, 297, 2060-3.
- BRIGANTI, E. M., RUSS, G. R., MCNEIL, J. J., ATKINS, R. C. & CHADBAN, S. J. (2002) Risk of renal allograft loss from recurrent glomerulonephritis. *N Engl J Med*, 347, 103-9.
- BSIBSI, M., PEFEROEN, L. A., HOLTMAN, I. R., NACKEN, P. J., GERRITSEN, W. H., WITTE, M. E., VAN HORSSSEN, J., EGGEN, B. J., VAN DER

- VALK, P., AMOR, S. & VAN NOORT, J. M. (2014) Demyelination during multiple sclerosis is associated with combined activation of microglia/macrophages by IFN-gamma and alpha B-crystallin. *Acta Neuropathol.*
- BUCK, D., KRONER, A., RIECKMANN, P., MAURER, M. & WIENDL, H. (2006) Analysis of the C/T(-1) single nucleotide polymorphism in the CD40 gene in multiple sclerosis. *Tissue Antigens*, 68, 335-8.
- BURDON, K. P., LANGEFELD, C. D., BECK, S. R., WAGENKNECHT, L. E., CARR, J. J., RICH, S. S., FREEDMAN, B. I., HERRINGTON, D. & BOWDEN, D. W. (2006) Variants of the CD40 gene but not of the CD40L gene are associated with coronary artery calcification in the Diabetes Heart Study (DHS). *Am Heart J*, 151, 706-11.
- BURNS, J. M., CORNELL, L. D., PERRY, D. K., POLLINGER, H. S., GLOOR, J. M., KREMERS, W. K., GANDHI, M. J., DEAN, P. G. & STEGALL, M. D. (2008) Alloantibody levels and acute humoral rejection early after positive crossmatch kidney transplantation. *Am J Transplant*, 8, 2684-94.
- CAIN, L. R., DUCATMAN, A. M. & SHANKAR, A. (2012) The relationship between gamma-glutamyl transferase levels and chronic kidney disease among Appalachian adults. *W V Med J*, 108, 8-13.
- CHAKRABORTY, J., BELOW, A. A. & SOLAIMAN, D. (2004) Tamm-Horsfall protein in patients with kidney damage and diabetes. *Urol Res*, 32, 79-83.
- CHATZIGEORGIOU, A., LYBERI, M., CHATZILYMPERIS, G., NEZOS, A. & KAMPER, E. (2009) CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease. *Biofactors*, 35, 474-83.
- CHIA-HUI LIN, S.-C. W., TSAN-TENG OU, RUEI-NIAN LI, WEN-CHAN TSAI, HONG-WEN LIU, JENG-HSIEN YEN (2008) I κ B- α Promotor Polymorphisms in Patients with systemic Lupus Erythematosus. *J Clin Immunol*, 207-213.
- CLARK, L. B., FOY, T. M. & NOELLE, R. J. (1996) CD40 and its ligand. *Adv Immunol*, 63, 43-78.
- COLLINS, F. S., GUYER, M. S. & CHAKRAVARTI, A. (1997) Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science*, 278, 1580-1.
- CONNE, B., STUTZ, A. & VASSALLI, J. D. (2000) The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular 'hotspot' for pathology? *Nat Med*, 6, 637-41.

- COOPER, D. N., SMITH, B. A., COOKE, H. J., NIEMANN, S. & SCHMIDTKE, J. (1985) An estimate of unique DNA sequence heterozygosity in the human genome. *Hum Genet*, 69, 201-5.
- COTTS, W. G. & JOHNSON, M. R. (2001) The challenge of rejection and cardiac allograft vasculopathy. *Heart Fail Rev*, 6, 227-40.
- D'ELIOS, M. M., JOSIEN, R., MANGHETTI, M., AMEDEI, A., DE CARLI, M., CUTURI, M. C., BLANCHO, G., BUZELIN, F., DEL PRETE, G. & SOULILLOU, J. P. (1997) Predominant Th1 cell infiltration in acute rejection episodes of human kidney grafts. *Kidney Int*, 51, 1876-84.
- DANG, C. & JAYASENA, S. D. (1996) Oligonucleotide inhibitors of Taq DNA polymerase facilitate detection of low copy number targets by PCR. *J Mol Biol*, 264, 268-78.
- DANKERS, M. K., WITVLIET, M. D., ROELEN, D. L., DE LANGE, P., KORFAGE, N., PERSIJN, G. G., DUQUESNOY, R., DOXIADIS, II & CLAAS, F. H. (2004) The number of amino acid triplet differences between patient and donor is predictive for the antibody reactivity against mismatched human leukocyte antigens. *Transplantation*, 77, 1236-9.
- DE FIJTER, J. W. (2005) The impact of age on rejection in kidney transplantation. *Drugs Aging*, 22, 433-49.
- DEMCHENKO, Y. N. & KUEHL, W. M. (2010) A critical role for the NFkB pathway in multiple myeloma. *Oncotarget*, 1, 59-68.
- DENTON, M. D., GEEHAN, C. S., ALEXANDER, S. I., SAYEGH, M. H. & BRISCOE, D. M. (1999) Endothelial cells modify the costimulatory capacity of transmigrating leukocytes and promote CD28-mediated CD4(+) T cell alloactivation. *J Exp Med*, 190, 555-66.
- DHARNIDHARKA, V. R., KWON, C. & STEVENS, G. (2002) Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta-analysis. *Am J Kidney Dis*, 40, 221-6.
- DINIS, P., NUNES, P., MARCONI, L., FURRIEL, F., PARADA, B., MOREIRA, P., FIGUEIREDO, A., BASTOS, C., ROSEIRO, A., DIAS, V., ROLO, F., MACARIO, F. & MOTA, A. (2014) Kidney retransplantation: removal or persistence of the previous failed allograft? *Transplant Proc*, 46, 1730-4.
- DJAMALI, A., SAMANIEGO, M., MUTH, B., MUEHRER, R., HOFMANN, R. M., PIRSCH, J., HOWARD, A., MOURAD, G. & BECKER, B. N. (2006)

- Medical care of kidney transplant recipients after the first posttransplant year. *Clin J Am Soc Nephrol*, 1, 623-40.
- DORHOI, A., NOUAILLES, G., JORG, S., HAGENS, K., HEINEMANN, E., PRADL, L., OBERBECK-MULLER, D., DUQUE-CORREA, M. A., REECE, S. T., RULAND, J., BROSCHE, R., TSCHOPP, J., GROSS, O. & KAUFMANN, S. H. (2012) Activation of the NLRP3 inflammasome by *Mycobacterium tuberculosis* is uncoupled from susceptibility to active tuberculosis. *Eur J Immunol*, 42, 374-84.
- DSO (03.06.2015, 14:36) <http://www.dso.de/organspende-und-transplantation/transplantation/nierentransplantation.html>.
- EKBERG, H., TEDESCO-SILVA, H., DEMIRBAS, A., VITKO, S., NASHAN, B., GURKAN, A., MARGREITER, R., HUGO, C., GRINYO, J. M., FREI, U., VANRENTERGHEM, Y., DALOZE, P. & HALLORAN, P. F. (2007) Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med*, 357, 2562-75.
- ENSEMBL (20.08.2013; 15:40) http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=14:35870593-35871593;v=rs696;vdb=variation;vf=6794. Hamburg.
- EVERITT (1994) Statistical inference. *Statistical methods for medical investigators* 2nd ed.
- FARID, E., AL-WEDAIE, F., TABBARA, K., EL-AGROUDY, A. E. & AL-GHAREEB, S. M. (2015) Human leukocyte antigen g and renal allograft transplant. *Exp Clin Transplant*, 13 Suppl 1, 371-6.
- FERRARI-LACRAZ, S., TIERCY, J. M. & VILLARD, J. (2012) Detection of anti-HLA antibodies by solid-phase assay in kidney transplantation: friend or foe? *Tissue Antigens*, 79, 315-25.
- FERREIRA, J. P., OVERTON, K. W. & WANG, C. L. (2013) Tuning gene expression with synthetic upstream open reading frames. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 11284-9.
- FILIPPONE, E. J. & FARBER, J. L. (2015) Humoral Immune Response and Allograft Function in Kidney Transplantation. *Am J Kidney Dis*.
- FLECHNER, S. M., MODLIN, C. S., SERRANO, D. P., GOLDFARB, D. A., PAPAJCIK, D., MASTROIANNI, B., GOORMASTIC, M. & NOVICK, A. C.

- (1996) Determinants of chronic renal allograft rejection in cyclosporine-treated recipients. *Transplantation*, 62, 1235-41.
- FRIEDMAN, A. L., GOKER, O., KALISH, M. A., BASADONNA, G. P., KLIGER, A. S., BIA, M. J. & LORBER, M. I. (2004) Renal transplant recipients over aged 60 have diminished immune activity and a low risk of rejection. *Int Urol Nephrol*, 36, 451-6.
- FU, S., GUO, B., YU, L., WANG, Y., DU, C., XIAO, L., ZHOU, M. & LUO, M. (2014) [Correlation of platelet parameters with delayed graft function after kidney transplantation]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 34, 994-9.
- FUENTES-ARDERIU, X. (2013) What is a biomarker? It's time for a renewed definition. *Clin Chem Lab Med*, 51, 1689-90.
- GANJI, M. R. & BROUMAND, B. (2007) Acute cellular rejection. *Iran J Kidney Dis*, 1, 54-6.
- GAO, J., PFEIFER, D., HE, L. J., QIAO, F., ZHANG, Z., ARBMAN, G., WANG, Z. L., JIA, C. R., CARSTENSEN, J. & SUN, X. F. (2007) Association of NFKBIA polymorphism with colorectal cancer risk and prognosis in Swedish and Chinese populations. *Scand J Gastroenterol*, 42, 345-50.
- EGINAT, J., PARONI, M., MAGLIE, S., ALFEN, J. S., KASTIRR, I., GRUARIN, P., DE SIMONE, M., PAGANI, M. & ABRIGNANI, S. (2014) Plasticity of human CD4 T cell subsets. *Front Immunol*, 5, 630.
- EGINAT, J., SALLUSTO, F. & LANZAVECCHIA, A. (2003) Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory and effector memory CD4+ T cells. *Pathol Biol (Paris)*, 51, 64-6.
- GHOSH, S. & KARIN, M. (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*, 109 Suppl, S81-96.
- GONZALEZ-MOLINA, M., BURGOS, D., CABELLO, M., RUIZ-ESTEBAN, P., RODRIGUEZ, M. A., GUTIERREZ, C., LOPEZ, V., BAENA, V. & HERNANDEZ, D. (2014) Impact of immunosuppression treatment on the improvement in graft survival after deceased donor renal transplantation: a long-term cohort study. *Nefrologia*, 34, 570-8.
- GRALLA, J., TONG, S. & WISEMAN, A. C. (2013) The impact of human leukocyte antigen mismatching on sensitization rates and subsequent retransplantation after first graft failure in pediatric renal transplant recipients. *Transplantation*, 95, 1218-24.

- GREWAL, I. S. & FLAVELL, R. A. (1998) CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol*, 16, 111-35.
- GRINYO, J., VANRENTERGHEM, Y., NASHAN, B., VINCENTI, F., EKBERG, H., LINDPAINTNER, K., RASHFORD, M., NASMYTH-MILLER, C., VOULGARI, A., SPLEISS, O., TRUMAN, M. & ESSIUX, L. (2008) Association of four DNA polymorphisms with acute rejection after kidney transplantation. *Transpl Int*, 21, 879-91.
- GRUNAU, R. E., CEPEDA, I. L., CHAU, C. M., BRUMMELTE, S., WEINBERG, J., LAVOIE, P. M., LADD, M., HIRSCHFELD, A. F., RUSSELL, E., KOREN, G., VAN UUM, S., BRANT, R. & TURVEY, S. E. (2013) Neonatal pain-related stress and NFKBIA genotype are associated with altered cortisol levels in preterm boys at school age. *PLoS One*, 8, e73926.
- GUDENUS R, G. U. (2010) *Biomarker und Surrogatendpunkte.*, Transkript 7:31-32.
- GUMMERT, J. F., IKONEN, T. & MORRIS, R. E. (1999) Newer immunosuppressive drugs: a review. *J Am Soc Nephrol*, 10, 1366-80.
- GUO, W. H., TIAN, L., CHAN, K. L., DALLMAN, M. & TAM, P. K. (2001) Role of CD4+ and CD8+ T cells in early and late acute rejection of small bowel allograft. *J Pediatr Surg*, 36, 352-6.
- HAAS, M. (2014) An updated Banff schema for diagnosis of antibody-mediated rejection in renal allografts. *Curr Opin Organ Transplant*, 19, 315-22.
- HALL, E. C., ENGELS, E. A., PFEIFFER, R. M. & SEGEV, D. L. (2015) Association of antibody induction immunosuppression with cancer after kidney transplantation. *Transplantation*, 99, 1051-7.
- HALLORAN, P. F. (2003) The clinical importance of alloantibody-mediated rejection. *Am J Transplant*, 3, 639-40.
- HALLORAN, P. F. (2004) Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med*, 351, 2715-29.
- HALLORAN, P. F., MELK, A. & BARTH, C. (1999) Rethinking chronic allograft nephropathy: the concept of accelerated senescence. *J Am Soc Nephrol*, 10, 167-81.
- HANAJIRI, R., MURATA, M., SUGIMOTO, K., MURASE, M., SAKEMURA, R., GOTO, T., WATANABE, K., IMAHASHI, N., TERAURA, S., OHASHI, H., AKATSUKA, Y., KURAHASHI, S., MIYAMURA, K., KIIYOI, H., NISHIDA, T.

- & NAOE, T. (2015) Integration of humoral and cellular HLA-specific immune responses in cord blood allograft rejection. *Bone Marrow Transplant*.
- HARIHARAN, S., ADAMS, M. B., BRENNAN, D. C., DAVIS, C. L., FIRST, M. R., JOHNSON, C. P., OUSEPH, R., PEDDI, V. R., PELZ, C. J., ROZA, A. M., VINCENTI, F. & GEORGE, V. (1999) Recurrent and de novo glomerular disease after renal transplantation: a report from Renal Allograft Disease Registry (RADR). *Transplantation*, 68, 635-41.
- HARIHARAN, S., JOHNSON, C. P., BRESNAHAN, B. A., TARANTO, S. E., MCINTOSH, M. J. & STABLEIN, D. (2000) Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med*, 342, 605-12.
- HAYDEN, M. S. & GHOSH, S. (2008) Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*, 132, 344-62.
- HERNANDEZ, D., RUFINO, M., ARMAS, S., GONZALEZ, A., GUTIERREZ, P., BARBERO, P., VIVANCOS, S., RODRIGUEZ, C., DE VERA, J. R. & TORRES, A. (2006) Retrospective analysis of surgical complications following cadaveric kidney transplantation in the modern transplant era. *Nephrol Dial Transplant*, 21, 2908-15.
- HEROLD, G. (2012) *Innere Medizin*.
- HERTIG, A., ANGLICHEAU, D., VERINE, J., PALLET, N., TOUZOT, M., ANCEL, P. Y., MESNARD, L., BROUSSE, N., BAUGEY, E., GLOTZ, D., LEGENDRE, C., RONDEAU, E. & XU-DUBOIS, Y. C. (2008) Early epithelial phenotypic changes predict graft fibrosis. *J Am Soc Nephrol*, 19, 1584-91.
- HIRSCH, H. H., KNOWLES, W., DICKENMANN, M., PASSWEG, J., KLIMKAIT, T., MIHATSCH, M. J. & STEIGER, J. (2002) Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med*, 347, 488-96.
- HOLLENBAUGH, D., MISCHÉL-PETTY, N., EDWARDS, C. P., SIMON, J. C., DENFELD, R. W., KIENER, P. A. & ARUFFO, A. (1995) Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells. *J Exp Med*, 182, 33-40.
- HOURLMANT, M., CESBRON-GAUTIER, A., TERASAKI, P. I., MIZUTANI, K., MOREAU, A., MEURETTE, A., DANTAL, J., GIRAL, M., BLANCHO, G.,

- CANTAROVICH, D., KARAM, G., FOLLEA, G., SOULILLOU, J. P. & BIGNON, J. D. (2005) Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*, 16, 2804-12.
- HRICIK, D. E., POGGIO, E. D., WOODSIDE, K. J., SARABU, N., SANCHEZ, E. Q., SCHULAK, J. A., PADIYAR, A., HEEGER, P. S. & AUGUSTINE, J. J. (2013) Effects of cellular sensitization and donor age on acute rejection and graft function after deceased-donor kidney transplantation. *Transplantation*, 95, 1254-8.
- HTTP://WWW.SCHEFFEL.OG.BW.SCHULE.DE (29.06.2014, 14:26)
<http://www.scheffel.og.bw.schule.de/faecher/science/biologie/immunologie/6transplant/ma3.gif>.
- HUMAR, A., KERR, S., GILLINGHAM, K. J. & MATAS, A. J. (1999) Features of acute rejection that increase risk for chronic rejection. *Transplantation*, 68, 1200-3.
- HUMAR, A., PAYNE, W. D., SUTHERLAND, D. E. & MATAS, A. J. (2000) Clinical determinants of multiple acute rejection episodes in kidney transplant recipients. *Transplantation*, 69, 2357-60.
- ISSA, N., KUKLA, A. & IBRAHIM, H. N. (2013) Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: a review and perspective of the evidence. *Am J Nephrol*, 37, 602-12.
- IYER, H. S., JACKSON, A. M., ZACHARY, A. A. & MONTGOMERY, R. A. (2013) Transplanting the highly sensitized patient: trials and tribulations. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 22, 681-8.
- JEON, H. J., KIM, Y. S., LEE, S. M., AHN, C., HA, J., KIM, S. J. & KIM, D. K. (2012) The effect of recurrent glomerulonephritis and acute rejection episodes in zero human leukocyte antigen-mismatched kidney transplantation. *Transplant Proc*, 44, 600-6.
- JINDAL, R. M., RYAN, J. J., SAJJAD, I., MURTHY, M. H. & BAINES, L. S. (2005) Kidney transplantation and gender disparity. *Am J Nephrol*, 25, 474-83.
- JOHNSON, G. C. & TODD, J. A. (2000) Strategies in complex disease mapping. *Curr Opin Genet Dev*, 10, 330-4.
- KAYLER, L. K., MEIER-KRIESCHE, H. U., PUNCH, J. D., CAMPBELL, D. A., JR., LEICHTMAN, A. B., MAGEE, J. C., RUDICH, S. M., ARENAS, J. D. &

- MERION, R. M. (2002) Gender imbalance in living donor renal transplantation. *Transplantation*, 73, 248-52.
- KAYLER, L. K., RASMUSSEN, C. S., DYKSTRA, D. M., OJO, A. O., PORT, F. K., WOLFE, R. A. & MERION, R. M. (2003) Gender imbalance and outcomes in living donor renal transplantation in the United States. *Am J Transplant*, 3, 452-8.
- KIM, T. H., JEONG, K. H., KIM, S. K., LEE, S. H., IHM, C. G., LEE, T. W., MOON, J. Y., YOON, Y. C., CHUNG, J. H., PARK, S. J., KANG, S. W. & KIM, Y. H. (2013a) TLR9 gene polymorphism (rs187084, rs352140): association with acute rejection and estimated glomerular filtration rate in renal transplant recipients. *Int J Immunogenet*.
- KIM, Y. H., KIM, T. H., KANG, S. W., KIM, H. J., PARK, S. J., JEONG, K. H., KIM, S. K., LEE, S. H., IHM, C. G., LEE, T. W., MOON, J. Y., YOON, Y. C. & CHUNG, J. H. (2013b) Association between a TGFB2 Gene Polymorphism (rs2228048, Asn389Asn) and Acute Rejection in Korean Kidney Transplantation Recipients. *Immunol Invest*, 42, 285-95.
- KIMBALL, P. M., BAKER, M. A., WAGNER, M. B. & KING, A. (2011) Surveillance of alloantibodies after transplantation identifies the risk of chronic rejection. *Kidney Int*, 79, 1131-7.
- KLODA, K., DOMANSKI, L., PAWLIK, A., WISNIEWSKA, M., SAFRANOW, K. & CIECHANOWSKI, K. (2013) The Impact of ICAM1 and VCAM1 Gene Polymorphisms on Chronic Allograft Nephropathy and Transplanted Kidney Function. *Transplant Proc*, 45, 2244-7.
- KOSMOLIAPTIS, V., GJORGJIMAJKOSKA, O., SHARPLES, L. D., CHAUDHRY, A. N., CHATZIZACHARIAS, N., PEACOCK, S., TORPEY, N., BOLTON, E. M., TAYLOR, C. J. & BRADLEY, J. A. (2014) Impact of donor mismatches at individual HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ loci on the development of HLA-specific antibodies in patients listed for repeat renal transplantation. *Kidney Int*, 86, 1039-48.
- KURYLOWICZ, A., MISKIEWICZ, P., BAR-ANDZIAK, E., NAUMAN, J. & BEDNARCZUK, T. (2009) Association of polymorphism in genes encoding kappaB inhibitors (IkappaB) with susceptibility to and phenotype of Graves' disease: a case-control study. *Thyroid Res*, 2, 10.

- KWOK, P. Y. & CHEN, X. (2003) Detection of single nucleotide polymorphisms. *Curr Issues Mol Biol*, 5, 43-60.
- LE MOINE, A., GOLDMAN, M. & ABRAMOWICZ, D. (2002) Multiple pathways to allograft rejection. *Transplantation*, 73, 1373-81.
- LEBRANCHU, Y., BAAN, C., BIANCONE, L., LEGENDRE, C., MORALES, J. M., NAESENS, M., THOMUSCH, O. & FRIEND, P. (2013) Pretransplant identification of acute rejection risk following kidney transplantation. *Transpl Int*, 27, 129-38.
- LEE, P. C. & OZAWA, M. (2007) Reappraisal of HLA antibody analysis and crossmatching in kidney transplantation. *Clin Transpl*, 219-26.
- LEE, S. J., SEO, J. W., CHAE, Y. S., KIM, J. G., KANG, B. W., KIM, W. W., JUNG, J. H., PARK, H. Y., JEONG, J. Y. & PARK, J. Y. (2014a) Genetic polymorphism of miR-196a as a prognostic biomarker for early breast cancer. *Anticancer Res*, 34, 2943-9.
- LEE, W. C. (2015) Testing for Sufficient-Cause Gene-Environment Interactions Under the Assumptions of Independence and Hardy-Weinberg Equilibrium. *Am J Epidemiol*.
- LEE, Y. M., KIM, Y. H., HAN, D. J., PARK, S. K., PARK, J. S., SUNG, H., HONG, H. L., KIM, T., KIM, S. H., CHOI, S. H., KIM, Y. S., WOO, J. H. & LEE, S. O. (2014b) Cytomegalovirus infection after acute rejection therapy in seropositive kidney transplant recipients. *Transpl Infect Dis*, 16, 397-402.
- LEFAUCHEUR, C., SUBERBIELLE-BOISSEL, C., HILL, G. S., NOCHY, D., ANDRADE, J., ANTOINE, C., GAUTREAU, C., CHARRON, D. & GLOTZ, D. (2009) Clinical relevance of preformed HLA donor-specific antibodies in kidney transplantation. *Contrib Nephrol*, 162, 1-12.
- LEVINE, M. & ENSOM, M. H. (2001) Post hoc power analysis: an idea whose time has passed? *Pharmacotherapy*, 21, 405-9.
- LIFETECHNOLOGIES (06.07.2014)
<http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/references/ambion-tech-support/translation-systems/general-articles/ribosomal-binding-site-sequence-requirements.html>. Hamburg.
- LIN, C. H., OU, T. T., WU, C. C., TSAI, W. C., LIU, H. W. & YEN, J. H. (2007) IkappaBalpha promoter polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Immunogenet*, 34, 51-4.

- LORENZ, E. C., SETHI, S., LEUNG, N., DISPENZIERI, A., FERVENZA, F. C. & COSIO, F. G. (2010) Recurrent membranoproliferative glomerulonephritis after kidney transplantation. *Kidney Int*, 77, 721-8.
- LUCAS, D. P., LEFFELL, M. S. & ZACHARY, A. A. (2014) Differences in Immunogenicity of HLA Antigens and the Impact of Cross-Reactivity on the Humoral Response. *Transplantation*.
- MAEMURA, K., ZHENG, Q., WADA, T., OZAKI, M., TAKAO, S., AIKOU, T., BULKLEY, G. B., KLEIN, A. S. & SUN, Z. (2005) Reactive oxygen species are essential mediators in antigen presentation by Kupffer cells. *Immunol Cell Biol*, 83, 336-43.
- MAHDI, B. M. (2013) A glow of HLA typing in organ transplantation. *Clin Transl Med*, 2, 6.
- MARKIEWICZ-KIJEWSKA, M., KALICINSKI, P., KLUGE, P., PIATOSA, B., REKAWEK, A., JANKOWSKA, I., KOSTECKA, E. & KUROWSKI, P. N. (2014) Antibody-mediated rejection in pediatric liver transplant recipients. *Ann Transplant*, 19, 119-23.
- MARRIOTT, I. & HUET-HUDSON, Y. M. (2006) Sexual dimorphism in innate immune responses to infectious organisms. *Immunol Res*, 34, 177-92.
- MASUTANI, K. (2014) Current problems in screening, diagnosis and treatment of polyomavirus BK nephropathy. *Nephrology (Carlton)*, 19 Suppl 3, 11-6.
- MATAS, A. J., GILLINGHAM, K. J., PAYNE, W. D. & NAJARIAN, J. S. (1994) The impact of an acute rejection episode on long-term renal allograft survival (t1/2). *Transplantation*, 57, 857-9.
- MAY, M. J. & GHOSH, S. (1997) Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Semin Cancer Biol*, 8, 63-73.
- MAYO, O. (2008) A century of Hardy-Weinberg equilibrium. *Twin Res Hum Genet*, 11, 249-56.
- MCDONALD, J. H. (2009) *Handbook of biological Statistics*, Baltimore, Sparky House Publishing.
- MCGREGOR, C. G., RICCI, D., MIYAGI, N., STALBOERGER, P. G., DU, Z., OEHLER, E. A., TAZELAAR, H. D. & BYRNE, G. W. (2012) Human CD55 expression blocks hyperacute rejection and restricts complement activation in Gal knockout cardiac xenografts. *Transplantation*, 93, 686-92.

- MOLINERO, L. L. & ALEGRE, M. L. (2011) Role of T cell-nuclear factor kappaB in transplantation. *Transplant Rev (Orlando)*, 26, 189-200.
- MOROZUMI, K., TAKEDA, A., UCHIDA, K. & MIHATSCH, M. J. (2004) Cyclosporine nephrotoxicity: how does it affect renal allograft function and transplant morphology? *Transplant Proc*, 36, 251S-256S.
- 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 Immun*, 2, 153-5.
- MULLEY, W. R. & KANELIS, J. (2011) Understanding crossmatch testing in organ transplantation: A case-based guide for the general nephrologist. *Nephrology (Carlton)*, 16, 125-33.
- NATHAN, M. J., YIN, D., EICHWALD, E. J. & BISHOP, D. K. (2002) The immunobiology of inductive anti-CD40L therapy in transplantation: allograft acceptance is not dependent upon the deletion of graft-reactive T cells. *Am J Transplant*, 2, 323-32.
- NCBI (03.08.2014, 13:52)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?chooseRs=all&locusId=958&mrna=NM_001250.4&ctg=NT_011362.11&prot=NP_001241.1&orien=forward&refresh=refresh.
- NCBI (03.08.2014, 13:53)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?chooseRs=all&locusId=4792&mrna=NM_020529.2&ctg=NT_026437.13&prot=NP_065390.1&orien=reverse&refresh=refresh.
- NEIL A. CAMPBELL, J. B. R. (2003) *Biologie*, Heidelberg Berlin, Spektrum Akademischer Verlag GmbH
- NIEMI, M. & MANDELBROT, D. A. (2014) The Outcomes of Living Kidney Donation from Medically Complex Donors: Implications for the Donor and the Recipient. *Curr Transplant Rep*, 1, 1-9.
- O'CONNOR, B. P., GLEESON, M. W., NOELLE, R. J. & ERICKSON, L. D. (2003) The rise and fall of long-lived humoral immunity: terminal differentiation of plasma cells in health and disease. *Immunol Rev*, 194, 61-76.

- ONOUCHI, Y., ONOUE, S., TAMARI, M., WAKUI, K., FUKUSHIMA, Y., YASHIRO, M., NAKAMURA, Y., YANAGAWA, H., KISHI, F., OUCHI, K., TERA, M., HAMAMOTO, K., KUDO, F., AOTSUKA, H., SATO, Y., NARIAI, A., KABURAGI, Y., MIURA, M., SAJI, T., KAWASAKI, T. & HATA, A. (2004) CD40 ligand gene and Kawasaki disease. *Eur J Hum Genet*, 12, 1062-8.
- OPELZ, G. & DOHLER, B. (2007) Effect of human leukocyte antigen compatibility on kidney graft survival: comparative analysis of two decades. *Transplantation*, 84, 137-43.
- OPELZ, G., WUJCIAK, T., DOHLER, B., SCHERER, S. & MYTILINEOS, J. (1999) HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study. *Rev Immunogenet*, 1, 334-42.
- ORLICKA, K., BARNES, E. & CULVER, E. L. (2013) Prevention of infection caused by immunosuppressive drugs in gastroenterology. *Ther Adv Chronic Dis*, 4, 167-85.
- OTA, M., FUKUSHIMA, H., KULSKI, J. K. & INOKO, H. (2007) Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Nat Protoc*, 2, 2857-64.
- PALOMAR, R., RUIZ, J. C., ZUBIMENDI, J. A., COTORRUELO, J. G., DE FRANCISCO, A. L., RODRIGO, E., SANZ, S., FERNANDEZ-FRESNEDO, G. & ARIAS, M. (2002) Acute rejection in the elderly recipient: influence of age in the outcome of kidney transplantation. *Int Urol Nephrol*, 33, 145-8.
- PATEL, R. & TERASAKI, P. I. (1969) Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med*, 280, 735-9.
- PELLETIER, R. P., COSIO, F., HENRY, M. L., BUMGARDNER, G. L., DAVIES, E. A., ELKHAMMAS, E. A. & FERGUSON, R. M. (1998) Acute rejection following renal transplantation. Evidence that severity is the best predictor of subsequent graft survival time. *Clin Transplant*, 12, 543-52.
- PLEYER, U. & RITTER, T. (2003) Gene therapy in immune-mediated diseases of the eye. *Prog Retin Eye Res*, 22, 277-93.
- PONTICELLI, C., MORONI, G. & GLASSOCK, R. J. (2014) De novo glomerular diseases after renal transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol*, 9, 1479-87.

- PREZZEMOLO, T., GUGGINO, G., LA MANNA, M. P., DI LIBERTO, D., DIELI, F. & CACCAMO, N. (2014) Functional Signatures of Human CD4 and CD8 T Cell Responses to Mycobacterium tuberculosis. *Front Immunol*, 5, 180.
- PUTTARAJAPPA, C., SHAPIRO, R. & TAN, H. P. (2012) Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: a review. *J Transplant*, 2012, 193724.
- RAHIMI, Z., SHAHSAVANDI, M. O., BIDOKI, K. & REZAEI, M. (2013) MMP-9 (-1562 C:T) polymorphism as a biomarker of susceptibility to severe pre-eclampsia. *Biomark Med*, 7, 93-8.
- RAMESH, N., RAMESH, V., GUSELLA, J. F. & GEHA, R. (1993) Chromosomal localization of the gene for human B-cell antigen CD40. *Somat Cell Mol Genet*, 19, 295-8.
- REINKE, P., FIETZE, E., ODE-HAKIM, S., PROSCH, S., LIPPERT, J., EWERT, R. & VOLK, H. D. (1994) Late-acute renal allograft rejection and symptomless cytomegalovirus infection. *Lancet*, 344, 1737-8.
- RISCH, N. J. (2000) Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature*, 405, 847-56.
- ROMZOVA, M., HOHENADEL, D., KOLOSTOVA, K., PINTEROVA, D., FOJTIKOVA, M., RUZICKOVA, S., DOSTAL, C., BOSAK, V., RYCHLIK, I. & CERNA, M. (2006) NFkappaB and its inhibitor IkappaB in relation to type 2 diabetes and its microvascular and atherosclerotic complications. *Hum Immunol*, 67, 706-13.
- ROZOT, V., VIGANO, S., MAZZA-STALDER, J., IDRIZI, E., DAY, C. L., PERREAU, M., LAZOR-BLANCHET, C., PETRUCCIOLI, E., HANEKOM, W., GOLETTI, D., BART, P. A., NICOD, L., PANTALEO, G. & HARARI, A. (2013) Mycobacterium tuberculosis-specific CD8+ T cells are functionally and phenotypically different between latent infection and active disease. *Eur J Immunol*, 43, 1568-77.
- SABATINI, S. (1997) Influence of gender and race on therapeutic options for ESRD patients. *Am J Kidney Dis*, 30, 856-8.
- SANFILIPPO, F., GOEKEN, N., NIBLACK, G., SCORNIK, J. & VAUGHN, W. K. (1987) The effect of first cadaver renal transplant HLA-A, B match on sensitization levels and retransplant rates following graft failure. *Transplantation*, 43, 240-4.

- SCHLITT, A., REINDL, I., EBELT, H., BUERKE, M. & WERDAN, K. (2011) [Cardiac biomarkers in perioperative medicine : significance for noncardiac surgery patients]. *Anaesthesist*, 60, 709-16.
- SCHONBECK, U. & LIBBY, P. (2001) The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci*, 58, 4-43.
- SCHORDERET, D. F. (1994) [Polymerase chain reaction: basic principles]. *Schweiz Rundsch Med Prax*, 83, 588-94.
- SHLIPAK, M. G., MATSUSHITA, K., ARNLOV, J., INKER, L. A., KATZ, R., POLKINGHORNE, K. R., ROTHENBACHER, D., SARNAK, M. J., ASTOR, B. C., CORESH, J., LEVEY, A. S. & GANSEVOORT, R. T. (2013) Cystatin C versus creatinine in determining risk based on kidney function. *N Engl J Med*, 369, 932-43.
- SNANOUDJ, R., RABANT, M., ROYAL, V., PALLET, N., NOEL, L. H. & LEGENDRE, C. (2009) [Nephrotoxicity of calcineurin inhibitors: presentation, diagnostic problems and risk factors]. *Nephrol Ther*, 5 Suppl 6, S365-70.
- SOARES, A. A., EYFF, T. F., CAMPANI, R. B., RITTER, L., CAMARGO, J. L. & SILVEIRO, S. P. (2009) Glomerular filtration rate measurement and prediction equations. *Clin Chem Lab Med*, 47, 1023-32.
- SOKOLOVA, E. A., MALKOVA, N. A., KOROBKO, D. S., ROZHDESTVENSKII, A. S., KAKULYA, A. V., KHANOKH, E. V., DELOV, R. A., PLATONOV, F. A., POPOVA, T. Y., AREF' EVA, E. G., ZAGORSKAYA, N. N., ALIFIROVA, V. M., TITOVA, M. A., SMAGINA, I. V., EL' CHANINOVA, S. A., POPOVTSEVA, A. V., PUZYREV, V. P., KULAKOVA, O. G., TSAREVA, E. Y., FAVOROVA, O. O., SHCHUR, S. G., LASHCH, N. Y., POPOVA, N. F., POPOVA, E. V., GUSEV, E. I., BOYKO, A. N., AULCHENKO, Y. S. & FILIPENKO, M. L. (2013) Association of SNPs of CD40 gene with multiple sclerosis in Russians. *PLoS One*, 8, e61032.
- SOLEZ, K., AXELSEN, R. A., BENEDIKTSSON, H., BURDICK, J. F., COHEN, A. H., COLVIN, R. B., CROKER, B. P., DROZ, D., DUNNILL, M. S., HALLORAN, P. F. & ET AL. (1993) International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int*, 44, 411-22.

- SPEKTRUM (2015) <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/hardy-weinberg-gesetz/5264>.
- SPINK, C. F., GRAY, L. C., DAVIES, F. E., MORGAN, G. J. & BIDWELL, J. L. (2007) Haplotypic structure across the I kappa B alpha gene (NFKBIA) and association with multiple myeloma. *Cancer Lett*, 246, 92-9.
- SPRANGERS, B. & KUYPERS, D. R. (2013) Recurrence of glomerulonephritis after renal transplantation. *Transplant Rev (Orlando)*, 27, 126-34.
- SRINIVAS, T. R. & MEIER-KRIESCHE, H. U. (2008) Minimizing immunosuppression, an alternative approach to reducing side effects: objectives and interim result. *Clin J Am Soc Nephrol*, 3 Suppl 2, S101-16.
- STALLONE, G., INFANTE, B., SCHENA, A., BATTAGLIA, M., DITONNO, P., LOVERRE, A., GESUALDO, L., SCHENA, F. P. & GRANDALIANO, G. (2005) Rapamycin for treatment of chronic allograft nephropathy in renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol*, 16, 3755-62.
- STANEK, L. (2013) [Polymerase chain reaction: basic principles and applications in molecular pathology]. *Cesk Patol*, 49, 119-21.
- STEINMAN, L. (2001) Autoimmunerkrankung. *Spektrum der Wissenschaft-Spezial, Das Immunsystem*, 2, 60-69.
- STERN, C. (1943) The Hardy-Weinberg Law. *Science*, 97, 137-8.
- STERN, M., HIRSCH, H., CUSINI, A., VAN DELDEN, C., MANUEL, O., MEYLAN, P., BOGGIAN, K., MUELLER, N. J. & DICKENMANN, M. (2014) Cytomegalovirus serology and replication remain associated with solid organ graft rejection and graft loss in the era of prophylactic treatment. *Transplantation*, 98, 1013-8.
- STREHLAU, J., PAVLAKIS, M., LIPMAN, M., SHAPIRO, M., VASCONCELLOS, L., HARMON, W. & STROM, T. B. (1997) Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 695-700.
- STUBENDORFF, B., FINKE, S., WALTER, M., KNIEMEYER, O., VON EGGELING, F., GRUSCHWITZ, T., STEINER, T., OTT, U., WOLF, G., WUNDERLICH, H. & JUNKER, K. (2014) Urine protein profiling identified alpha-1-microglobulin and haptoglobin as biomarkers for early diagnosis of acute allograft rejection following kidney transplantation. *World J Urol*, 32, 1619-24.

- SUMETHKUL, V., JIRASIRITHAM, S., CHALERMSANYAKORN, P. & BURANACHOKPAISAN, W. (2001) Chronic rejection: a significant predictor of poor outcome for recurrence IgA nephropathy. *Transplant Proc*, 33, 3375-6.
- SUTTLES, J. & STOUT, R. D. (2009) Macrophage CD40 signaling: a pivotal regulator of disease protection and pathogenesis. *Semin Immunol*, 21, 257-64.
- TAKEMOTO, S., PORT, F. K., CLAAS, F. H. & DUQUESNOY, R. J. (2004) HLA matching for kidney transplantation. *Hum Immunol*, 65, 1489-505.
- TEJANI, A., CORTES, L. & STABLEIN, D. (1996) Clinical correlates of chronic rejection in pediatric renal transplantation. A report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study. *Transplantation*, 61, 1054-8.
- TERASAKI, P. & MIZUTANI, K. (2006) Antibody mediated rejection: update 2006. *Clin J Am Soc Nephrol*, 1, 400-3.
- TERASAKI, P. I. & CAI, J. (2005) Humoral theory of transplantation: further evidence. *Curr Opin Immunol*, 17, 541-5.
- THAKUR, S., LIN, H. C., TSENG, W. T., KUMAR, S., BRAVO, R., FOSS, F., GELINAS, C. & RABSON, A. B. (1994) Rearrangement and altered expression of the NFkB-2 gene in human cutaneous T-lymphoma cells. *Oncogene*, 9, 2335-44.
- THOMAS, P. E., KLINGER, R., FURLONG, L. I., HOFMANN-APITIUS, M. & FRIEDRICH, C. M. (2011) Challenges in the association of human single nucleotide polymorphism mentions with unique database identifiers. *BMC Bioinformatics*, 12 Suppl 4, S4.
- TITTELBAACH-HELMRICH, D., BAUSCH, D., DROGNITZ, O., GOEBEL, H., SCHULZ-HUOTARI, C., KRAMER-ZUCKER, A., HOPT, U. T. & PISARSKI, P. (2014) Hyperacute rejection of a living unrelated kidney graft. *Case Rep Med*, 2014, 613641.
- TRPKOV, K., CAMPBELL, P., PAZDERKA, F., COCKFIELD, S., SOLEZ, K. & HALLORAN, P. F. (1996) Pathologic features of acute renal allograft rejection associated with donor-specific antibody, Analysis using the Banff grading schema. *Transplantation*, 61, 1586-92.

- TULLIUS, S. G., TRAN, H., GULERIA, I., MALEK, S. K., TILNEY, N. L. & MILFORD, E. (2010) The combination of donor and recipient age is critical in determining host immunoresponsiveness and renal transplant outcome. *Ann Surg*, 252, 662-74.
- TZVETANOV, I., D'AMICO, G. & BENEDETTI, E. (2015) Robotic-assisted Kidney Transplantation: Our Experience and Literature Review. *Curr Transplant Rep*, 2, 122-126.
- URSUS-NIKOLAUS RIEDE, M. W., HANS-ECKART SCHÄFER (2004) *Allgemeine und spezielle Pathologie*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- USRDS (2015) <http://www.usrds.org/adr.aspx>.
- VALLABHAPURAPU, S. & KARIN, M. (2009) Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 27, 693-733.
- VAZGIOURAKIS, V. M., ZERVOU, M. I., CHOULAKI, C., BERTSIAS, G., MELISSOURGAKI, M., YILMAZ, N., SIDIROPOULOS, P., PLANT, D., TROUW, L. A., TOES, R. E., KARDASSIS, D., YAVUZ, S., BOUMPAS, D. T. & GOULIELMOS, G. N. (2011) A common SNP in the CD40 region is associated with systemic lupus erythematosus and correlates with altered CD40 expression: implications for the pathogenesis. *Ann Rheum Dis*, 70, 2184-90.
- VIAU, A., EL KAROUI, K., LAOUARI, D., BURTIN, M., NGUYEN, C., MORI, K., PILLEBOUT, E., BERGER, T., MAK, T. W., KNEBELMANN, B., FRIEDLANDER, G., BARASCH, J. & TERZI, F. (2010) Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans. *J Clin Invest*, 120, 4065-76.
- WALZL, G., RONACHER, K., HANEKOM, W., SCRIBA, T. J. & ZUMLA, A. (2011) Immunological biomarkers of tuberculosis. *Nat Rev Immunol*, 11, 343-54.
- WANG, J., WANG, Y. M. & AHN, H. Y. (2014) Biological Products for the Treatment of Psoriasis: Therapeutic Targets, Pharmacodynamics and Disease-Drug-Drug Interaction Implications. *AAPS J*.
- WANG, S., TIAN, L., ZENG, Z., ZHANG, M., WU, K., CHEN, M., FAN, D., HU, P., SUNG, J. J. & YU, J. (2010) IkappaBalpha polymorphism at promoter

- region (rs2233408) influences the susceptibility of gastric cancer in Chinese. *BMC Gastroenterol*, 10, 15.
- WEIDEMANN A, B. M., AMANN K, WIESENER M (2015) BANFF-Klassifikation der Histologie von Nierentransplantaten und therapeutische Konsequenzen *Nephrologe*, 10, 113-123.
- WIRA, C. R. & SANDOE, C. P. (1980) Hormonal regulation of immunoglobulins: influence of estradiol on immunoglobulins A and G in the rat uterus. *Endocrinology*, 106, 1020-6.
- WU, K., BUDDE, K., SCHMIDT, D., NEUMAYER, H. H. & RUDOLPH, B. (2014) Pathologic characteristics of early or late acute cellular rejection and outcome after kidney transplant. *Exp Clin Transplant*, 12, 314-22.
- WU, M. T., LAM, K. K., LEE, W. C., HSU, K. T., WU, C. H., CHENG, B. C., NG, H. Y., CHI, P. J., LEE, Y. T. & LEE, C. T. (2012) Albuminuria, proteinuria, and urinary albumin to protein ratio in chronic kidney disease. *J Clin Lab Anal*, 26, 82-92.
- XIA, Y., PENG, C., ZHOU, Z., CHENG, P., SUN, L., PENG, Y. & XIAO, P. (2012) [Clinical significance of saliva urea, creatinine, and uric acid levels in patients with chronic kidney disease]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 37, 1171-6.
- YABU, J. M. & VINCENTI, F. (2009) Kidney transplantation: the ideal immunosuppression regimen. *Adv Chronic Kidney Dis*, 16, 226-33.
- YAGINUMA, T., YAMAMOTO, H., MITOME, J., KOBAYASHI, A., YAMAMOTO, I., TANNO, Y., HAYAKAWA, H., MIYAZAKI, Y., YOKOYAMA, K., UTSUNOMIYA, Y., MIKI, J., YAMADA, H., FURUTA, N., YAMAGUCHI, Y. & HOSOYA, T. (2011) Successful treatment of nephrotic syndrome caused by recurrent IgA nephropathy with chronic active antibody-mediated rejection three years after kidney transplantation. *Clin Transplant*, 25 Suppl 23, 28-33.
- ZERVOU, M. I., GOULIELMOS, G. N., CASTRO-GINER, F., BOUMPAS, D. T., TOSCA, A. D. & KRUEGER-KRASAGAKIS, S. (2011) A CD40 and an NCOA5 gene polymorphism confer susceptibility to psoriasis in a Southern European population: a case-control study. *Hum Immunol*, 72, 761-5.
- ZHU, J., YAMANE, H. & PAUL, W. E. (2012) Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol*, 28, 445-89.

7. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Patientenkollektive	24
Tabelle 2: Gruppen der DNA-Proben nach Konzentration	25
Tabelle 3: Genpolymorphismen	26
Tabelle 4: PCR-Programme	27
Tabelle 5: Eigenschaften der verwendeten Restriktionsenzyme	30
Tabelle 6: Geleigenschaften für die Polymorphismen	32
Tabelle 7: Klinische und demographische Parameter für die Kollektive „keine Abstoßung und „akute Abstoßung“	35
Tabelle 8: Klinische und demographische Parameter für die Kollektive „keine Abstoßung und „multiple akute Abstoßung“	37
Tabelle 9: Klinische und demographische Parameter für die Kollektive „einmalig Transplantierte“ und „mehrmalig Transplantierte“	38
Tabelle 10: Genotypisierungsergebnisse	46
Tabelle 11: Hardy-Weinberg-Berechnungen	47
Tabelle 12: Genotyp- und Allelfrequenzen der CD40 Genpolymorphismen in den Kollektiven „keine Abstoßung“ und „akute Abstoßung“	49
Tabelle 13: Genotyp- und Allelfrequenzen der CD40 Genpolymorphismen in den Kollektiven „keine Abstoßung“ und „multiple akute Abstoßung“	50
Tabelle 14: Genotyp- und Allelfrequenzen der CD40 Genpolymorphismen in den Kollektiven „einmalig Transplantierte“ und „mehrmalig Transplantierte“	51
Tabelle 15: Genotyp- und Allelfrequenzen der NFKBIA Genpolymorphismen in den Kollektiven „keine Abstoßung“ und „akute Abstoßung“	53
Tabelle 16: Genotyp- und Allelfrequenzen der NFKBIA Genpolymorphismen in den Kollektiven „keine Abstoßung“ und „multiple akute Abstoßung“	55
Tabelle 17: Genotyp- und Allelfrequenzen der NFKBIA Genpolymorphismen in den Kollektiven „einmalig Transplantierte und „mehrmalig Transplantierte“	57

8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Sensibilisierungs- und Effektorphase einer akuten Transplantat-abstoßung	3
Abb. 2: B-Zellaktivierung	5
Abb. 3: Prinzip des CDC-Crossmatch	8
Abb. 4: Transplantationsabhängige Stimuli und Funktionen von NFκB	14
Abb. 5: Kozak-Sequenz bei Eukaryonten	16
Abb. 6: Zusammensetzung des Patientenkollektivs	22
Abb. 7: Nachweis des SNPs rs1883832 im CD40 Gen durch den Verdau der PCR-Amplifikate mit dem Restriktionsenzym NcoI	41
Abb. 8: Nachweis des SNPs rs4810485 im CD40 Gen durch den Verdau der PCR-Amplifikate mit dem Restriktionsenzym HpaI	41
Abb. 9: Nachweis des SNPs rs2233409 im NFKBIA Gen durch den Verdau der PCR-Amplifikate mit dem Restriktionsenzym Hpy8I	42
Abb. 10: Nachweis des SNPs rs2233408 im NFKBIA Gen durch den Verdau der PCR-Amplifikate mit dem Restriktionsenzym MnlI	42
Abb. 11: Nachweis des SNPs rs696 im NFKBIA Gen durch den Verdau der PCR-Amplifikate mit dem Restriktionsenzym HaeIII	43
Abb. 12: Nachweis des SNPs rs2233406 im NFKBIA Gen durch den Verdau der PCR-Amplifikate mit dem Restriktionsenzym BslI	43
Abb. 13: Nachweis des SNPs rs3138053 im NFKBIA Gen durch den Verdau der PCR-Amplifikate mit dem Restriktionsenzym HpyCH4III	44

9. ANHANG

9.1. Danksagung

Ich danke ganz besonders meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Martina Koch und meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. Hansjörg Thude für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der Materialien, die wissenschaftliche Unterstützung und die Betreuung bis zum Abschluss der Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei der Medizinisch-technischen Assistentin Petra Tiede für die Hilfe im Labor und die tolle Zusammenarbeit dort bedanken. Auch den anderen Labormitarbeitern gilt mein Dank für deren ständige Hilfsbereitschaft. Ich danke außerdem meinen Kommilitonen Raphael Dullin und Maike Janssen für die Unterstützung bei statistischen Fragen und für die Hilfe bei der Computerarbeit.

Mein Dank gilt natürlich ferner allen Patienten die sich dazu bereit erklärt haben ihr Blut für die Forschung zur Verfügung zu stellen und die diese Arbeit damit ermöglicht haben.

Ein letzter Dank geht an meine Mutter Steffi Nawka sowie an Wolfgang Wagner und Frank Oliver Henes, die mich emotional unterstützt und mir in schwierigen Phasen immer wieder Mut gemacht haben.

9.2. Lebenslauf

Der Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

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.

Unterschrift: Marie Teresa Nawka