

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie der Medizinischen Fakultät an der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktorin: Prof. Dr. Barbara Seliger)

HLA-Labor

**Multiplexanalyse von Biomarkern im Urin
zur Diagnose einer akuten Rejektion nach Nierentransplantation**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Diana Breuer

geboren am 27.03.1984 in Halle (Saale)

Gutachter: Prof. Dr. Barbara Seliger
Prof. Dr. Paolo Fornara
Prof. Dr. Kerstin Amann (Erlangen)

Datum der Eröffnung: 01.02.2011

Datum der Verteidigung: 28.11.2011

Referat

Ziel dieser Arbeit war es, eine routinetaugliche, nicht-invasive Multiparameteranalyse zu etablieren, die es ermöglicht, akute Rejektionen nach Nierentransplantation frühzeitig zu erkennen und gegebenenfalls diese in Steroid-sensitiv und Steroid-resistent zu differenzieren.

Dazu wurde der Urin von 54 Transplantationspatienten über den gesamten postoperativen Verlauf gesammelt und mittels Luminex™-Multiplex-Assays auf folgende 23 Biomarker untersucht: Interleukin-1alpha (IL-1 α), Interleukin-1beta (IL-1 β), Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist (IL-1ra), Interleukine (IL) -2, -6, -7, -8, -10, -13, -15 und -17, Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), Makrophagen-Migrations-inhibierender Faktor (MIF), Interferon-gamma (IFN- γ), IFN- γ induziertes Protein-10 (IP-10), Makrophagen inflammatorisches Protein-1alpha (MIP-1 α), lösliches Fibroblasten assoziiertes Protein (sFas) und sein Ligand (sFasL), Myeloperoxidase (MPO), lösliches Endothel-Selectin (sE-Selectin), lösliches interzelluläres und vaskuläres Adhäsionsmolekül-1 (sICAM-1, sVCAM-1) sowie gesamter Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (tPAI-1). Zusätzlich wurde sCD30 mit Hilfe eines Festphasenassays bestimmt. Die Transplantationspatienten wurden anhand klinischer und laborchemischer Parameter retrospektiv in drei Gruppen eingeteilt: (i) Patienten mit stabiler Transplantatfunktion, (ii) Patienten mit Steroid-sensitiver akuter Rejektion sowie (iii) Patienten mit Steroid-resistenter akuter Rejektion. Als Kontrolle wurden außerdem die Biomarker im Urin von 14 Patienten mit einem Harnwegsinfekt sowie von 14 gesunden Probanden bestimmt.

Die Konzentrationen von IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-1ra, sVCAM-1, sFas, IP-10 und tPAI-1 im Urin waren bei Abstoßungspatienten signifikant höher als bei Patienten mit stabiler Transplantatfunktion, wobei die Werte von IL-6, IL-8, IL-1ra, sVCAM-1, sFas, IP-10 und tPAI-1 sogar einen Tag vor klinischer Manifestation der Rejektion erhöht waren. Die Parameter sFas, TNF- α , MIF und MIP-1 α ermöglichten zusätzlich eine Unterscheidung zwischen Steroid-sensitiver und Steroid-resistenter Rejektion. In den Kontrollgruppen markierten IL-8, sFas, IL-1ra, IL-1 α , IP-10 und MIP-1 α einen Harnwegsinfekt. IL-8, sICAM-1, sVCAM-1, sFas, IL-1ra, IP-10 und MIF waren in geringen Mengen auch im Urin von gesunden Probanden nachweisbar.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass mittels Multiplex-Assays routinetauglich Biomarker im Urin bestimmt werden können, die eine akute Rejektion anzeigen. Dieser Ansatz könnte sich letztlich im Anschluss weiterer Studien zu einer diagnostischen Alternative zur Nierenbiopsie entwickeln.

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	III
1	Einleitung	1
1.1	Nierentransplantation	1
1.2	Immunpathogenese von Abstoßungsepisoden nach Nierentransplantation	1
1.3	Rejektionsdiagnostik	5
1.4	Immunsuppression	7
1.5	Auswahl der untersuchten, transplantationsrelevanten Biomarker	9
1.5.1	Proinflammatorische Zytokine	11
1.5.2	Antiinflammatorische Zytokine	14
1.5.3	Chemokine	15
1.5.4	Apoptosemarker	17
1.5.5	Adhäsionsmoleküle	18
1.5.6	Weitere Biomarker	19
2	Zielstellung	21
3	Material und Methoden	22
3.1	Patienten	22
3.1.1	Transplantierte Patientengruppen	22
3.1.2	Kontrollgruppen	24
3.1.3	Sammeln der Patientenproben	25
3.2	Material	27
3.2.1	Komplettsysteme/Kits	27
3.2.2	Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	28
3.3	Methoden	29
3.3.1	ELISA zur Quantifizierung von sCD30	29
3.3.2	Luminex™ Multiplex-Assay	30
3.3.3	Aufbereitung der Urinproben	32
3.4	Statistische Auswertung	32
4	Ergebnisse	34
4.1	Bestimmung von sCD30 im Urin	34
4.2	Methodische Analysen	34
4.2.1	Einfluss des pH-Wertes auf die Konzentrationsbestimmung	34
4.2.2	Ausschluss der Parameter, die mit dem Luminex™ Multiplex-Assay im Urin nicht nachzuweisen sind	35
4.2.3	Nachweisbarkeit der verbliebenen 16 Parameter	36
4.2.4	Intra- und Inter-Assay Varianzen	36

4.2.5	Untersuchung von Kontrollgruppen zur Ermittlung des Einflusses eines Harnwegsinfektes auf die Konzentration der untersuchten Parameter	37
4.3	Ermittlung allgemeiner Rejektionsmarker	40
4.4	Analysen zur Differenzierung der Abstoßungsepisode	43
4.5	Zusammenfassung der statistischen Analyse	45
4.6	Korrelationsanalyse	46
4.7	Analyse möglicher Confounder	46
4.8	Vergleich der zeitabhängigen individuellen Konzentrationsverläufe am Beispiel von IP-10	46
5	Diskussion	49
5.1	Urin als Analysemedium zur Diagnose einer Rejektion nach Nierentransplantation	49
5.2	Vorteile und Grenzen des Multiplex-Assays in der Routinediagnostik	50
5.3	Probleme, die sich aus der Rejektionsdiagnostik im Nierentransplantationszentrum Halle ergeben	51
5.4	Vergleich der Resultate mit den bisher publizierten Biomarkerdaten	52
5.4.1	sFas	53
5.4.2	IL-1 α und IL-1 β	54
5.4.3	IL-1ra	54
5.4.4	IL-6	55
5.4.5	IL-8	56
5.4.6	IL-10	56
5.4.7	IP-10	56
5.4.8	MIF	57
5.4.9	MIP-1 α	58
5.4.10	tPAI-1	58
5.4.11	TNF- α	59
5.4.12	sVCAM-1	59
5.5	Schlussfolgerung	59
5.6	Ausblick und zukünftige Experimente	60
6	Zusammenfassung	61
7	Literaturverzeichnis	63
8	Thesen	79

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antikörper-abhängige Zellzytotoxizität (<i>antibody-dependent cell cytotoxicity</i>)
AK	Antikörper
APC	Antigen präsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
ATG	Antithymozytenglobulin
ATN	akute Tubulusnekrose
CAN	chronische Transplantatnephropatie (<i>chronic allograft nephropathie</i>)
CMV	Zytomegalie-Virus
Crea	Kreatinin
CRP	C-reaktives Protein
E.coli	Escherichia coli
ELISA	Festphasenassay (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
G-CSF	Granulozyten Kolonie-stimulierender Faktor (<i>granulocyte colony stimulating Factor</i>)
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GM-CSF	Granulozyten/Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor (<i>granulocyte/ monocyte colony stimulating factor</i>)
gp	Glykoprotein
HLA	humanes Leukozyten Antigen (<i>human leukocyte antigen</i>)
HWI	Harnwegsinfekt
ICD-10	Internationale Klassifikation der Krankheiten
IL	Interleukin
IFN	Interferon
IP	Interferon gamma induziertes Protein (<i>interferon gamma inducible protein</i>)
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
MIF	Makrophagen Migrations-inhibierender Faktor (<i>makrophage migration inhibitory factor</i>)
MIP	Makrophagen inflammatorisches Protein (<i>macrophage inflammatory protein</i>)
MMF	Mycophenolatmofetil
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert

NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NKT-Zellen	natürliche Killer-T-Zellen
NTX	Nierentransplantation
post-TX	nach Transplantation
PRA	Panel reaktive Antikörper (<i>panel reactive antibodies</i>)
PTEC	proximale Tubulusepithelzellen (<i>proximal tubulus epithelial cells</i>)
R	Rezeptor
ra	Rezeptor Antagonist
ROC	<i>receiving operating characteristics</i>
Rx	Rejektion
SGF	stabile Transplantatfunktion (<i>stable graft function</i>)
sCD	<i>soluble Cluster of Differentiation</i>
SD	Standardabweichung
sFas/sFasL	lösliches Fibroblasten assoziiertes Protein und sein Ligand
sICAM	lösliches interzelluläres Adhäsionsmolekül (<i>soluble intercellular adhesion molecule</i>)
SRAR	Steroid-resistente akute Rejektion
SSAR	Steroid-sensitive akute Rejektion
sVCAM	lösliches Gefäßzell-Adhäsionsmolekül (<i>soluble vascular cell adhesion molecule</i>)
TGF	transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor
TX	Transplantation
tPAI	gesamter Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (<i>total plasminogen activator inhibitor</i>)
U/ml	Einheiten pro Milliliter (<i>units per milliliter</i>)

1 Einleitung

1.1 Nierentransplantation

Die Lebenserwartung in Deutschland steigt stetig. Für Frauen und Männer, die 2004 geboren wurden, ist eine durchschnittliche Lebenserwartung von 87,8 bzw. 81,7 Jahren vorausgesagt. Für 1950-Geborene hingegen liegt die errechnete Lebenserwartung mit 78,4 bzw. 71,1 Jahren deutlich niedriger (Statistisches Bundesamt Deutschland). Mit der zunehmenden Lebenslänge einhergehend steigen die Folgen chronischer Erkrankungen, wie die diabetische Nephropathie oder die Nephrosklerose durch arterielle Hypertonie. Beide Krankheitsbilder sind neben primären und sekundären Glomerulopathien die häufigsten Ursachen einer terminalen Niereninsuffizienz.

Die kostengünstigste und effektivste Art des Nierenersatzes ist die Nierentransplantation. Sie stellt für alle dialysepflichtigen Patienten u.a. durch das Aufheben der Trinkmengenrestriktion, Beseitigung der Anämie und anderer sekundärer Krankheitsbilder von Dialysepatienten, wie Juckreiz, Schlafstörungen, Kopfschmerzen und gastrointestinale Beschwerden, einen erheblichen Zugewinn an Lebensqualität dar (Laupacis *et al.*, 1996). Darüber hinaus ist für Nierentransplantierte im Vergleich zu Dialysepatienten ein klarer Überlebensvorteil belegt. So ist die „Langzeit-Mortalität“ eines Transplantierten verglichen mit Wartelistenpatienten um 50% verringert (Wolfe *et al.*, 1999).

1.2 Immunpathogenese von Abstoßungsepisoden nach Nierentransplantation

Neben chirurgischen Zwischenfällen sind Abstoßungsepisoden die häufigsten Komplikationen nach Nierentransplantation. Sie können irreversible Gewebeschäden verursachen, die eine Einschränkung der Nierenfunktion und bei ausbleibendem Ansprechen auf die Rejektionstherapie sogar den Verlust des Organs zur Folge haben. Ferner gelten akute Rejektionen als Risikofaktor für die Entstehung einer chronischen Abstoßung. Im Allgemeinen werden drei Formen von Abstoßungsepisoden anhand ihrer zeitlichen, klinischen und histopathologischen Eigenschaften unterschieden: hyperakut, akut und chronisch.

Hyperakute Abstoßungsreaktion

Als hyperakute Transplantatabstoßung bezeichnet man die irreversible Schädigung eines Allotransplantates unmittelbar nach Herstellung der Gefäßverbindung zwischen transplantiertem Organ und Empfängerorganismus. Sie wird hervorgerufen durch präformierte anti-HLA-Antikörper, die aufgrund einer bereits vorher erfolgten allogenen Transplantation, Transfusion oder Schwangerschaft gebildet wurden. Auch kann eine hyperakute Abstoßung durch Blutgruppen-spezifische (ABO) Antikörper hervorgerufen

werden (Martin, 1970). Sie stellt den Prototyp einer humoralen Immunantwort dar. Die zirkulierenden Antikörper binden an antigene Oberflächenepitope des Spenderorgans und vermitteln die Aktivierung des Komplementsystems. Dieses System wiederum führt einerseits zur Aktivierung, andererseits zur Zerstörung von Endothelzellen durch die Bildung des sog. „*Membrane Attack Complex*“. Zusätzlich wird die Gerinnungskaskade aktiviert. Fibrinablagerungen im Gefäß führen zu einem Gefäßverschluss, welcher aufgrund der verringerten Perfusion des Organs eine Gewebnekrose nach sich zieht. Der zweite Weg der humoralen Immunantwort läuft über die Antikörpervermittelte Zellzytotoxizität (ADCC: *Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity*). Hierbei binden Fc-Rezeptoren der zytotoxischen Zellen an den Fc-Teil der gebundenen Antikörper. Inflammationsmediatoren werden freigesetzt und führen zur Zerstörung der Endothelzellen (Vongwiwatana *et al.*, 2003). Final kommt es zum Funktionsverlust des Organs. Um diese Antikörpervermittelten Immunreaktionen zu vermeiden, wird den heutigen Standards entsprechend präoperativ die Blutgruppe bestimmt. Mittels einer sog. Kreuzverträglichkeitsprobe (Kreuztest - d.h. einer *in-vitro*-Inkubation von Spender-Lymphozyten mit Empfänger-Serum) werden gegebenenfalls vorhandene präformierte Antikörper nachgewiesen (Talbot *et al.*, 1992).

Akute Abstoßungsreaktion

Akute Rejektionen treten in den ersten Tagen bis Wochen nach Transplantation auf. Histopathologisch wird anhand der Banff Klassifikation von 1997 zwischen tubulointerstitieller Rejektion ohne Arteriitis, vaskulärer Rejektion mit Arteriitis und schwerwiegender Rejektion mit transmuraler Arteriitis unterschieden. Isolierte mononukleäre Infiltrate und eine geringgradige Tubulitis bezeichnet man als „*Borderline*“-Veränderungen, die eine akute Rejektion nahelegen (Racusen *et al.*, 1999). Vaskuläre Rejektionen sprechen im Vergleich zu den tubulointerstitiellen Rejektionen weniger gut auf eine Steroid-Bolustherapie an und gehen mit einer schlechteren Prognose einher (Visscher *et al.*, 1991; Nickleit *et al.*, 1998). Antikörpermedierte akute Rejektionen werden in der Klassifikation extra aufgeführt.

Immunologisch spielen bei akuten Abstoßungsreaktionen sowohl zelluläre als auch humorale Immunantworten eine Rolle: Die zelluläre Antwort korreliert histologisch mit dem Nachweis infiltrierender mononukleärer Zellen im interstitiellen Gewebe. Aktivierte Spenderendothelzellen exprimieren vermehrt Adhäsionsmoleküle und Entzündungsmediatoren. Dies führt zu einer zusätzlichen Infiltration durch Immunzellen. Um naive T-Zellen in aktivierte alloreaktive T-Zellen umzuwandeln, ist die Interaktion mit Antigen-präsentierenden Zellen (APC) notwendig. Dabei wird zwischen einer direkten und einer indirekten Antigenpräsentation unterschieden. Empfänger-T-Zellen erkennen donorspezifische MHC-Moleküle direkt auf den APC des Spenders. Auf dem indirekten

Weg erkennen die T-Zellen prozessierte Alloantigene, die durch die APC des Transplantatempfängers präsentiert werden (Sayegh und Turka, 1998). Die Antigenerkennung allein reicht nicht aus, um T-Zellen vollständig zu aktivieren. Dazu ist ein zweites kostimulatorisches Signal notwendig. Das am besten untersuchte Signal ist die Bindung von CD28 auf der Oberfläche von CD4⁺ T-Zellen mit einem Molekül der B7-Familie (B7.1 und B7.2) auf den APC (Linsley und Ledbetter, 1993). Die CD40-CD154-Interaktion ist ein weiteres wichtiges kostimulatorisches Signal für die T-Zellaktivierung (Durie *et al.*, 1994). Die Aktivierung beider Signalwege führt zu einer vielfältigen zellulären und humoralen Interaktion (**Abbildung 1**). So kommt es u.a. durch die vermehrte Expression von Interleukin (IL)-2 zur Proliferation, klonalen Expansion und Differenzierung der T-Zellen. Es entstehen aktivierte zytotoxische CD8⁺ T-Zellen (T_C) und CD4⁺ T-Helferzellen (T_H1- und T_H2-Zellen). Die zytotoxischen T-Zellen sind jetzt in der Lage, das donorspezifische Antigen auf dem Spenderorgan zu erkennen (tubuläre Epithelzellen oder vaskuläre Endothelzellen) und binden mit ihrem Fas-Liganden an den Rezeptor (Fas) auf der Zielzelle. Letztlich führt dieser Vorgang zur Apoptose der Zielzelle. Zusätzlich werden Perforin und Granzym B freigesetzt, die ebenfalls die Zielzellen lysieren.

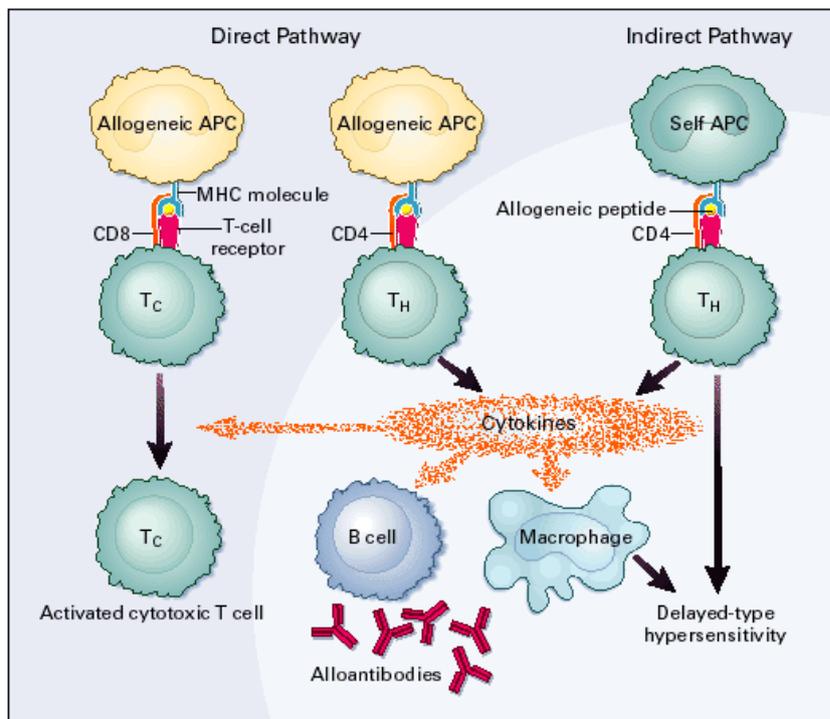


Abbildung 1: Zelluläre und humorale Interaktion nach Alloantigenpräsentation

Die T-Zellen erkennen das Antigen auf direktem oder indirektem Weg. Durch zusätzliche kostimulatorische Signale kommt es zur T-Zellaktivierung und Proliferation. Durch Zytokinproduktion kommt es zu Zell-Zell-Interaktionen und Effektormechanismen der Abstoßungsreaktion. Entnommen aus Sayegh und Turka, 1998.

T_H1-Zellen sind in der Lage durch die Expression von Interferon gamma und IL-2 Makrophagen zu aktivieren. Die T_H2-Zellen hingegen stellen die Verbindung zur humoralen Immunantwort dar. Zur Antikörperproduktion gegen alloreaktive Antigene durch die B-Zellen ist die Interaktion mit aktivierten T_H2-Zellen, die den Antigen/HLA-Klasse-II-Komplex erkennen, Voraussetzung. Durch die Sekretion von adjuvanten Zytokinen (IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10) kommt es zur Proliferation der B-Zelle mit Reifung zur Plasmazelle, die nun Alloantigen-spezifische Antikörper bilden kann. Die zirkulierenden Antikörper binden die Alloantigene und vermitteln den Zelltod durch zytotoxische Zellen oder durch Komplementaktivierung. C4d bleibt als Spaltprodukt nach Inaktivierung des Komplementfaktors C4b am Endothel gebunden. Es kann mittels monoklonaler Antikörper gegen C4d immunhistochemisch nachgewiesen werden und gilt als mittels Biopsie nachweisbarer Diagnosemarker für eine Rejektion (Feucht *et al.*, 1993). C4d-Ablagerungen weisen auf eine vaskuläre Rejektion hin, da diese überwiegend mit einer humoralen Immunantwort einhergeht.

Durch eine Verstärkung der Immunsuppression ist es möglich, die Auswirkungen der akuten Rejektionen einzudämmen oder sogar den Ausgangszustand wieder herzustellen.

Chronische Abstoßungsreaktion

Diese Form der Abstoßung ist ein schleichender Prozess, der sich über Monate bis Jahre entwickeln kann und mit einer zunehmenden Einschränkung der Nierenfunktion einhergeht. Histopathologisch ist die chronische Rejektion mit einer Tubulusatrophie und einer interstitiellen Fibrose vergesellschaftet (Racusen *et al.*, 1999). Die Pathogenese ist jedoch noch immer nicht hinreichend verstanden (Joosten *et al.*, 2005).

Mauiyyedi und Mitarbeiter (2001) konnten bei 23 von 38 Patienten mit chronischer Abstoßung C4d-Ablagerungen in der Niere nachweisen. 88% der C4d-positiven Transplantate wiesen zusätzlich Antikörper gegen donorspezifische HLA-Antigene auf. Neuere Forschungsergebnisse entsprechend wurde 2005 eine zusätzliche Differenzierung zwischen chronisch aktiver Antikörper- bzw. T-Zell-vermittelter Rejektion in die Banff Klassifikation aufgenommen (Solez *et al.*, 2007). Krieger und Mitarbeiter (2003) stellten nach Auswertung von 2140 Patienten folgende Risikofaktoren für die Ausbildung einer chronischen Rejektion auf: Anzahl der Transplantationen und akuten Rejektionen, präformierte Antikörper, Kreatininwert bei Krankenhausentlassung und vergleichend nach einem Jahr, verspätete Funktionsaufnahme nach einer Transplantation, inkompatible HLA-B und -DR Merkmale zwischen Spender und Empfänger und eine abgelaufene CMV-Infektion. Zusätzlich spielen die Nephrotoxizität der Calcineurin-Inhibitoren sowie der Ischämie- und Reperfusionsschaden postoperativ eine Rolle (Banasik und Klinger, 2006).

1.3 Rejektionsdiagnostik

Eine Abstoßungsreaktion äußert sich typischerweise in einem Rückgang der täglichen Harnausscheidung, einer Zunahme des Körpergewichts, einem Fremdkörpergefühl infolge der Größenzunahme des Transplantates (eventuell mit Schmerzen einhergehend), einer Temperaturerhöhung sowie einer Verschlechterung des Allgemeinbefindens mit Abgeschlagenheit und Unwohlsein. Aufgrund der guten Immunsuppression heute sind diese Symptome häufig nur noch gering ausgeprägt, was die Diagnose einer akuten Rejektion erschwert. Aus diesem Grund hat die Bedeutung der laborchemischen Diagnostik stark zugenommen. Bei akuten Rejektionen kommt es im Serum zu einem Anstieg von Harnstoff, Kreatinin und der Leukozytenzahlen, die glomeruläre Filtrationsrate ist erniedrigt. Die Blutsenkungsgeschwindigkeit ist beschleunigt und bei beginnender chronischer Abstoßung zeigt sich eine Proteinurie. Zusätzlich kann die Ultraschalluntersuchung in Kombination mit der Duplexsonographie zur Diagnosestellung herangezogen werden. Als sog. Goldstandard zur finalen Diagnose mit genauer Klassifikation der Rejektion gilt aber immer noch die Nierenbiopsie (Eismann *et al.*, 2004). Darüber hinaus werden neben rein diagnostischen Biopsien in vielen, insbesondere ausländischen Transplantationszentren, sog. Protokollbiopsien durchgeführt, deren Ziel es ist, die anfangs subklinisch verlaufenden Rejektionen frühzeitig zu identifizieren und zu therapieren.

Dennoch sind Invasivität und Komplikationsraten einer perkutanen Nierenbiopsie nicht zu vernachlässigen. Arterio-venöse Fisteln, makroskopische Hämaturien, perirenale Hämatome und vasovagale Reaktionen sind häufige (0,5-7,3 %) Komplikationen von Protokollbiopsien, seltener kommt es zum Verlust des Transplantates. 1 % der Fälle mussten mit Bluttransfusionen oder Kathetern versorgt werden (Furness *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2005). Im Vergleich dazu steigt bei diagnostischen Biopsien die Komplikationsrate, da die Organe häufig bereits geschädigt sind. So zeigten die Untersuchungen von Wilczek (1990), dass 0,3 % der Patienten aufgrund der Biopsie das Transplantat explantiert werden musste.

Ein generelles Problem der Nierenbiopsie stellt die ausreichende Gewinnung von histologisch verwertbarem Probenmaterial dar. So entsprachen in der Studie von Schwarz und Mitarbeitern (2005) nur 53 % bzw. 76 % (18-gauge bzw. 16-gauge Biopsienadel) der Protokollbiopsien den Anforderungen der Banff-Konferenz von 1997. Demnach müssen für eine adäquate Biopsie mind. zehn Glomeruli und mind. zwei Arterien vorliegen. Als Minimalanforderung wurden sieben Glomeruli und eine Arterie definiert. Zur diagnostischen Sicherheit müssen ferner zwei separate Kortexabschnitte untersucht werden (Racusen *et al.*, 1999).

Ein weiterer Nachteil der Nierentransplantatbiopsie besteht darin, dass in vielen Fällen der histologische Befund nicht im Einklang mit dem klinischen und laborchemischen Bild steht bzw. sich die Nierenfunktion verschlechtert, bevor histologisch messbare Veränderungen auftreten (Curtis *et al.*, 1996). In einer weiteren Studie konnten nur 68% der eindeutig klinisch und laborchemisch gesicherten Abstoßung mittels Biopsie histologisch bestätigt werden (Hamza *et al.*, 2006).

Damit ist die Relevanz dieses invasiven Verfahrens zur eindeutigen Rejektionsdiagnose auch heute keineswegs unumstritten. Da aber etablierte, weniger invasive Alternativen fehlen, basiert die Rejektionsdiagnostik heute weiterhin neben klinischer Untersuchung, Dopplersonographie und laborchemischer Parameter auf dem Ergebnis der Nierentransplantatbiopsie (Hamza *et al.*, 2006).

Um auf perkutane Transplantatbiopsien in Zukunft verzichten zu können, versuchen derzeit viele Forschungsgruppen, die Etablierung nicht-invasiver Verfahren zum Rejektionsnachweis voranzutreiben. Serum- und Urindiagnostik verschiedener immunologischer Faktoren unterstützen bereits heute die Diagnose von Rejektionen und ihren Differentialdiagnosen. Fischer und Mitarbeiter (2001) zeigten, dass sich mit Hilfe gemessener Veränderungen eines bestimmten Interleukinmusters (IL-2R, -6, -8) im Serum und Urin Transplantatabstoßungen von verschiedenen Differentialdiagnosen unterscheiden lassen (CMV-Infektionen, systemische Infektionen, Harnwegsinfekte und Pyelonephritiden). Als weiterer rejektionsrelevanter Marker stellte sich das uCRP (C-reaktive Protein im Urin) heraus, welches im Falle einer Abstoßung durch unselektive glomeruläre Proteinurie vermehrt im Urin nachweisbar ist. So zeigten Patienten mit einer histologisch nachgewiesenen Rejektion erhöhte uCRP-Spiegel, wobei im Falle einer vaskulären Rejektion die höchsten Spiegel auftraten. Durch zusätzliche Messungen des Serum-CRP ist eine bakterielle Infektion auszuschließen, welche neben einem erhöhten uCRP auch ein deutlich erhöhtes CRP im Serum aufweist (Steinhoff *et al.*, 1992). Ähnliche Ergebnisse demonstrierten Hamza und Mitarbeiter (2006). Hier wiesen sogar histologisch negative aber klinisch bestätigte Rejektionen (Besserung der Nierenfunktion nach Glukokortikoidtherapie) erhöhte CRP-Spiegel im Urin auf. Lasmar und Mitarbeiter (2005) konnten in einer retrospektiven Untersuchung zeigen, dass die Patienten, deren Rejektion nur mit Hilfe klinischer und laborchemischer Parameter diagnostiziert wurde, kein erhöhtes Risiko für Transplantatverlust, Tod oder Infektion gegenüber der Biopsie-gesicherten Patientengruppe aufwiesen.

Zur Überwachung der langfristigen Transplantatfunktion führte die Arbeitsgruppe von Lachmann (2009) fünf Jahre nach Transplantation ein HLA-Antikörper Screening mit Hilfe der Luminex™ Methode durch. Dabei fanden sie einen deutlichen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Donor-spezifischen Antikörpern und einem geringeren Transplantatüberleben. Proteomanalysen im Serum, Biomarkermonitoring

intraoperativer Biopsie sowie die Durchflusszytometrie von Oberflächenmolekülen im Urin sind weitere moderne nicht-invasive Ansätze zur Überwachung der Transplantatfunktion (Roberti und Reisman 2001; Sui *et al.*, 2010; Bodonyi-Kovacs *et al.*; 2010).

1.4 Immunsuppression

Im Jahre 1954 erfolgte die erste erfolgreiche Nierentransplantation zwischen eineiigen Zwillingen von J.E. Murray ohne jegliche Immunsuppression. Durch die Kombination von Kortikosteroiden und Azathioprin wurden ab 1962 erfolgreiche Nierentransplantationen nun auch nach postmortalen Spende und Verwandtenlebenspende durchgeführt. Jedoch erst als das Immunsuppressivum Ciclosporin 1982 in Deutschland eingeführt wurde, verbesserten sich hier die Überlebenschancen der transplantierten Patienten deutlich. Heute steht eine Vielzahl von Medikamentengruppen zur Auswahl. Durch die Kombination verschiedener Wirkstoffgruppen können deren immunsuppressive Wirkung potenziert und gleichzeitig die Dosierungen und damit auch die unerwünschten Wirkungen der einzelnen Immunsuppressiva reduziert werden. Die in Deutschland derzeit gängige Immunsuppression nach Nierentransplantation besteht aus einer Dreierkombination von Glukokortikoid, DNA-Synthese-Hemmer und Calcineurininhibitor.

Glukokortikosteroide (Methylprednisolon)

Ihr Wirkmechanismus ist von komplexer Natur. Steroide hemmen sowohl auf transkriptioneller als auch posttranskriptioneller Ebene Mediatorsubstanzen, die von phagozytierenden Zellen freigesetzt werden und für die Alloaktivierung von T-Zellen notwendig sind. Grundsätzlich hemmen sie somit den Aufbau einer Immunantwort, aber auch die Initiation eines entzündlichen Prozesses (Kirchner *et al.*, 2007).

DNA-Synthese-Hemmer (Azathioprin, Mycophenolatmofetil [MMF])

Bei Azathioprin handelt es sich um einen Antimetaboliten. Es wird in der Leber zu der wirksamen Form 6-Mercaptopurin umgewandelt, welches während der DNA- oder RNA-Synthese als falscher Baustein anstelle der Purinbasen Adenin und Guanin eingebaut wird. Dies führt zu einem Kettenabbruch. Dadurch wird die Expression von Interleukinen in Hepatozyten unterdrückt.

MMF hingegen ist ein Enzyblocker, der durch den sauren pH-Wert des Magensaftes zu seiner wirksamen Form Mycophenolsäure (MPS) gespalten wird. MPS, ein nicht-kompetitiver, reversibler Inhibitor der eukaryotischen Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase, blockiert die *de-novo*-Synthese der Guanosin-Nukleotide. MPS hemmt dadurch nur die Proliferation von T- und B-Lymphozyten, da nur Lymphozyten allein von der *de-novo*-Nukleotidsynthese abhängig sind. Alle anderen Zellen besitzen die Möglichkeit, ihre Nukleinsäuren wiederzuverwerten. Durch diese selektive Wirkung

ist das Nebenwirkungsspektrum von MMF im Vergleich zu Azathioprin geringer. Es gibt noch drei weitere Wirkmechanismen, die zu der immunsuppressiven Wirkung von MMF beitragen: (i) Induktion der Apoptose in aktivierten T-Zellen, (ii) Hemmung der Glykosylierung und Expression einiger Adhäsionsmoleküle und eine damit verbundene verminderte Rekrutierung von Lymphozyten und Monozyten und (iii) Hemmung der Produktion von Sauerstoffradikalen (Allison und Eugui, 2000).

Calcineurin-Inhibitoren (Ciclosporin, FK506/Tacrolimus)

Nach Interaktion mit dem von APC präsentierten Antigen kommt es zur Aktivierung des T-Zell-Rezeptors. Daraus resultiert ein Anstieg des intrazellulären Calciums, welcher eine Aktivierung von Calcineurin zur Folge hat. Calcineurin ist eine Protein-Phosphatase und phosphoryliert den sog. „*Nuclear Factor*“, welcher für die Transkription von Interleukin-2, -3, -4, -5, IFN- γ , CM-GSF, TNF- α und der Proto-Onkogene c-myc und c-rel verantwortlich ist. Ciclosporin bindet nun im Zytoplasma der T-Zellen an Cyclophilin und Tacrolimus an das FK-Bindungsprotein 12. Beide Komplexe lagern sich an Calcineurin und hemmen dessen Aktivierung. Die nun ausbleibende Phosphorylierung des „*Nuclear Factors*“ durch Calcineurin verursacht durch die fehlenden Mediatorsubstanzen eine Hemmung der T-Lymphozyten-Proliferation (Schreiber und Crabtree, 1992).

Proliferations-Hemmer (Sirolimus, Everolimus)

Beide Wirkstoffe hemmen die Zellproliferation durch die Blockade des Zellzyklus von der G1-Phase zur S-Phase. Sie gehen einen Komplex mit dem FK-Bindungsprotein-12 ein, welcher die Proteinkinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) hemmt. Dadurch wird der Arrest in der G1-Zellzyklusphase verursacht (Schuler *et al.*, 1997). Neueste Studien haben gezeigt, dass mTOR-Inhibitoren den Spiegel von sog. Tregs (regulierende T-Zellen, die die Alloantigenpräsentation inhibieren können) nicht senken, im Vergleich zu Ciclosporinen, und somit ein besseres Langzeitüberleben des Transplantates gewährleisten (López-Hoyos *et al.*, 2009).

Klassische polyklonale Antikörper (Antithymozytenglobulin-ATG, Antilymphozytenglobulin-ALG)

ATG/ALG sind polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen, die gegen menschliche Lymphozyten gerichtet sind. Sie enthalten neben T-Zell-spezifischen Antikörpern (CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD25) auch spezifische Antikörper gegen aktivierte B-Zellen (CD19, CD20, CD21), Adhäsionsmoleküle (CD11a, CD18), Monozyten, natürliche Killerzellen und Transduktionsmoleküle (CD45). Polyklonale Antikörper wirken final durch eine ungezielte Lymphopenie immunsuppressiv, was deren Einsatz bei akuten Rejekti-

onen erklärt, allerdings mit einem hohen Nebenwirkungsspektrum (Bonney-Bérard *et al.*, 1991).

Monoklonale Antikörper (u.a. Anti-IL-2R-AK, OKT3, Anti-CD52-AK)

Eine gezieltere Immunsuppression durch monoklonale Antikörper wird bereits in einigen Transplantationszentren durchgeführt:

Antikörper gegen den Interleukin-2 Rezeptor (IL-2R) wie z.B. Basiliximab oder Daclizumab führen zur Hemmung der IL-2 vermittelten T-Zellaktivierung. OKT3 (Anti-CD3-AK) eliminiert gezielt alle CD3-positiven T-Zellen. Eine weitere sehr potente Lymphozytenverringende Substanz ist der anti-CD52-AK. CD52 ist ein Glykoprotein, welches auf zirkulierenden Monozyten, T- und B-Lymphozyten sowie NK-Zellen exprimiert wird (Kirchner *et al.*, 2007).

1.5 Auswahl der untersuchten, transplantationsrelevanten Biomarker

Wie im Abschnitt 1.2 dargestellt laufen bei einer Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantation durch das Zusammenspiel aller immunologisch aktiven Zellen komplexe Vorgänge ab. Diese Interaktion wird größtenteils durch eine Vielzahl von Mediatorsubstanzen ermöglicht.

Die Auswahl der Parameter, die in der vorliegenden Arbeit gemessen wurden, basiert einerseits auf dem Wissen der pathologischen Mechanismen einer Rejektion und andererseits auf publizierter Literatur, in welcher diese Marker bereits im Rahmen von Transplantationen Erwähnung fanden. Viele dieser Parameter wurden bisher auf mRNA- und Proteinebene in Biopsaten oder als Marker im Serum nachgewiesen, die wenigsten jedoch im Urin. Die Auswahl wurde allerdings letztlich aufgrund der Verfügbarkeit durch den Hersteller der verwendeten Kits festgelegt. Eine Übersicht über alle gemessenen Parameter und deren Einteilung in verschiedene Gruppe zeigt **Tabelle 1**.

Tabelle 1: Übersicht der potentiell transplantationsrelevanten Parameter

Faktor	MG*	Produzierende Zellen
Proinflammatorische Zytokine		
IL-1α/IL-1β	17	Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten, Fibroblasten, Endothelzellen
IL-2	15	CD4+/CD8+-T-Zellen, dendritische Zellen, NK-Zellen
IL-6	26	T- und B-Lymphozyten, Monozyten, Hepatozyten, Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen
IL-7	25	dendritische Zellen, intestinale Epithelzellen, Keratinozyten, Fibroblasten
IL-15	14-15	Monozyten/Makrophagen, renale Tubuluszellen
IL-17	20-30	CD4 ⁺ T-Gedächtniszellen, Monozyten, Nierenepithelzellen
IFN-γ	16,9	CD4+/CD8+ T-Zellen, NK-, NKT-, B-Zellen, Monozyten/ Makrophagen, dendritische Zellen
MIF	12,5	T-Lymphozyten, renale Tubuluszellen, glomeruläre Epithelzellen, Gefäßmuskelzellen
TNF-α	17	Makrophagen, NK-Zellen, T-Zellen
Antiinflammatorische Zytokine		
IL-1ra	17-18	Monozyten/Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Fibroblasten, Hepatozyten
IL-10	39	B-, T-Lymphozyten, Monozyten
IL-13	12,4	T-Lymphozyten
Chemokine		
IL-8	10	Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen
IP-10	10	Keratinozyten, Monozyten, T-Zellen, Fibroblasten, Endothel
MIP-1α	8	Monozyten, T-Zellen, Fibroblasten, Endothelzellen, Gefäßmuskelzellen
Apoptosemarker		
sFas	43	Epithelzellen (renale Tubuluszellen, Mesangiumzellen), Leukozyten
sFasL	40	Monozyten
Adhäsionsmoleküle		
E-Selectin	115	Endothelzellen
ICAM-1	76-114	Makrophagen, Lymphozyten, Gefäßendothel, renale Tubuluszellen
VCAM-1	110	Endothelzellen, Epithelzellen (Bowman-Kapsel, Tubuluszellen), Makrophagen, dendritische Zellen
Weitere Biomarker		
tPAI-1	54	Gefäßendothelzellen, viszerale Adipozyten
MPO	150	neutrophile Granulozyten, Monozyten
sCD30	85	Th2-, B-, NK-Zellen, dendritische Zellen

*MG-Molekulargewicht in kDa

1.5.1 Proinflammatorische Zytokine

Interleukin-1alpha und Interleukin-1beta (IL-1 α und IL-1 β)

Beide Proteine zählen zu der Interleukin-1 Familie. Sie werden nach Stimulation durch Lipopolysaccharid (LPS) von Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, neutrophilen Granulozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und verschiedenen anderen Zellen exprimiert (Oppenheim, 1986). Beim Menschen zirkuliert überwiegend IL-1 β im Plasma. Beide Liganden werden durch die gleichen Rezeptoren gebunden. Dadurch werden B- und T-Zellfunktionen aktiviert, Fieberreaktionen reguliert und Akut-Phase-Proteine gebildet. Zusätzlich wirkt IL-1 prokoagulatorisch am Gefäßendothel (Bevilacqua *et al.*, 1984) und chemotaktisch auf Granulozyten (Sauder *et al.*, 1984).

IL-1 agiert als wichtiger Cofaktor der T-Zellaktivierung, indem es die Expression des IL-2-Rezeptors induziert (Kaye *et al.*, 1984). Da die T-Zellaktivierung bei akuten Rejektion von Bedeutung ist, konnten bereits während einer Abstoßung nach NTX erhöhte Urinwerte von IL-1 festgestellt werden (Teppo *et al.*, 2001).

Interleukin 2 (IL-2)

IL-2 wird überwiegend von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen synthetisiert. Auch aktivierte dendritische Zellen und NK-Zellen haben die Fähigkeit, IL-2 zu exprimieren. IL-2 ist ein essentieller Wachstums- und Differenzierungsfaktor für die T-Lymphozyten, aber auch für NK-Zellen, einige B-Lymphozyten, polymorphnukleäre Zellen sowie Monozyten und Makrophagen. Die Aktivierung der T-Zellen durch Interaktion mit Antigen-präsentierenden Zellen bewirkt den Übergang der ruhenden T-Zelle in die G1-Phase des Zellzyklus. Als Folge der Zellzyklusdearretierung werden vermehrt IL-2 und sein Rezeptor IL-2R synthetisiert. IL-2R besteht aus drei Untereinheiten, der α -, β - und γ -Kette. Erst die Verbindung dieser drei Ketten lässt einen hochaffinen Rezeptor entstehen, der nach Bindung durch IL-2 die T-Zelle im Zellzyklus voranschreiten lässt und die Mitose einleitet. Es kommt nun zu Zellproliferation, Differenzierung und klonaler Expansion (Malek, 2008). Eine weitere wichtige Aufgabe ist die Monozytenaktivierung: IL-2 bewirkt in diesen die Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 sowie die Synthese von Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren (Espinoza-Delgado *et al.*, 1995). Als Hauptmediator der einsetzenden Alloantigen-spezifischen Immunantwort spielt IL-2 in der Nierentransplantation offensichtlich eine große Rolle. Im Rahmen akuter Abstoßungen konnten erhöhte Plasmawerte diagnostiziert werden (Kutukculer *et al.*; 1995). Daher werden auch Immunsuppressiva eingesetzt, die die IL-2-Produktion hemmen (Ciclosporin) oder die Interaktion mit seinem Rezeptor verhindern (Anti-IL-2 Rezeptor-Antikörper). Allerdings gibt es auch widersprüchliche Untersu-

chungen, in denen keine Korrelation zwischen einer IL-2-Genexpression im Biopat und einer akuten Rejektion nachgewiesen werden konnte (Strehlau *et al.*, 1997).

Interleukin 6 (IL-6)

Das Glykoprotein IL-6 wird überwiegend in T- und B-Lymphozyten, Hepatozyten, Monozyten, Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen gebildet. IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin: durch Induktion der IL-2 und IL-2R Expression kommt es zu einer T-Zellaktivierung und -differenzierung. Des Weiteren beeinflusst IL-6 die B-Zelldifferenzierung und stimuliert die Immunglobulinproduktion. Zusätzlich induziert es Akut-Phase-Proteine in den Hepatozyten sowie das Wachstum von renalen Mesangiumzellen (Hirano *et al.*, 1990). Aus diesem Grund spielt es eine große Rolle bei der mesangioproliferativen Glomerulonephritis. Beschrieben wurde in dieser Hinsicht ein Zusammenhang zwischen der Menge von IL-6 im Urin und der Progression der mesangioproliferativen Glomerulonephritis (Horii *et al.*, 1989). Die IL-6 Wirkungen werden über einen spezifischen IL-6 Rezeptor vermittelt. In Nierentransplantaten kann IL-6 sowohl von den lokal vorhandenen Zellen (Mesangiumzellen, renale Tubuluszellen und vaskuläre Endothelzellen) als auch von infiltrierten Zellen gebildet werden. Hauptproduktionsort während einer Abstoßungsepisode sind allerdings die interstitiellen mononukleären Zellen (Waiser *et al.*, 1997). IL-6 wird während einer Infektion mit gramnegativen Bakterien freigesetzt und gilt daher zusätzlich als Entzündungsmarker (Hedges *et al.*, 1991).

Interleukin 7 (IL-7)

Das humane IL-7 wird von diversen immunologischen und nicht-immunologischen Zellen gebildet wie z.B. von dendritischen Zellen, Fibroblasten, intestinalen Epithelzellen und Keratinozyten. Das Protein wirkt durch die Förderung der T-Lymphozytenproliferation proinflammatorisch (Jiang *et al.*, 2005). Nierenbiopate, die im Rahmen von akuten Abstoßungen nach Transplantation gewonnen wurden, zeigten eine erhöhte Expression von IL-7 (Strehlau *et al.*, 1997).

Interleukin 15 (IL-15)

IL-15 wird von verschiedenen immunologisch aktiven Zellen produziert, vor allem aber von Monozyten/Makrophagen. Es hat strukturell und funktionell viele Gemeinsamkeiten mit IL-2. So stimuliert es die Proliferation von T-Lymphozyten über eine Komponente des IL-2Rezeptors (Grabstein *et al.*, 1994). *In-vitro*-Experimente von Wilkinson und Mitarbeitern (1995) haben gezeigt, dass IL-15 für die Chemokinese und Chemotaxis von T-Zellen (CD4⁺ und CD8⁺) verantwortlich ist. Dabei ist es sogar potenter als die Chemokine IL-8 und MIP-1 α . Zusätzlich aktiviert dieses Zytokin humane NK-Zellen und

steigert die durch IL-12 vermittelte Wirkung, IFN- γ und TNF- α in NK-Zellen zu produzieren (Carson *et al.*, 1994). In der Niere wird IL-15 konstitutiv von den Tubuluszellen gebildet. Diese Produktion kann durch IFN- γ gesteigert werden. Durch seine Wirkung in Bezug auf T-Zellen spielt IL-15 eine große Rolle bei entzündlichen Erkrankungen der Niere, z.B. bei Glomerulonephritiden (Weiler *et al.*, 1998). Nierenbiopsien haben bewiesen, dass IL-15-Transkripte auch bei akuten Rejektionen vermehrt produziert werden (Pavlakis *et al.*, 1996).

Interleukin 17 (IL-17)

IL-17 wird als Homodimer von CD4⁺ T-Gedächtniszellen (CD45⁺RO⁺) gebildet und stimuliert die Produktion von proinflammatorisch (IL-6, IL-8) und hämatopoetisch (G-CSF für neutrophile Granulozyten) wirksamen Parametern in verschiedenen Stromazellen (Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen) (Fossiez *et al.*, 1996). Jovanovic und Mitarbeiter (1998) haben gezeigt, dass auch aktivierte humane Monozyten nach IL-17-Stimulation durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (*Nuclear Factor kappaB*) in der Lage sind, IL-1 β , TNF- α und andere Zytokine vermehrt zu exprimieren. Auch humane Nierenepithelzellen zeigten *in-vitro* die Expression von IL-6 und IL-8 nach IL-17-Stimulation. Die Untersuchung von Nierenbiopsaten mit akuter Abstoßung nach NTX wiesen ebenso eine erhöhte Expression von IL-17 auf (Strehlau *et al.*, 1997). Loong und Mitarbeiter (2002) konnten diese Produktionserhöhung bereits in Biopsaten von *Borderline*-Rejektionen nachweisen. Zudem gelang der Nachweis von IL-17 auf mononukleären Zellen im Urinsediment.

Interferon gamma (IFN- γ)

IFN- γ ist ein Typ-II Interferon, welches von verschiedenen immunologisch aktiven Zellen exprimiert wird: CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen, NKT-Zellen (natürliche Killer-T-Zellen), professionelle APC (Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen). Die Synthese wird durch IL-12 und -18 gesteigert. IL-4 und -10 sowie TGF- β (*transforming growth factor*) und Glukokortikoide dagegen hemmen die Produktion. Der ubiquitär vorkommende IFN- γ -Rezeptor besteht aus jeweils zwei ligandenbindenden und signaltransduzierenden Ketten, die trotz ihrer konstitutiven Expression einer strengen Regulation unterliegen. IFN- γ bewirkt eine Immunmodulation und Leukozytenrekrutierung durch Expressionserhöhung von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen (IL-12, IP-10, MIP, ICAM und VCAM). Außerdem werden MHC-Klasse-I- und -II-Moleküle heraufreguliert. Eine weitere Funktion ist die Bildung einer natürlichen Resistenz gegenüber bakteriellen, parasitären und viralen Infektionen. So weist IFN- γ durch die erhöhte Synthese von Fas/FasL und TNF- α R apoptotische Eigenschaften auf. Zusätzlich werden Stickstoffoxid-Intermediate und radikale Sauerstoffspezies produziert,

die toxisch auf phagozytierte Mikroorganismen wirken (Schroder *et al.*, 2004). INF- γ wird von Th1-Zellen exprimiert und aktiviert zytotoxische T-Zellen, auch im Zusammenhang einer Rejektion. So konnten bei Patienten mit akuter Nierenabstoßung erhöhte IFN- γ Plasmaspiegel festgestellt werden (Karczewski *et al.*, 2008). Allerdings wurde in Biopstatuntersuchungen auch gezeigt, dass eine IFN- γ Erhöhung nicht spezifisch für eine Rejektion ist (Strehlau *et al.*, 1997).

Makrophagen Migrations-inhibierender Faktor (MIF)

MIF ist das am längsten bekannte proinflammatorische Lymphokin (Weiser *et al.*, 1989). Es wird sowohl von stationären als auch von infiltrierenden Leukozyten in verschiedenen Geweben gebildet. MIF zeigt chemotaktische Eigenschaften, indem er Makrophagen und T-Zellen rekrutiert und diese am Ort der Inflammation akkumuliert. Er kann diese zusätzlich aktivieren und ihre Proliferation stimulieren. Dem Protein wird außerdem eine Rolle bei der DTH (*delayed-type hypersensitivity*) zugeschrieben (Bernhagen *et al.*, 1996). Eine besondere Eigenschaft besteht darin, den Funktionen von Glukokortikoiden entgegenzuwirken (Calandra *et al.*, 1995). Immunhistochemische Untersuchungen von Nierenbiopstaten und mRNA Messungen haben gezeigt, dass MIF nicht nur Produkt aktivierter T-Zellen ist, sondern auch in geringen Mengen konstitutiv in der gesunden Niere von Tubuluszellen, wenigen glomerulären Epithelzellen und Gefäßmuskelzellen synthetisiert wird (Lan *et al.*, 1998).

Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α)

TNF- α bekam seinen Namen durch den zuerst entdeckten zytotoxischen Effekt auf Tumorzellen. Allerdings hat TNF- α noch vielfältige weitere Funktionen. Rezeptoren für dieses proinflammatorische Zytokin werden auf verschiedenen Zellen exprimiert. So spielt TNF- α eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen (IL-1 und IL-10 Induktion), Knochenresorption, Produktion und Funktion von Granulozyten, Hämostase und Beeinflussung des Lipidstoffwechsels, was ihm den weiteren Namen Kachexin verlieh (Munker und Koeffler, 1987). Es wird u.a. durch IFN- γ -, Protozoen- oder LPS-stimulierten Makrophagen gebildet (Männel *et al.*, 1980; Beutler *et al.*, 1985). Auch während Transplantatabstoßungen wurden bereits erhöhte Serumwerte von TNF- α beschrieben (Maury und Teppo, 1987).

1.5.2 Antiinflammatorische Zytokine

Interleukin 1 Rezeptor Antagonist (IL-1ra)

IL-1ra operiert als ein natürlicher Antagonist des IL-1, indem er kompetitiv die Bindung von IL-1 an seine Rezeptoren IL-1RI und II hemmt, ohne eine agonistische Aktivität auszulösen. Dadurch wirkt er antiinflammatorisch. Es gibt eine intrazelluläre und eine

lösliche Form (Lennard, 1995), welche u.a. von Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen und Fibroblasten unter Einwirkung verschiedener Stimuli, wie z.B. LPS, Interleukine, IFN- γ und Immunglobulin G, produziert wird (Arend, 1998). Zusätzlich wird IL-1ra durch Stimulation von IL-1 β und IL-6 in Hepatozyten synthetisiert, womit er die Funktion eines Akut-Phase Proteins erfüllt (Gabay *et al.*, 1997).

Interleukin 10 (IL-10)

Humanes IL-10 wird als Homodimer sowohl von B- und T-Lymphozyten als auch von aktivierten Monozyten (Bromberg *et al.*, 1995) gebildet und inhibiert deren Zytokinproduktion (IL-1 α , -1 β , IL-6, -8, TNF- α , GM-CSF) (de Waal Malefyt *et al.*, 1991a). IL-10 inhibiert in Anwesenheit von APC auf der Ebene der mRNA-Expression die Bildung der T_H1-Zell-Zytokine (IFN- γ , IL-3 sowie IL-2), wodurch indirekt die Proliferation von T_H1-Zellen gehemmt wird (Fiorentino *et al.*, 1989). Hinzu kommt, dass die Stimulation zur Antigen-spezifischen T-Zellproliferation vermindert ist, da zusätzlich die Synthese von MHC-Klasse-II-Molekülen in Monozyten herabreguliert wird (de Waal Malefyt *et al.*, 1991b). Ferner wird in Monozyten der Fc-Rezeptor für monomerisches Immunglobulin G heraufreguliert. Dies führt zu einer vermehrten Monozyten-medierten Antikörper-abhängigen Zellzytotoxizität (ADCC) und zeigt, dass IL-10 nicht ausschließlich immunsuppressive Eigenschaften hat (te Velde *et al.*, 1992). In Nierentransplantaten wird es hauptsächlich von den infiltrierenden Monozyten/Makrophagen und T-Lymphozyten gebildet (Oliveira *et al.*, 1998).

Interleukin 13 (IL-13)

IL-13 wird von aktivierten humanen T-Lymphozyten produziert. Es hat antiinflammatorische und zytoprotektive Eigenschaften: IL-13 unterdrückt die Expression von proinflammatorischen Proteinen, stimuliert die Bildung von IL-1ra, wirkt antiapoptotisch und antioxidativ (Sandovici *et al.*, 2008). Zusätzlich kann es die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von humanen B-Zellen beeinflussen (Defrance *et al.*, 1994). Im Experiment mit Rattennieren ist es gelungen, mittels IL-13 Gentransfer den Ischämie- und Reperfusionsschäden einzudämmen. IL-13 führte dort zu einer Verminderung der Inflammation durch Reduktion der lokalen Expression von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen (E-Selectin, IL-8, MIP-2, TNF- α und MCP-1) und eine dadurch bedingte geringere Infiltration von Entzündungszellen (Sandovici *et al.*, 2008).

1.5.3 Chemokine

Chemokine sind Signalproteine, die die Rekrutierung bestimmter Zellen hervorrufen. Aus der Anzahl und Position von Cysteinresten am Amino-Terminus leitet sich die sys-

tematische Nomenklatur der Chemokine ab. Bei den CC-Chemokinen folgen die ersten beiden Cysteine direkt aufeinander, bei den CXC-Chemokinen sind sie durch eine Aminosäure voneinander getrennt. Dementsprechend werden zusätzlich C- und CX3C-Chemokine differenziert (Zlotnik und Yoshie, 2000).

Interleukin 8 (IL-8)

Hauptproduzent von IL-8 (CXC-Chemokin) sind die durch LPS, IL-1 β und TNF stimulierten Monozyten (Schmouder *et al.*, 1992). Darüber hinaus sind viele andere nicht immunologische Zellen u.a. proximale und distale Tubuluszellen der Niere an der Produktion beteiligt. Die Ausschüttung von IL-8 bewirkt die Migration und Degranulation von neutrophilen Granulozyten sowie das Einwandern von T-Lymphozyten an den Inflammationsort (Yoshimura *et al.*, 1987, Larsen *et al.*, 1989).

Interferon gamma induziertes Protein 10 (IP-10)

IP-10 (CXC-Chemokin) spielt eine entscheidende Rolle bei vielen entzündlichen Prozessen und Erkrankungen. Unter dem Einfluss von IFN- γ wird die Produktion von IP-10 u.a. in Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen angeregt (Luster *et al.*, 1985). Gemeinsam mit TNF stimuliert IFN- γ die Expression von IP-10 in proximalen Tubuluszellen der Niere und bewirkt dort die Chemotaxis von Leukozyten, v.a. von NK-Zellen (Luster, 1998) und aktivierten T-Zellen (Cockwell *et al.*, 2002). Immunhistochemische Färbungen von Nierenbiopsiematerialien haben gezeigt, dass IP-10 bei akuter Abstoßung von renalen Tubuluszellen, angrenzenden interstitiellen Zellen und infiltrierten Monozyten produziert wird und unter diesen Bedingungen im Urinsediment signifikant mehr Kopien von IP-10 spezifischer mRNA vorliegen als bei Patienten mit stabiler Transplantatfunktion (Tatapudi *et al.*, 2004).

Makrophagen Inflammatorische Protein 1alpha (MIP-1 α)

MIP-1 α (CC-Chemokin) wird von LPS-aktivierten Monozyten exprimiert, stimuliert deren Proliferation und induziert die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF, IL-1 α und IL-6 (Davatelis *et al.*, 1988; Fahey *et al.*, 1992). MIP-1 α wird außerdem von Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen, Fibroblasten sowie von Mesangiumzellen produziert. Neben Monozyten wirkt es auch auf T-Zellen, NK-Zellen und einige Granulozyten chemotaktisch. Das Chemokin bewirkt durch die Induktion von Zelladhäsionsproteinen die endotheliale Adhäsion und Extravasation dieser Leukozyten und spielt somit eine große Rolle bei der Rekrutierung von Entzündungszellen (Schlöndorff *et al.*, 1997).

1.5.4 Apoptosemarker

Lösliches Fibroblasten assoziiertes Protein und sein löslicher Ligand (sFas und sFasL)

Fas ist ein Transmembranprotein der TNF-Rezeptorfamilie. Die Aktivierung durch seinen Liganden (FasL) führt zum programmierten Zelltod – der Apoptose (**Abbildung 2**). Das Adapterprotein FADD (Fas assoziiertes Protein mit einer Todesdomäne) lagert sich mit seiner Todesdomäne an die zytoplasmatisch gelegenen Todesdomänen von Fas und setzt dadurch eine Signalkaskade in Gang. Sog. Caspasen (Cysteiny-Aspartasen) werden aktiviert, die wiederum zu einer Aktivierung von Endonukleasen (CAD in Abbildung 2), zu einer Veränderung der Zelloberfläche sowie zu einer Umstrukturierung des Zytoskeletts führen, was schließlich den Zelltod zur Folge hat.

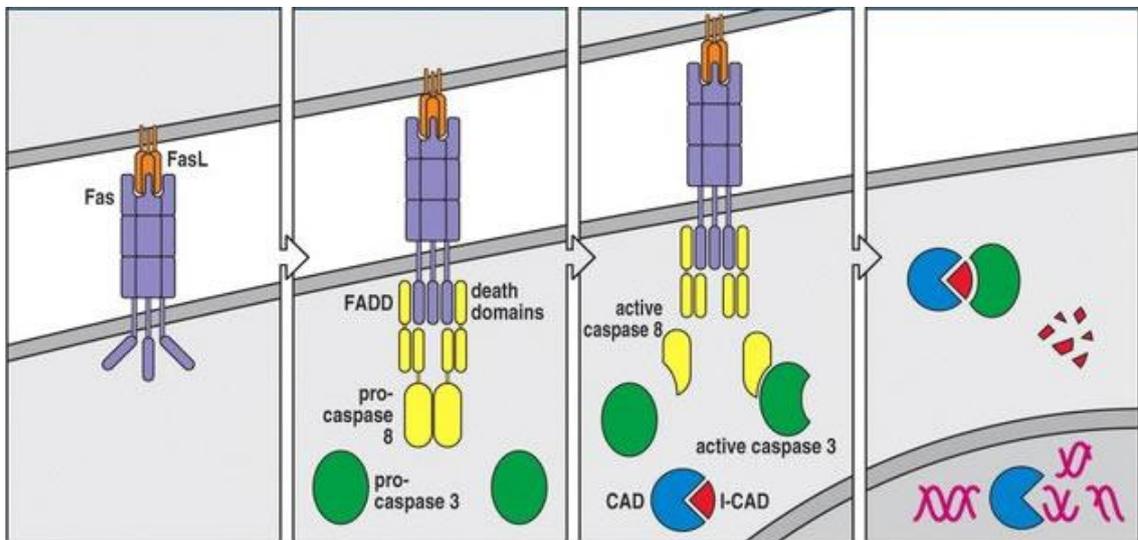


Abbildung 2: Ablauf der Apoptose vermittelt durch die Interaktion von Fas-FasL
(entnommen aus Janeway et al., 2001)

In-vitro-Experimente konnten Fas zusätzlich eine T-Zell-aktivierende und proliferationsfördernde Funktion zuschreiben (Alderson *et al.*, 1993). Fas wird von verschiedenen Epithelzellen in unterschiedlichen Organen exprimiert. Im Nierentransplantat wird das Protein zum einen von residenten Nierenzellen (Tubuluszellen und glomerulären Mesangiumzellen) und zum anderen von den infiltrierenden Leukozyten gebildet. Immunhistochemische Studien konnten hingegen Fas-Liganden in der Niere nur in eingewanderten mononukleären Zellen detektieren (Matsuno *et al.*, 1998). Die Expression kann durch LPS, IL-1 β , IFN- γ und TNF- α gesteigert werden (Ortiz-Ardun *et al.*, 1996). Von beiden Proteinen existiert jeweils durch Abspaltung der extrazellulären Domäne eine lösliche Form. Der lösliche FasL liegt als Homotrimer von jeweils 26 kDa vor und behält seine zytotoxische Funktion (Tanaka *et al.*, 1995).

1.5.5 Adhäsionsmoleküle

Endothel-Selectin (E-Selectin)

E-Selectin gehört zu der Familie der Ca^{2+} -abhängigen Lectine und funktioniert als Rezeptor für Leukozyten myeloischen Ursprunges. Es wird von Zytokin-aktivierten Endothelzellen exprimiert und bindet an Kohlenhydratstrukturen auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten und bewirkt deren partielle Adhärenz auf der Endotheloberfläche (Bevilacqua und Nelson, 1993). Dieser Schritt ist Voraussetzung für die Adhäsion und Invasion von Leukozyten, die von ICAM und VCAM vermittelt wird (**Abbildung 3**).

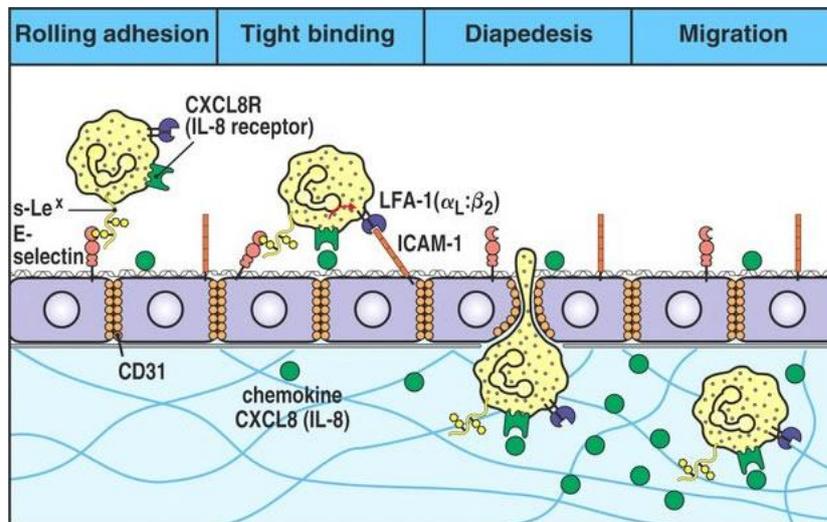


Abbildung 3: Interaktion zwischen Leukozyten und Endothel vermittelt durch E-Selectin und ICAM (entnommen aus Janeway *et al.*, 2001)

Lösliches Interzelluläres und Vaskuläres Adhäsionsmolekül (sICAM-1 und sVCAM-1)

ICAM-1 ist ein transmembranöses Glykoprotein der Immunglobulin Superfamilie (Rothlein *et al.*, 1986), welches sowohl von Makrophagen und Lymphozyten als auch von Gefäßendothelzellen verschiedener Gewebe gebildet wird. Es wurde *in-vitro* gezeigt, dass sich die Expression durch Stimulation mit den Zytokinen IL-1 und $\text{INF-}\gamma$ erhöht (Dustin *et al.*, 1986). ICAM-1 dient als Ligand für LFA-1 (Leukozytenfunktions-assoziiertes Antigen-1) und Mac-1 (Makrophagen-Antigen-1), die sich u.a. auf Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten befinden. Die Interaktion vereinfacht die Adhäsion und Migration von Leukozyten am bzw. durch das Endothel (Smith *et al.*, 1989). Die Entstehung der löslichen Form ist noch nicht abschließend geklärt. Bisher sind zwei Mechanismen nachgewiesen worden: (i) Spaltung des membrangebundenen ICAMs durch Metalloproteinasen (Lyons *et al.*, 1998) und (ii) Vorhandensein einer sICAM-1-spezifischen mRNA (Wakatsuki *et al.*, 1995). Die Bedeutung der löslichen

Form bleibt allerdings unklar. So beschreiben Rieckmann und Mitarbeiter (1995) die Hemmung der Lymphozytenadhäsion durch sICAM-1 als möglichen therapeutischen Ansatz für Erkrankungen des zentralen Nervensystems. Andere Forschungsgruppen fanden heraus, dass erhöhte sICAM-Serumspiegel als Marker für eine erhöhte Produktion von membrangebundenem ICAM dienen (Labarrere *et al.*, 2000). Immunhistochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass ICAM-1 bei gesunden Nieren von Gefäßendothel exprimiert wird. Bei akuten Abstoßungen nach NTX kann es als Folge von Regenerationsmechanismen allerdings zu einer *de novo* Synthese in den Zellen der renalen Tubuli kommen (Brockmeyer *et al.*, 1993). Die *de novo* Synthese korreliert mit der Schwere der Abstoßung (Chan *et al.*, 1993).

VCAM-1 ist ein membrangebundenes Protein der Immunglobulin-Supergenfamilie. Die lösliche Form entsteht durch Abspaltung des membrangebundenen Proteins mittels Metalloproteasen (Leca *et al.*, 1995). Es wird von Zytokinaktivierten (IL-1 und TNF- α) humanen Endothelzellen gebildet (Osborn *et al.*, 1989). Extravaskulär wird VCAM zusätzlich von Epithelzellen, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert (Rice *et al.*, 1991). Durch Kopplung an seinen Rezeptor/Ligand VLA-4 (*very late antigen-4*) (Elices *et al.*, 1990) auf Lymphozyten und Monozyten kommt es zur Adhäsion dieser Leukozyten am Endothel. Neutrophile Granulozyten hingegen adhären nicht (Rice *et al.*, 1990). Darüber hinaus unterstützen sowohl ICAM-1 als auch VCAM-1 die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen (Damle *et al.*, 1992). In der Niere wird VCAM-1 von Epithelzellen der Bowman-Kapsel sowie von wenigen proximalen Tubuluszellen gebildet. Im Falle einer Abstoßung kommt es zu einer vermehrten Expression, die auch in den distalen Tubuli aufzufinden ist (Brockmeyer *et al.*, 1993).

1.5.6 Weitere Biomarker

Gesamter Plasminogen Aktivator-Inhibitor 1 (tPAI-1)

Das Glykoprotein PAI-1 aus der Familie der Serinprotease-Inhibitoren wurde erstmals 1981 von Loskutoff und Edgington (1981) charakterisiert. Der gesamte PAI-1 umfasst sowohl den Urokinase-PAI-1 als auch den Gewebe-PAI-1. PAI-1 wird vor allem von Gefäßendothelzellen, aber auch von viszeralen Adipozyten (Morange *et al.*, 1999) gebildet. Neben seiner Aufgabe als Hämostaseregulator durch Inhibition der Fibrinolyse spielt PAI-1 in vielen (patho)physiologischen Prozessen eine Rolle: Wundheilung, Atherosklerose, Tumorangio-genese, Lungenfibrose und rheumatoide Arthritis. Während eines septischen Geschehens agiert er zudem als Akut-Phase-Protein (Levi *et al.*, 2003). Zusätzlich haben *in-vitro*-Experimente gezeigt, dass PAI-1 an der Hemmung der Zellmigration beteiligt ist. So konkurriert es mit den Integrinen der migrierenden Zellen um die Bindung an Vitronectin, ein Protein der extrazellulären Matrix (Kjoller *et al.*,

1997). Im gesunden Zustand wird in der Niere kein PAI-1 (Revelo *et al.*, 2005) bzw. nur geringe Mengen von PAI-1 exprimiert, wohingegen im Nierenzellkarzinom eine erhöhte Expression gemessen werden konnte (Span *et al.*, 2008).

Myeloperoxidase (MPO)

MPO ist ein Hämprotein, welches von neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert werden kann. Mit Hilfe der Myeloperoxidase entsteht aus Wasserstoffperoxid und Chloridionen die toxisch wirkende Hypochlorsäure. Diese bewirkt die Vernichtung von phagozytierten Mikroorganismen in neutrophilen Granulozyten und Monozyten. Die MPO kann allerdings auch in den extrazellulären Raum abgegeben werden, wo sie zu einem oxidativen Schaden des umliegenden Gewebes führt (Klebanoff, 2005). MPO gilt als Marker für die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und kann zur Differenzierung von Harnwegsinfekten herangezogen werden, da diese Patienten erhöhte MPO-Spiegel im Urin aufweisen (Steinhoff *et al.*, 1997).

Soluble Cluster of Differentiation 30 (sCD30)

Das Transmembranprotein CD30 gehört zu der TNF-R-Superfamilie. Es wurde zuerst auf der Oberfläche von Reed-Sternberg Zellen eines Hodgkin Lymphoms entdeckt (Schwab *et al.*, 1982). Seine lösliche Form besteht aus der extrazellulären Domäne, die durch die Metalloproteinase TACE (TNF- α converting enzyme) abgespalten wird (Hansen *et al.*, 2000). CD30 wird überwiegend von immunologischen Zellen exprimiert, vor allem von aktivierten CD45RO T_H2-Zellen (Ellis *et al.*, 1993), B-Zellen (Shanebeck *et al.*, 1995), NK-Zellen (Cambiaggi *et al.*, 1993) sowie dendritischen Zellen (Pellegrini *et al.*, 2005). Die Interaktion des Zytokins mit seinem Liganden (CD30L) vermittelt Proliferation, Differenzierung und Apoptose dieser Zellen (Gruss *et al.*, 1994). Das Transmembranprotein gilt als T_H2-Zell-spezifischer Marker, da eine erhöhte CD30 Expression auf CD4+ T-Zellen dazu führt, dass vermehrt T_H2-Zytokine synthetisiert werden (Stanciu *et al.*, 2001). Durch seine lösliche Form gilt CD30 im Serum als guter Marker für eine Immunantwort, die durch unterschiedliche Erkrankungen, z.B. durch eine akute Rejektion, hervorgerufen werden kann. In diesem Zusammenhang sind Untersuchungen zu nennen, die zeigen, dass die Serumkonzentration von sCD30 am 5. Tag nach Transplantation (post-TX) mit dem Auftreten einer akuten Abstoßung korreliert (Dong *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007).

2 Zielstellung

Akute Abstoßungsepisoden sind häufige Komplikationen nach Nierentransplantation, die zum Verlust des Organs führen können. Zur Diagnose wird heute noch immer die komplikationsreiche Transplantatbiopsie als Goldstandard durchgeführt.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, eine routinetaugliche, nicht-invasive Multiparameteranalyse zu etablieren, die es ermöglicht, verschiedene rejektionsrelevante immunologische Faktoren zu messen, um akute Rejektionen frühzeitig und zuverlässig zu erkennen. Ferner soll mit dem ausgewählten immunologischen Parameterpanel die Möglichkeit geschaffen werden, Rejektionsgruppen (Steroid-sensitiv und Steroid-resistent) zu differenzieren und die Risikopatienten für eine Steroid-resistente Abstoßung zu definieren, damit die Rejektionstherapie individuell angepasst werden kann. Als Kontrolle dienen sowohl Patienten mit einem Harnwegsinfekt als auch gesunde Probanden.

Um einem nicht-invasiven Verfahren gerecht zu werden, sollen die Biomarkerkonzentrationen im Urin analysiert werden.

Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Welche Biomarker sind im Urin mit Hilfe von Luminex™-Multiplexassays messbar?
2. Welche Biomarker können eine akute Rejektion anzeigen bzw. sogar voraus-sagen?
3. Welche Biomarker differenzieren die Steroid-sensitive von der der Steroid-resistenten Rejektion?
4. Welche Biomarker sind im Urin von Gesunden und von Patienten mit einem Harnwegsinfekt messbar und beeinflussen eventuell die Aussagekraft potentieller Rejektionsmarker?
5. Ist es möglich Grenzwerte zu berechnen?
6. Wie verhalten sich die Biomarkerkonzentrationen im postoperativen Verlauf?

3 Material und Methoden

3.1 Patienten

3.1.1 Transplantierte Patientengruppen

Von Oktober 2006 bis März 2008 wurden 105 Patienten im Nierentransplantationszentrum des Universitätsklinikums Halle (Saale) transplantiert. Davon wurden 54 Patienten für unsere Messungen berücksichtigt. Aufnahme- und Einschlusskriterien waren:

- Beginn der Sammlung spätestens am 2. postoperativen Tag
- fast durchgehende Probenreihe während des gesamten ersten Krankenhausaufenthaltes (drei Lücken zu je einem Tag waren zulässig innerhalb der ersten 14 Tage)
- retrospektiv eindeutige klinische bzw. laborchemische Hinweise auf das Vorliegen einer stabilen Transplantatfunktion bzw. einer Abstoßungsepisode

Der klinischen und laborchemischen Diagnostik kommt eine besondere Bedeutung zu, da im Nierentransplantationszentrum Halle zur Diagnosefindung nur ausnahmsweise eine Biopsie durchgeführt wurde. In diesem Zusammenhang waren folgende Faktoren relevant für die Diagnose „akute Abstoßungsepisode“: Rückgang der Diurese, sog. Anprallechos in der Nierendopplersonographie, Abfall der glomerulären Filtrationsrate, Anstieg der Retentionsparameter (Kreatinin, Harnstoff) im Serum, Anstieg des C-reaktives Proteins (CRP) im Urin bei nur moderatem Anstieg des CRP im Serum. Zusätzlich wurden bei allen Patienten noch weitere Parameter im Serum und Urin mehrfach die Woche gemessen, um Differentialdiagnosen auszuschließen: IL-6 und IL-8 im Urin sowie IL-2R und beta-2-Mikroglobulin im Serum. Der Abfall der Retentionsparameter nach Rejektionstherapie galt als Bestätigung der gestellten Diagnose.

Bildung der drei transplantierten Patientengruppen

Anhand der klinischen Daten wurden die Patienten retrospektiv in folgende drei Gruppen eingeteilt:

1. SGF (*stable graft function*): Patienten mit einer stabilen Transplantatfunktion
2. SSAR (*steroid-sensitive acute rejection*): Patienten mit einer auf Steroide therapeutisch ansprechenden Abstoßungsepisode
3. SRAR (*steroid-resistant acute rejection*): Patienten mit einer Steroid-resistenten Abstoßungsepisode

Die immunsuppressive Standardmedikation im Nierentransplantationszentrum Halle bestand zum Zeitpunkt dieser Studie aus Urbason® (Methylprednisolon), Cell-

Cept® (Mycophenolatmofetil) und Prograf® bzw. Advagraf® (Tacrolimus). Bei sog. Risikopatienten (hohe Anzahl von HLA-Mismatches, Zweittransplantation oder PRA [*Panel Reactive Antibodies*] > 20 %) wurde zusätzlich ein polyklonaler Antikörper (Thymoglobulin® oder ATG®) hinzugegeben oder die Steroid-Initialdosis von 500 mg über fünf Tage beibehalten. Bei Nicht-Risikopatienten wurde nach 500 mg Urbason® perioperativ und 125 mg am ersten postoperativen Tag die Steroiddosis in der ersten postoperativen Periode auf 20 mg reduziert. Eine durch klinische und laborchemische Parameter diagnostizierte Abstoßungsepisode wurde mit einer Urbasonstoßtherapie von 500 mg für fünf Tage behandelt. Sanken daraufhin die Retentionswerte und stieg die glomeruläre Filtrationsrate, wurde die Therapie als erfolgreich angesehen. Diese Abstoßungsepisode wurde als „Steroid-sensitiv“ deklariert. Blieb eine Verbesserung der laborchemischen Parameter nach Urbasonstoßtherapie aus, wurde mit einem polyklonalen Antikörper weitertherapiert. Diese Rejektionsepisode wurde als „Steroid-resistent“ bezeichnet.

Demographische Daten

In **Tabelle 2** sind alle erhobenen demographische, transplantatrelevante sowie klinische Daten für alle drei Transplantationsgruppen aufgelistet und den beiden Kontrollgruppen gegenübergestellt.

Unter allen Transplantatempfängern waren 20 weibliche und 34 männliche Patienten, deren mittleres Alter bei 52,4 Jahren (SD = 13,5; min-max = 22-73 Jahre) lag. Mit 31,5% (n = 17) war die chronische Glomerulonephritis die häufigste Erkrankung, die zur terminalen Niereninsuffizienz führte. Bei 20% der Patienten fand sich eine polyzystische Nephropathie als Grunderkrankung. Jeweils 13% zeigten eine chronische Pyelonephritis und eine hypertensive Nephropathie. 6 % litten an einer diabetischen Nephropathie. Ein Patient verzeichnete eine renale Mitbeteiligung unter der Autoimmunerkrankung Lupus erythematodes. Der Rest der Patienten (15%) litt an terminaler Niereninsuffizienz unklarer Genese. Alle Patienten wurden während ihres gesamten ersten Krankenhausaufenthaltes nach Transplantation berücksichtigt. Die durchschnittliche Verweildauer betrug 22 Tage (SD = 12; min-max = 11-90). 49 Patienten wurden zum ersten Mal transplantiert, 5 erhielten ihr zweites Nierentransplantat. Das Vorhandensein von lymphozytotoxischen Antikörpern, die durch Präsensibilisierung nach Schwangerschaft, Bluttransfusion oder vorheriger Transplantation entstehen können, wird als prozentualer PRA-Wert angegeben. Dieser spielte im vorliegenden Patientengut nur eine sehr untergeordnete Rolle. Lediglich zwei Patienten aus der SGF-Gruppe zeigten 25 bzw. 50% positive Reaktionen gegenüber dem getesteten Antigenpanel bei Inkubation des Patientenserums mit ausgewählten Testlymphozyten.

Transplantatdaten

Insgesamt wurden 40 postmortale Spenden und 14 Lebendspenden durchgeführt. Vier Patienten bekamen eine sog. „full house“-Niere, d.h. dass es in allen drei als transplantationsrelevant geltenden HLA-Antigenen (A, B, DR) eine Übereinstimmung der jeweils kodominant vererbten Merkmale gab. 2 Patienten wiesen je ein Mismatch, 30 Patienten zwei bis drei und 18 Patienten fünf bis zu sechs Mismatches auf. Die kalte Ischämiezeit gilt allgemein als ein vom Status des Alloantigens unabhängiger Risikofaktor für eine verzögerte Funktionsaufnahme und korreliert damit indirekt mit kürzeren Langzeitfunktionsraten des Transplantates. Sie betrug im Mittel über alle Patienten mit postmortaler Spende $10,4 \pm 5,3$ Stunden, bei den Lebendspenden $0,5 \pm 0,4$ Stunden. Der CMV-Status von Empfänger und Spender ist entscheidend für die Notwendigkeit einer Prophylaxe bzw. Metaphylaxe. Wenn der Spender CMV-positiv und der Empfänger negativ war, wurde prophylaktisch Ganciclovir verabreicht. Die Empfänger, die jeweils CMV-positiv waren (Spender neg. bzw. pos.), bekamen bei einer CMV-Symptomatik oder Gabe eines polyklonalen Antikörpers Ganciclovir als Therapie bzw. Metaphylaxe.

Klinische Daten

36 Patienten mussten wegen einer akuten Abstoßungsepisode während ihres Aufenthaltes im Krankenhaus therapiert werden. Davon war bei 23 Patienten eine Steroid-sensitive und bei 13 Patienten eine Steroid-resistente Abstoßung zu verzeichnen. Bei Betrachtung aller Rejektionen fanden sie im Mittel an Tag 6 (SD = 4,6) post-TX statt. Insgesamt mussten 22 Patienten mehr als einmal innerhalb der ersten post-TX Woche dialysiert werden und wiesen damit *per definitionem* eine verzögerte Transplantatfunktion auf. Ein symptomatischer bzw. asymptomatischer Harnwegsinfekt wurde bei sieben Patienten diagnostiziert und wurde unter Berücksichtigung der Antibiotikaresistenzen therapiert. Sieben Patienten erlitten eine CMV-Reaktivierung.

3.1.2 Kontrollgruppen

Es wurden zwei Kontrollgruppen mit jeweils 14 Urinproben erstellt. Die erste Kontrollgruppe bestand aus 14 Patienten einer Allgemeinarztpraxis, bei denen ein Harnwegsinfekt (HWI) diagnostiziert worden war. Es wurden nur Patienten eingeschlossen, die keine bekannten nephrologischen Erkrankungen hatten. Die Patienten kamen unbehandelt mit klinischen Beschwerden wie Dysurie und Pollakisurie. Mittels eines Urinstix (Bayer) wurde eine erhöhte Leukozytenzahl (circa 500 pro μl) im Urin festgestellt und damit die Diagnose verifiziert. Jeweils 10 ml der abgegebenen Urinproben wurden mit Zustimmung der Patienten zur Messung in das HLA-Labor gebracht.

Die zweite Kontrollgruppe umfasste 14 gesunde Probanden, bei denen mittels des oben aufgeführten Schnelltests ein Harnwegsinfekt ausgeschlossen werden konn-

te. Das durchschnittliche Alter der kranken Kontrollgruppe betrug 45 Jahre (SD = 20; min-max = 18-82) im Vergleich zu einem mittleren Alter von 35 Jahren (SD = 16; min-max = 9-75) in der gesunden Kontrollgruppe. Aufgrund der anatomischen Gegebenheiten erkrankten Frauen wesentlich häufiger an einem Harnwegsinfekt, was die 100% Frauen in der kranken Kontrollgruppe erklärt. Die gesunde Kontrollgruppe bestand dagegen aus fünf männlichen und neun weiblichen Probanden.

3.1.3 Sammeln der Patientenproben

Täglich wurden vom Pflegepersonal 10 ml Morgenurin von allen oben aufgeführten transplantierten Patienten in Urin-Monovetten abgefüllt und bei 5°C kühl gelagert. Gesammelt wurde über den gesamten Zeitraum des Krankenhausaufenthaltes nach der Transplantation. Die Proben wurden zweimal wöchentlich in das HLA-Labor gebracht und dort bis zur Messung bei -22°C eingefroren. Die Analysen erfolgten dabei immer nach Abschluss der kompletten Sammlung aller Proben eines Patienten. Insgesamt wurden auf diese Weise 706 Proben gemessen, also je Patient durchschnittlich 13 Proben. Die Proben der Kontrollgruppen wurden gleichermaßen behandelt, wobei die Patienten mit Harnwegsinfekt jeweils nur eine Urinprobe zur Verfügung stellten. Diese wurde am Tag des Arztbesuches gewonnen, der im Durchschnitt am 2. Tag der Beschwerden stattfand. Die Proben beider Kontrollgruppen wurden solange eingefroren, bis die jeweilige Kontrollgruppe 14 Proben umfasste.

Die Probenentnahme und –sammlung geschah mit Einverständnis der Patienten nachdem ein entsprechender Ethikantrag von der Ethikkommission am 12.01.2006 genehmigt worden war.

Tabelle 2: Eigenschaften der fünf Patientengruppen (Gesund, HWI, SGF, SSAR und SRAR)

	Gesund	HWI	SGF	SSAR	SRAR
Anzahl	14	14	18	23	13
Geschlecht					
Männlich	5 (35,7%)	0	13 (72,2%)	16 (69,6%)	5 (38,5%)
Weiblich	9 (64,3%)	14 (100%)	5 (27,8%)	7 (30,4%)	8 (61,5%)
Alter	34,9±16,1	45±20	53,7±12,7	55,4±12,6	45,2±14,2
<i>MW±SD (min-max)</i>	(9-75)	(18-82)	(29-70)	(28-73)	(22-65)
Ursache der term. NI					
Glomerulopathie, <i>n (%)</i>			3 (16,7%)	8 (34,7%)	6 (46,1%)
Zystennieren, <i>n (%)</i>			6 (33,3%)	1 (4,4%)	4 (30,8%)
Pyelonephritis, <i>n (%)</i>			2 (11,1%)	4 (17,4%)	1 (7,7%)
Hypertensive Nephropathie, <i>n (%)</i>			1 (5,6%)	5 (21,7%)	1 (7,7%)
Diabetische Nephropathie, <i>n (%)</i>			2 (11,1%)	1 (4,4%)	0
Nephropathie bei LE, <i>n (%)</i>			1 (5,6%)	0	0
unbekannt, <i>n (%)</i>			3 (16,7%)	4 (17,4%)	1 (7,7%)
Dauer des KH-Aufenthalts			20,4±17,7	20,6±7,9	27,7±7,8
<i>MW±SD (min-max)</i>			(11-90)	(13-41)	(16-40)
Anzahl der TX					
erste TX, <i>n (%)</i>			16 (88,9%)	21 (91,3%)	12 (92,3%)
zweite TX, <i>n (%)</i>			2 (11,1%)	2 (8,7%)	1 (7,7%)
PRA					
0-10%, <i>n (%)</i>			16 (88,8%)	23 (100%)	13 (100%)
10-49%, <i>n (%)</i>			1 (5,6%)	0	0
50-100%, <i>n (%)</i>			1 (5,6%)	0	0
Art der Spende					
postmortale Spende, <i>n (%)</i>			16 (88,9%)	17 (73,9%)	7 (53,8%)
Lebendspende, <i>n (%)</i>			2 (11,1%)	6 (26,1%)	6 (46,2%)
HLA-Mismatch					
0, <i>n (%)</i>			2 (11,1%)	1 (4,4%)	1 (7,7%)
1, <i>n (%)</i>			1 (5,6%)	1 (4,4%)	0
2-3, <i>n (%)</i>			8 (44,4%)	12 (52,1%)	10 (76,9%)
4-5, <i>n (%)</i>			7 (38,9%)	9 (39,1%)	2 (15,4%)
CMV-Status (Spender/Empfänger)					
neg/neg, <i>n (%)</i>			7 (38,9%)	6 (26,1%)	3 (23,1%)
neg/pos, <i>n (%)</i>			1 (5,6%)	8 (34,8%)	4 (30,7%)
pos/neg, <i>n (%)</i>			2 (11,1%)	4 (17,4%)	3 (23,1%)
pos/pos, <i>n (%)</i>			8 (44,4%)	5 (21,7%)	3 (23,1%)
Rejektionstag				6,5±4,3	6,3±5,1
<i>MW±SD (min-max)</i>			-	(2-18)	(2-19)
DGF, <i>n (%)</i>			3 (16,7%)	8 (34,8%)	11 (84,6%)
Harnwegsinfekt, <i>n (%)</i>	0	14 (100%)	4 (22,2%)	4 (17,4%)	4 (30,8%)
CMV-Reaktivierung, <i>n (%)</i>			0	2 (8,7%)	5 (38,5%)

CMV: Cytomegalievirus; DGF: verzögerte Funktionsaufnahme; HWI: Harnwegsinfekt; KH: Krankenhaus; LE: Lupus erythematoses; MW: Mittelwert; term. NI: terminale Niereninsuffizienz; PRA: Panel Reaktive Antikörper; SD: Standardabweichung

3.2 Material

3.2.1 Komplettsysteme/Kits

sCD 30 ELISA Kit (Biotest, Dreieich, Deutschland)

Mikrotiterplatte (beschichtet mit murinem monoklonalem Antikörper gegen humanes sCD30)
Peroxidase-konjugierter monoklonaler anti-sCD30 Antikörper aus der Maus
Lyophilisiertes sCD30 als Standardkurve
Waschpufferkonzentrat, 20 x PBS mit 1% Tween 20
Substrat-Lösung (Tetramethylbenzidin)
Stopp-Lösung (1M Phosphorsäure)
Abdeckplatten (adhäsiv)

LINCplex Kits (LincoResearch, St.Charles, Missouri, USA, Distributor in Deutschland: Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland)

- Human Cardiovascular Disease Panel 1 (Cat. HCVD1-67AK)
- Human Sepsis/Apoptosis (Cat. HSEP-63K)
- Human Cytokine (Cat. HCYTO-60K)

Human Cardiovascular Disease Panel 1 Standards und Kontrollen
Human Sepsis Standards und Kontrollen
Human Cytokine/Chemokine Standards und Kontrollen
23 Antikörper-immobilisierte Beads (**Tabelle 3**)
Detektionsantikörper
Streptavidin-Phycoerythrin
Bead-Verdünner
Waschpuffer (1:10 Verdünnung): 10 mM PBS; 0,05% Proclin; 0,05% Tween-20;
pH 7,4)
Assaypuffer
96-well Mikrotiter-Filterplatte
Abdeckfolie
Mixflasche
Luminex Mantelflüssigkeit

Tabelle 3: Übersicht der gemessenen Parameter mit Nachweisbereich

Human sVCAM-1	0,08-250 ng/ml	Human IL-7	3,2-10000 pg/ml
Human sICAM-1	0,08-250 ng/ml	Human IL-8	3,2-10000 pg/ml
sFas	12,2-50000 pg/ml	Human IL-10	3,2-10000 pg/ml
Human sFasL	12,2-50000 pg/ml	Human IL-13	3,2-10000 pg/ml
Human MIF	12,2-50000 pg/ml	Human IL-15	3,2-10000 pg/ml
Human tPAI-1	12,2-50000 pg/ml	Human IL-17	3,2-10000 pg/ml
sE-Selectin	0,08-250 ng/ml	Human IL-1 α	3,2-10000 pg/ml
MPO	16- 50000 pg/ml	Human IFN- γ	3,2-10000 pg/ml
Human IL-1 β	3,2-10000 pg/ml	Human TNF- α	3,2-10000 pg/ml
Human IL-2	3,2-10000 pg/ml	Human MIP-1 α	3,2-10000 pg/ml
Human IL-1ra	3,2-10000 pg/ml	Human IP-10	3,2-10000 pg/ml
Human IL-6	3,2-10000 pg/ml		

3.2.2 Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Reagenzien

LiquiChip™ Calibration Bead Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
LiquiChip™ Control Bead Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
LiquiChip™ System Fluid	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
2-Propanol	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Aqua dest.	
Tris	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure/ HCL	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland

Verbrauchsmaterialien

Pipetten 10-100 μ l, 100-1000 μ l	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Standardspitzen für Pipetten	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Multikanalpipette mit Abwurfspitzen	Brand GmbH und Co, Wertheim, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Urin-Monovette	Sarstedt Aktiengesellschaft und Co, Nürnbrecht, Deutschland
pH-Indikatorstäbchen pH-Fix: 0-14 und 7,0-14,0	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe , Deutschland
Multistix® 10 SG	Bayer, Leverkusen, Deutschland

Geräte

Kühlschrank 5°C	Liebherr GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Gefrierschrank -22°C	Liebherr GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Vortexer	Carl Stuart Limited, Dublin, Irland
Ultraschallreinigungsgerät Branson 200	Kell-Strom, Wethersfield, Connecticut USA
Plattenschüttler	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Vakuumpumpe	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Luminex100™	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ELISA Reader – MRX II	Dynex Technologies GmbH, Berlin, Deutschland

3.3 Methoden

3.3.1 ELISA zur Quantifizierung von sCD30

Prinzip

Dieser ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) dient der Quantifizierung von löslichem CD30. Dazu wird durch den Hersteller ein monoklonaler Fangantikörper gegen das nachzuweisende Protein auf der Polystyroloberfläche einer 96-Napf-Mikrotiterplatte immobilisiert. Gleichzeitig bindet ein weiterer mit Peroxidase konjugierter monoklonaler anti-sCD30 Detektionsantikörper an das durch den Fangantikörper gebundene sCD30 (**Abbildung 4**). Durch Waschen wird ungebundener Detektionsantikörper entfernt. Nach Zugabe der Substrat-Lösung (Tetramethylbenzidin) wird die Farbänderung photometrisch erfasst, die direkt proportional zu der von den Antikörpern gebundenen Antigenmenge ist.

Durchführung

Das vom Hersteller Biotest (Dreieich, Deutschland) erworbene sCD30-Kit enthält Mikrotiterplatten, die mit dem monoklonalen Antikörper gegen humanes sCD30 beschichtet sind und den Peroxidase-konjugierten Detektionsantikörper in lyophilisierter Form bereits enthalten. Die ersten zwei Reihen der 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden für die Erstellung der als Lyophilisate mitgelieferten Standardreihen genutzt. Diese mussten lediglich mit destilliertem Wasser gelöst werden. In die verbliebenen Vertiefungen wurden jeweils 150 µl Probenmaterial in jeweils drei verschiedenen Verdünnungen (1:2, 1:3 und 1:6) pipettiert. Die Mikrotiterplatte musste nun drei Stunden bei Raumtempera-

tur auf dem Schüttler inkubieren. Sie wurde anschließend gut ausgeklopft und dreimal mit PBS/Tween gewaschen. Als Substratlösung wurden 100 µl Tetramethylbenzidin zugefügt, gefolgt von einer weiteren Inkubation auf dem Schüttler für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Das Enzym Peroxidase sorgte für einen blauen Farbumschlag des Substrates Tetramethylbenzidin. Um die Enzymreaktion zu beenden wurde als Stopp-Lösung 100 µl 1 M Phosphorsäure zugegeben. Im Spektrophotometer konnte nun die Absorption jeder einzelnen Vertiefung bestimmt werden.

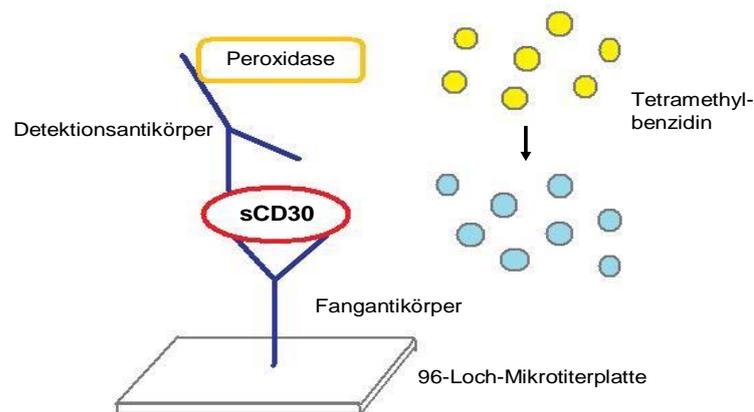


Abbildung 4: Schematische Darstellung, die den Aufbau des sCD30 ELISA zeigt.

Auswertung

Die Rohdaten wurden mit der Software Revelation 4.02 (Dynex Technologies) verarbeitet. Die gemessenen Absorptionen der mitgeführten Standards wurden graphisch dargestellt, so dass aus der Standardkurve nun die Berechnung der Probenkonzentrationen erfolgen konnte.

3.3.2 Luminex™ Multiplex-Assay

Prinzip

Das Multiparameter-Testsystem erlaubt die simultane Quantifizierung von bis zu einhundert verschiedenen analytischen Parametern in einer einzigen Probe. Grundlagen dieser Technologie sind mikroskopisch kleine sphärische Polystyrolpartikel, sog. Mikrosphären oder Mikrobeads. Die Mikrosphären sind mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die Licht im roten und infraroten Wellenlängenbereich emittieren. Die Kombination dieser beiden Farbstoffe in jeweils zehn verschiedenen Konzentrationsstufen führt zu einhundert spektral unterscheidbaren Schattierungen zwischen Rot und Infrarot. Die daraus resultierenden unterschiedlichen Wellenlängen

definieren unterschiedliche Gruppen von Mikrosphären. Jede Gruppe repräsentiert somit die Quantifizierung eines definierten Einzelparameters.

Die Bindung der Analyten an die Mikrosphären erfolgt in diesem Testkit über eine Antigen-Antikörper Reaktion, weil die Beads mit entsprechenden monoklonalen Antikörpern besetzt sind. In einem weiteren Inkubationsschritt bindet ein zweiter Antikörper den Analyten. Dieser ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin gekoppelt, der im Wellenlängenbereich des grünen Lichtes emittiert (532nm) und als sog. Detektionsmolekül die Quantifizierung des jeweiligen Analyten ermöglicht. Die Intensität des emittierten Lichtes ist proportional zu der gebundenen Analytenmenge. Den komplexen Aufbau des Assays zeigt **Abbildung 5**.

Die Analyse und Auswertung des Bead-basierenden Assays erfolgt mit der Luminex 100™-Apparatur und der Luminex IS100 Software. Diese basiert auf der Methode der Durchflusszytometrie unter Verwendung zweier unterschiedlicher Laser. Ein Laser (633nm) dient der Klassifizierung der Mikrosphären, der andere (532nm) dem quantitativen Nachweis der gebundenen Detektionsmoleküle. Mittels einer Pumpe wird das Probenmaterial aus der Mikrotiterplatte in die Messküvette geleitet. Dabei werden die Mikrosphären mit einer Mantelflüssigkeit (Sheath Fluid) umspült, was zu ihrer Vereinzelung führt und sie einen Partikelstrahl bilden lässt. Das Licht beider Laser ist auf diesen fokussierten Partikelstrahl in der Messküvette gerichtet. Mit der Laserdiode zur Klassifizierung der Mikrosphären wird die Partikelgröße mittels Seitwärtslichtstreuung bestimmt. Somit wird verhindert, dass Bead-Aggregate oder andere fluoreszierende Verunreinigungen als Artefakte in das Ergebnis eingehen.

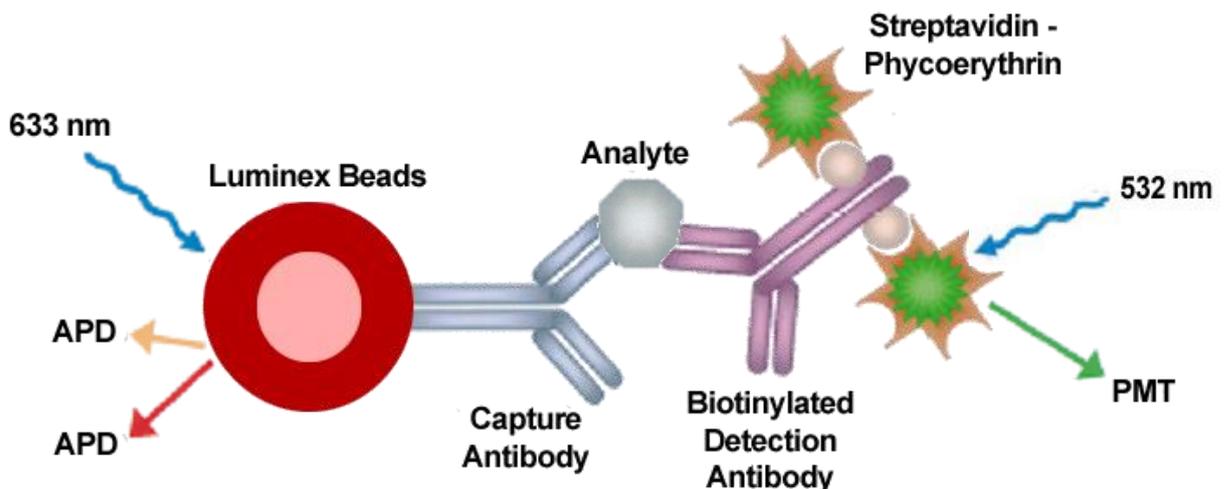


Abbildung 4: Aufbau des Luminex Multiplex-Assays

entnommen aus der Präsentation „Lincoplex Presentation Biotrend“ von Alan Tunicliff (2006)

Durchführung

Anfangs wurde die Mikrofilterplatte mit 200 µl Assaypuffer pro Vertiefung durch 10-minütiges Schütteln bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurde der Puffer durch die Vakuumfilter-Einheit am Plattenboden entfernt. 25 µl Assaypuffer wurden in jede Vertiefung gegeben. Um die Messbedingungen in der Standardreihe vergleichbar mit den Bedingungen im Testmedium Urin zu machen, wurde auf die im Kit mitgelieferte Serummatrix, die die Zusammensetzung im Serum immitieren soll, verzichtet. Anstelle dessen wurde matrixfreier Assaypuffer verwendet. Die Standards, Kontrollen und die zu bestimmenden Proben wurden nach Protokoll hinzugefügt (jeweils 25 µl). Anschließend wurde der Bead-Mix zugegeben. Es folgte eine Übernacht-Inkubation auf dem Schüttler bei 5° C. Nach zweimaliger gründlicher Waschung wurden je Vertiefung 25 µl der Detektionsantikörperlösung aufgetragen. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler wurde der Streptavidin-Phycoerythrin Komplex hinzugefügt, für weitere 30 Minuten wurde unter gleichen Bedingungen inkubiert. Im Anschluss erfolgten zwei gründliche Waschschrte und die Zugabe von Mantelflüssigkeit. Nach gründlicher Resuspension zur Verhinderung von Aggregatbildungen der Mikrosphären begann die Messung im Luminex100™ Gerät.

Auswertung

Die Messungen wurden mit der Luminex100 IS Software ausgewertet. Anhand einer 5-fach logarithmischen Funktion der entsprechenden Standardkurve wurden aus der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI wird ermittelt aus 90 Einzelmessungen) die Konzentrationen der Proben ermittelt.

3.3.3 Aufbereitung der Urinproben

Vor Beginn jeder Parameterbestimmung wurden die bei -22° C eingefrorenen Urinproben bei Raumtemperatur langsam aufgetaut. Danach erfolgte die pH-Wert Bestimmung mittels pH-Indikatorstreifen. Vorversuche (siehe 4.2.1) hatten gezeigt, dass ein zu saurer pH-Wert (<5) die Sensitivität der Messung negativ beeinflusst. Aus diesem Grund wurden in Abhängigkeit vom pH-Wert der Urinprobe Salzsäure bzw. Tris-Puffer zugegeben um einen einheitlichen pH-Wert aller Urinproben zwischen 7,0 und 8,0 zu erhalten.

3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung aller ermittelten Proteinkonzentrationen erfolgte unter Verwendung der Softwareprogramme EXCEL™ (Microsoft 2003) und SPSS™ 15 für Windows. Die analysierten Parameter wurden sowohl in den Kontrollgruppen als auch

in den Transplantationsgruppen durch Mediane und Interquartilsabstände beschrieben. Für die Patienten mit einer Abstoßung wurden die Werte am Abstoßungstag sowie einen Tag zuvor berücksichtigt, für die Patienten mit stabiler Transplantatfunktion wurden die Konzentrationen am sechsten postoperativen Tag (entspricht dem mittleren Abstoßungstag) bzw. am fünften postoperativen Tag ausgewertet.

Zum Vergleich der Konzentrationen in den Patientengruppen wurden aufgrund einer nichtvorhandenen Normalverteilung ausschließlich nicht-parametrische Tests (Mann-Whitney-U oder Kruskal-Wallis) angewendet. P-Werte $<0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. Zur Untersuchung der Trennschärfe der verschiedenen Urinmarker wurden ROC-Kurven (*receiving operating characteristics*) generiert sowie die Flächen unter der ROC-Kurve (*AUC – area under the curve*) und die dazugehörigen 95% Konfidenzintervalle kalkuliert (Park *et al.*, 2004). Die Beziehungen der prädiktiven Rejektionsmarker untereinander wurden durch Spearman's Rank Korrelationskoeffizienten dargestellt. Zusätzlich wurde der Effekt der signifikanten Urinmarker auf eine akute Abstoßungsperiode sowie auf eine Steroidresistenz durch die Berechnung von univariaten und multivariaten logistischen Regressionsmodellen geschätzt. Anschließend wurden mögliche Confounder für eine Abstoßung oder eine Steroidresistenz wie beispielsweise Geschlecht, Alter, Anzahl der Mismatches sowie Ursache der terminalen Niereninsuffizienz untersucht.

Zur Beschreibung der Präzision der Multiplex-Assays wurden Intra- und Inter-Assay Varianzen mit Hilfe von Varianzkoeffizienten analysiert. Diese berechnen sich aus dem Quotienten von Standardabweichung und Mittelwert der jeweils gemessenen Konzentrationen.

4 Ergebnisse

4.1 Bestimmung von sCD30 im Urin

In bisherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass sCD30, postoperativ im Serum gemessen, eine akute Abstoßung vorhersagen kann (Dong *et al.*, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit sollte zusätzlich der Nachweis geführt werden, ob sCD30 im Urin bei Nierentransplantierten messbar ist und gegebenenfalls akute Rejektionen anzeigt. Für initiale Messungen wurden zunächst fünf verschiedene Patienten ausgewählt. Drei davon waren den jeweiligen Transplantationsgruppen SGF, SSAR und SRAR zuzuordnen. Bei den Patienten mit Abstoßungsepisode wurde am Tag des Ereignisses sowie jeweils einen Tag davor und danach gemessen. Die Analyse des Patienten mit stabiler Transplantatfunktion wurde mit einer Urinprobe vom ersten postoperativen Tag durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Probe vom ersten postoperativen Tag eines Patienten mit einem hohen Antikörperstatus vor Transplantation (PRA-Wert: 49%) analysiert. Als Kontrolle wurde die Urinprobe eines gesunden Probanden untersucht.

Alle Einzelproben wurden in drei Verdünnungsstufen gemessen (1:2, 1:3, 1:6). Nach Ermittlung der Standardkurve durch die mitgeführten Standards, wurden die Konzentrationen im Urin aller Patienten in U/ml errechnet. Alle Konzentrationen lagen im negativen Wertebereich (zwischen -13,4 und -1,5 U/ml) mit der Ausnahme von zwei Proben, die eine sehr geringe sCD30 Konzentration von 3,0 bzw. 7,7 U/ml aufwiesen. Bereits die optische Analyse der Urinprobe zeigte eine Hämaturie, welche das Vorhandensein einer geringen Menge sCD30 als Serumprotein erklären könnte. Schlussfolgernd ist festzustellen, dass sCD30 nicht im Urin von Gesunden und Nierentransplantierten messbar war. Der Nachweis gelang allenfalls in durch Blut ten“ Urinproben und zeigte damit das Vorhandensein von Serumresten.

4.2 Methodische Analysen

4.2.1 Einfluss des pH-Wertes auf die Konzentrationsbestimmung

Vor Beginn der Messungen von Patientenproben wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Ergebnisse des Luminex™ Multiplex-Assays untersucht. Dazu wurde eine Lösung aus mehreren bekannten Interleukinen in verschiedenen Verdünnungen mit allen drei Kits gemessen. Zusätzlich wurden alle Verdünnungen mit 0,1 M Salzsäure bzw. Tris-Puffer auf drei unterschiedliche pH-Werte eingestellt: pH 4; pH 7; pH 9.

Beispielhaft sind in **Tabelle 4** die Konzentrationen von IL-15 und deren Veränderungen bei verschiedenen pH-Werten aufgetragen. Diese zeigten, dass saure pH-Werte die Messergebnisse erheblich beeinflussen können, was sich in deutlich niedri-

geren Konzentrationen als unter neutralen oder leicht basischen Bedingungen messbar, niederschlägt. Basische pH-Werte zeigten dagegen keinen Einfluss auf die Konzentrationsbestimmungen. Alle anderen Parameter, die in Bezug auf den Einfluss des pH-Wertes auf ihrer Quantifizierbarkeit untersucht wurden (MPO, sICAM-1, sVCAM-1, MIF, sFas, sFasL, tPAI-1, IFN- γ , IL-10, IL-13), verhielten sich analog, so dass alle zu messenden Urinproben initial auf einen pH-Wert von 7-8 eingestellt wurden.

Tabelle 4: Quantifizierung von IL-15 [pg/ml] in Abhängigkeit vom pH-Wert

Verdünnung	pH 4	pH 7	pH 9
Original	33,16	109,85	115,57
1:2	24,05	74,97	67,06
1:4	11,15	45,88	34,91
1:8	*	23,44	19,42
1:16	*	8,15	8,81
1:32	*	*	*
1:64	*	*	*

* unterhalb der Nachweisgrenze von 3,2 pg/ml

4.2.2 Ausschluss der Parameter, die mit dem Luminex™ Multiplex-Assay im Urin nicht nachzuweisen sind

Begonnen wurden die Messungen mit 22 Parametern, die alle in Abschnitt 3.2.1 Tabelle 3 aufgeführt sind. IP-10 wurde erst ab dem 5. Durchlauf in das zu analysierende Proteinspektrum aufgenommen. Die Parameter IL-2, -7, -13, -17, IFN- γ , E-Selectin und MPO wurden nach vier Durchläufen mit 12 Transplantationspatienten und insgesamt 156 verschiedenen Urinproben aus dem Testsystem herausgenommen, da sie in sämtlichen Messungen entweder oberhalb oder unterhalb des durch den Hersteller definierten Messbereiches lagen.

In keiner der 156 Proben konnte IL-2 detektiert werden. Die gemessenen Fluoreszenzwerte traten nie aus den Hintergrundwerten heraus. Ebenso verhielten sich die Ergebnisse der IL-7-, -13-, -17- sowie der IFN- γ -Bestimmung. Lediglich 5 der 156 Proben pro Parameter zeigten geringe nachweisbare Konzentrationen über 3,2 pg/ml – der unteren Nachweisgrenze. Auch sE-Selectin musste aus den Messungen herausgenommen werden, da insgesamt nur 40 Proben über der unteren Nachweisgrenze von 0,08 ng/ml lagen. Die Werte für MPO gingen in über 50% der Proben über den oberen Messbereich von 50.000 pg/ml hinaus. Ein Verdünnen der Proben war in diesem Multiplex-Assay grundsätzlich nicht möglich, da sonst die Konzentrationen der meisten anderen Parameter aus dem Messbereich gefallen wären.

4.2.3 Nachweisbarkeit der verbliebenen 16 Parameter

Wie bereits unter 4.2.2 dargestellt, wurden einige Parameter aus den Kits eliminiert, da sie unter den gegebenen Bedingungen im Urin dieser Patienten nicht nachweisbar waren oder permanent oberhalb des für die entsprechenden Parameter definierten Messbereiches lagen. In der folgenden **Tabelle 5** sind alle 16 in den Kits verbliebenen Parameter aufgeführt. Zusätzlich ist gezeigt, wie häufig das jeweilige Protein in den drei Patientengruppen überhaupt messbar war, also im vorgegebenen Konzentrationsbereich, verglichen mit der Gesamtanzahl der gemessenen Proben, lag. Dieser Vergleich ist beispielhaft für den Abstoßungstag in den Rejektionsgruppen bzw. für den sechsten postoperativen Tag in der SGF-Gruppe dargestellt. Diese Gegenüberstellung demonstriert die eingeschränkte Messbarkeit von sFasL, TNF- α , IL-10, IL-1 β und IL-15 im Urin mit den verwendeten Luminex™ Multiplex-Assays.

Tabelle 5: Nachweisbarkeit aller Parameter innerhalb der drei TX-Gruppen

Parameter	SGF	SSAR	SRAR	Insgesamt
IL-6	15/15	21/21	11/11	47/47
IL-8	16/16	21/21	11/11	48/48
sICAM-1	16/16	20/21	9/11	45/48
sVCAM-1	16/16	21/21	11/11	48/48
sFas	16/16	21/21	11/11	48/48
sFasL	1/16	3/21	3/11	7/48
IL-1ra	16/16	21*/21	11*/11	48/48
TNF- α	3/16	4/21	7/10	14/47
IL-10	1/16	5/21	5/11	11/48
IL-1 α	8/16	14/21	11/11	33/48
IL-1 β	1/15	4/20	4/9	9/44
IP-10	13/13	16/16	8*/8	37/37
MIF	16/16	21/21	11/11	48/48
tPAI-1	13/15	21/21	11/11	45/47
MIP-1 α	11/16	14/21	11/11	36/48
IL-15	8/16	10/21	7/11	25/48

* definiert die Parameter, deren Werte teilweise oberhalb des für den entsprechenden Parameter definierten Messbereiches des Kits lagen.

4.2.4 Intra- und Inter-Assay Varianzen

Die Präzision der verwendeten Multiplex-Assays wurde mit Hilfe von Intra- und Inter-assay Varianzen aller 16 verbliebenen, im Urin messbaren Parameter untersucht.

Zur Ermittlung der Intra-Assay Varianzen wurden jeweils zwei Proben aus der mitgelieferten Standardreihe ausgewählt und viermal aufgetragen. Da bekannt ist, dass die Abweichungen bei geringeren Werten/Konzentrationen größer sind als bei höheren,

wurden aus den Standardreihen jeweils eine Probe mit hoher und eine mit niedriger Konzentration ausgewählt. Für die Inter-Assay Varianzen wurden ebenfalls jeweils ein hoher und ein niedriger Wert der Standardreihe aus sechs verschiedenen Assays einer Charge berücksichtigt. Aus den gemessenen Konzentrationen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und daraus Varianzkoeffizienten ermittelt, die alle in **Tabelle 6** aufgeführt sind. Sie entsprechen weitgehend den vom Hersteller ermittelten Varianzen.

Tabelle 6: Intra-Assay und Inter-Assay Varianzen

Die Verdünnungen beziehen sich auf die Originalkonzentrationen der im Kit mitgelieferten Standards (für sICAM-1 und sVCAM-1 250.000 ng/ml; für tPAI-1, sFasL, sFas und MIF 50.000 pg/ml und für die übrigen Parameter 10.000 pg/ml). Da die Parameter mit zwei verschiedenen Kits gemessen wurden, sind die Verdünnungsstufen ebenfalls verschieden.

Parameter	Intra-Assay Varianz [CV%]			Inter-Assay Varianz [CV%]		
	1:512	1:2	MW CV*	1:1024	1:4	MW CV*
tPAI-1	18,9	0,5	9,7	23,6	1,5	12,5
sFasL	11,8	0,5	6,2	17,7	1,4	9,6
sFas	15,4	2,5	9,0	23,1	2,3	12,7
MIF	10,7	3,3	7,0	12,7	3,6	8,1
sICAM-1	15,2	1,0	8,1	21,5	2,7	12,1
sVCAM-1	7,3	4,4	5,9	14,3	2,0	8,1
	1:250	1:2	MW CV*	1:625	1:5	MW CV*
IL-1 α	3,4	4,7	4,0	13,2	5,2	9,2
IL-1 β	6,5	6,5	6,5	12,4	6,8	9,6
IL-1ra	10,9	8,1	9,5	13,3	5,1	9,2
IL-6	3,9	3,8	3,9	18,1	1,6	9,8
IL-8	4,2	1,7	2,9	15,0	1,6	8,3
IL-10	2,9	11,5	7,2	18,1	6,4	12,2
IL-15	1,8	8,5	5,1	11,1	3,4	7,2
IP-10	3,3	3,3	3,3	8,9	3,8	6,4
MIP-1 α	8,3	9,4	8,8	14,8	2,5	8,6
TNF- α	4,0	2,6	3,3	12,8	1,4	7,1

*MW CV – Mittelwert der Varianzkoeffizienten

4.2.5 Untersuchung von Kontrollgruppen zur Ermittlung des Einflusses eines Harnwegsinfektes auf die Konzentration der untersuchten Parameter

Um den Einfluss eines Harnwegsinfektes (HWI) auf das immunologische Muster im Urin zu bestimmen, wurden bei 14 Patienten mit einer nachgewiesenen Entzündung des Urogenitaltraktes alle 16 im Urin nachweisbaren Parameter bestimmt. Zusätzlich wurde der Urin von 14 gesunden Probanden untersucht, um für jeden Parameter einen gegebenenfalls vorhandenen nicht pathologischen Basiswert zu erhalten. **Tabelle 7**

zeigt die medianen Konzentrationen beider Kontrollgruppen gegenübergestellt. Zusätzlich wurden mittels ROC-Analysen die Parameter ermittelt, die eine Unterscheidung zwischen der gesunden Probandengruppe und der Gruppe mit Harnwegsinfekt zuließen. So waren die Flächen unter der ROC-Kurve (AUC) von **IL-8, sFas, IL-1ra, IL-1 α , IP-10 sowie MIP-1 α** bei einem p-Wert $<0,05$ zwischen 0,788 und 1 (**Tabelle 7**). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass diese Parameter signifikant höhere Konzentrationen in der Gruppe mit Harnwegsinfekt als in der Gruppe gesunder Probanden aufwiesen und daher zur Differenzierung dieser beiden Gruppen herangezogen werden können. Bei drei weiteren Parametern wurden Konzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze gemessen, die allerdings keine Unterschiede in den zwei Gruppen zeigten: sICAM-1, sVCAM-1 und MIF. Die medianen Konzentrationen aller anderen Marker lagen in beiden Kontrollgruppen jeweils unterhalb der Nachweisgrenze.

Tabelle 7: Analyse beider Kontrollgruppen sowie Ermittlung der Urinparameter, die Hinweise auf einen Harnwegsinfekt geben

Die Konzentrationen sind in pg/ml, bzw. in ng/ml für sICAM-1 und sVCAM-1 angegeben. 3,2 bzw. 12,2 pg/ml sind die vom Hersteller vorgegebenen unteren Nachweisbar-grenzen der jeweiligen Parameter.

Parameter	Gesund	HWI	ROC-Analyse	
	Median (Q1-Q3)	Median (Q1-Q3)	AUC (95% KI)	p-Wert
IL-6	<3,2	<3,2 (<3,2-9,56)	0,656 (0,449-0,863)	0,161
IL-8	2,29 (0-8,05)	234,6 (114,8-1980,4)	1 (1-1)	0,001
sICAM-1	1,89 (1,51-2,76)	1,15 (0,51-1,53)	0,219 (0,035-0,404)	0,012
sVCAM-1	0,9 (0,5-1,23)	0,66 (0,25-1,12)	0,401 (0,184-0,617)	0,370
sFas	31,14 (11,93-44,82)	90,10 (61,07-167,7)	0,939 (0,853-1,025)	0,001
sFasL	<12,2	<12,2	0,536 (0,319-0,753)	0,748
IL-1ra	1791,1 (722,4-2365)	>10000 (4393,7->10000)	0,796 (0,608-0,984)	0,008
TNF α	<3,2	<3,2	0,571 (0,356-0,787)	0,520
IL-10	<3,2	<3,2	0,500 (0,282-0,718)	1,0
IL-1α	<3,2 (<3,2-3,74)	16,70 (9,11-62,11)	0,952 (0,854-1,049)	0,001
IL-1 β	<3,2	<3,2	0,571 (0,356-0,787)	0,520
IP-10	11,40 (3,49-30,14)	98,65 (11,49-961,1)	0,788 (0,613-0,964)	0,009
MIF	475,4 (171,1-878,5)	735,3 (463,9-1096,8)	0,643 (0,431-0,855)	0,198
tPAI-1	<12,2	<12,2	0,571 (0,356-0,787)	0,520
MIP-1α	<3,2	8,26 (5,99-12,53)	0,893 (0,758-1,027)	0,001
IL-15	<3,2	<3,2 (<3,2-4,76)	0,679 (0,475-0,882)	0,108

Q1-Q3: Interquartilsabstand; AUC (95%KI): *area under the curve* mit 95% Konfidenzintervall

Im nächsten Schritt wurde geprüft, inwiefern ein Harnwegsinfekt die Diagnose einer akuten Abstoßungsepisode beeinflusst bzw. ob sich die fünf untersuchten Patientengruppen (gesund, HWI, SGF, SSAR und SRAR) in ihren Konzentrationen unterscheiden lassen. Dazu wurden die medianen Konzentrationen (für SGF am 6. postoperativen Tag, für SSAR und SRAR am Abstoßungstag) gegenübergestellt (**Tabelle 8**). Dabei zeigte sich bei den meisten Parametern ein konstanter Anstieg der Konzentrationen über die fünf Gruppen. Die Analyse nach Kruskal-Wallis bestätigte, dass außer sICAM-1 und sFasL alle Parameter deutliche Konzentrationsunterschiede in den einzelnen Patientengruppen zeigten und somit eine Differenzierung ermöglichen, vor al-

lem zwischen einem Harnwegsinfekt und einer akuten Abstoßung. Die entsprechenden p-Werte sind in **Tabelle 8** aufgelistet.

Tabelle 8: Gegenüberstellung der Konzentrationswerte aller fünf Patientengruppen (Gesund, HWI, SGF, SSAR und SRAR)

Die Konzentrationen sind in pg/ml bzw. in ng/ml für sICAM-1 und sVCAM-1 angegeben. 3,2 bzw. 12,2pg/ml sind die vom Hersteller vorgegebenen unteren Nachweisbargrenzen der jeweiligen Parameter. Die p-Werte sind nach Kruskal-Wallis berechnet.

	Gesund Median (Q1-Q3)	HWI Median (Q1-Q3)	SGF Median (Q1-Q3)	SSAR Median (Q1-Q3)	SRAR Median (Q1-Q3)	p- Wert
IL-6	<3,2	<3,2 (<3,2-9,56)	9,49 (6,07-23,64)	106,7 (42,5-214,2)	105,5 (55,28-236,5)	<0,001
IL-8	2,29 (0-8,05)	234,6 (114,8-1980,4)	67,09 (27,07-196,0)	227,9 (104,6-808,3)	309,6 (150,9-2000)	<0,001
sICAM-1	1,89 (1,51-2,76)	1,15 (0,51-1,53)	1,47 (0,57-2,64)	1,80 (0,59-3,16)	2,36 (0,63-4,94)	0,210
sVCAM-1	0,9 (0,5-1,23)	0,66 (0,25-1,12)	8,82 (2,52-16,91)	14,05 (7,42-25,74)	21,38 (8,51-28,57)	<0,001
sFas	31,14 (11,93-44,82)	90,10 (61,07-167,7)	140 (84,35-240,1)	310,6 (183,5-447,4)	1226,3 (219,8-2249,9)	<0,001
sFasL	<12,2	<12,2	<12,2	<12,2	<12,2 (<12,2-11,75)	0,193
IL-1ra	1791,1 (722,4-2365,0)	>10000 (4393,7->10000)	487,0 (156,7-1133,1)	725,5 (551,8-2780,8)	1961,3 (809,3-3451,1)	<0,001
TNF-α	<3,2	<3,2	<3,2 (<3,2-4,21)	<3,2 (<3,2-3,64)	9,14 (<3,2-23,13)	<0,001
IL-10	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2 (<3,2-3,0)	<3,2 (<3,2-4,02)	0,001
IL-1α	<3,2 (<3,2-3,74)	16,70 (9,11-62,11)	3,62 (<3,2-8,63)	4,03 (<3,2-14,96)	6,35 (4,84-65,9)	<0,001
IL-1β	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	3,21 (<3,2-7,18)	0,004
IP-10	11,40 (3,49-30,14)	98,65 (11,49-961,1)	83,80 (33,03-138,7)	400,6 (57,7-1258,8)	4121,7 (827,8-7684,8)	<0,001
MIF	475,4 (171,1-878,5)	735,3 (463,9-1096,8)	1667,1 (699-2787,8)	867,2 (404,8-2215,6)	3498,4 (1670,8-8566,9)	0,002
tPAI-1	<12,2	<12,2	30,59 (20,23-105,4)	148,4 (53,2-290,2)	274,5 (106,4-425)	<0,001
MIP-1α	<3,2	8,26 (5,99-12,53)	4,81 (<3,2-16)	5,97 (<3,2-12,44)	34,06 (18,23-138,4)	<0,001
IL-15	<3,2	<3,2 (<3,2-4,76)	<3,2 (<3,2-4,1)	<3,2 (<3,2-3,5)	4,38 (<3,2-11,17)	0,010

Q1-Q3: Interquartilsabstand

4.3 Ermittlung allgemeiner Rejektionsmarker

Eines der Hauptziele dieser Arbeit war es Parameter zu finden, die im Urin eine akute Abstoßung anzeigen. Dazu wurden im Folgenden die beiden Abstoßungsgruppen (SSAR und SRAR) für die statistische Analyse zusammen betrachtet, so dass insgesamt 18 Patienten mit stabiler Transplantatfunktion (SGF) 36 Abstoßungspatienten gegenübergestellt wurden. Zur Analyse wurden alle 14 Parameter berücksichtigt, die im Kruskal-Wallis Test eine signifikante Unterscheidung aller fünf Patientengruppen (kein HWI, HWI, SGF, SSAR und SRAR) zuließen (Tabelle 8).

Zur Ermittlung der allgemeinen Rejektionsmarker wurde der Mann-Whitney-U Test, der zur Differenzierung von zwei Patientengruppen herangezogen werden kann, durchgeführt. Dieser zeigte für neun Marker (**IL-6, IL-8, sVCAM-1, sFas, IL-1ra, IL-10, IL-1 β , IP-10 und tPAI-1**) einen signifikanten Unterschied zwischen einer stabilen Transplantatfunktion und einer akuten Abstoßungsepisode. Zusätzlich waren die Konzentrationsanstiege von **IL-6, IL-8, sVCAM-1, sFas, IL-1ra, IP-10 und tPAI-1** in der Rejektionsgruppe bereits einen Tag vor klinisch diagnostizierter Rejektion statistisch signifikant.

Zur Abschätzung der Sensitivität wurden für alle ermittelten Rejektionsmarker ROC-Kurven generiert. Die Flächen unter den ROC-Kurven (AUC – area under the curve) sowie die geschätzten 95% Konfidenzintervalle (95%KI) sind in **Tabelle 9** aufgeführt. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang liegt vor, wenn das 95% Konfidenzintervall den Wert 0,5 nicht enthält. Daher ergibt sich für IL-8, sVCAM-1, IL-10 und IL-1 β eine eingeschränkte Aussagekraft eine akute Rejektion am Abstoßungstag anzuzeigen. Für sVCAM-1 ist ebenso die Sensitivität eine Abstoßung einen Tag vor klinischer Manifestation vorherzusagen herabgesetzt.

Tabelle 9: Analyse allgemeiner Rejektionsmarker

Stabile Transplantatfunktion versus Abstoßungsreaktion		
	Parameter	AUC (95%KI)
Am Abstoßungstag	IL-6	0,858 (0,736-0,979)
	IL-8	0,674 (0,477-0,870)
	sVCAM-1	0,635 (0,446-0,825)
	sFas	0,767 (0,602-0,933)
	IL-1ra	0,729 (0,548-0,910)
	IL-10	0,667 (0,492-0,842)
	IL-1 β	0,646 (0,467-0,825)
	IP-10	0,767 (0,613-0,921)
	tPAI-1	0,757 (0,600-0,914)
Einen Tag vor Abstoßung	IL-6	0,749 (0,597-0,901)
	IL-8	0,730 (0,556-0,904)
	sVCAM-1	0,643 (0,465-0,820)
	sFas	0,735 (0,568-0,902)
	IL-1ra	0,717 (0,557-0,877)
	IP-10	0,690 (0,519-0,862)
	tPAI-1	0,720 (0,540-0,900)

Um den Konzentrationsunterschied bestimmter Urinmarker zwischen stabiler Transplantatfunktion und akuter Abstoßung graphisch zu verdeutlichen, sind in **Abbildung 6** exemplarisch die Boxplots von sechs Rejektionsmarker, die sowohl am Tag der Abstoßung als auch bereits einen Tag vorher signifikante Unterschiede zeigten, dargestellt.

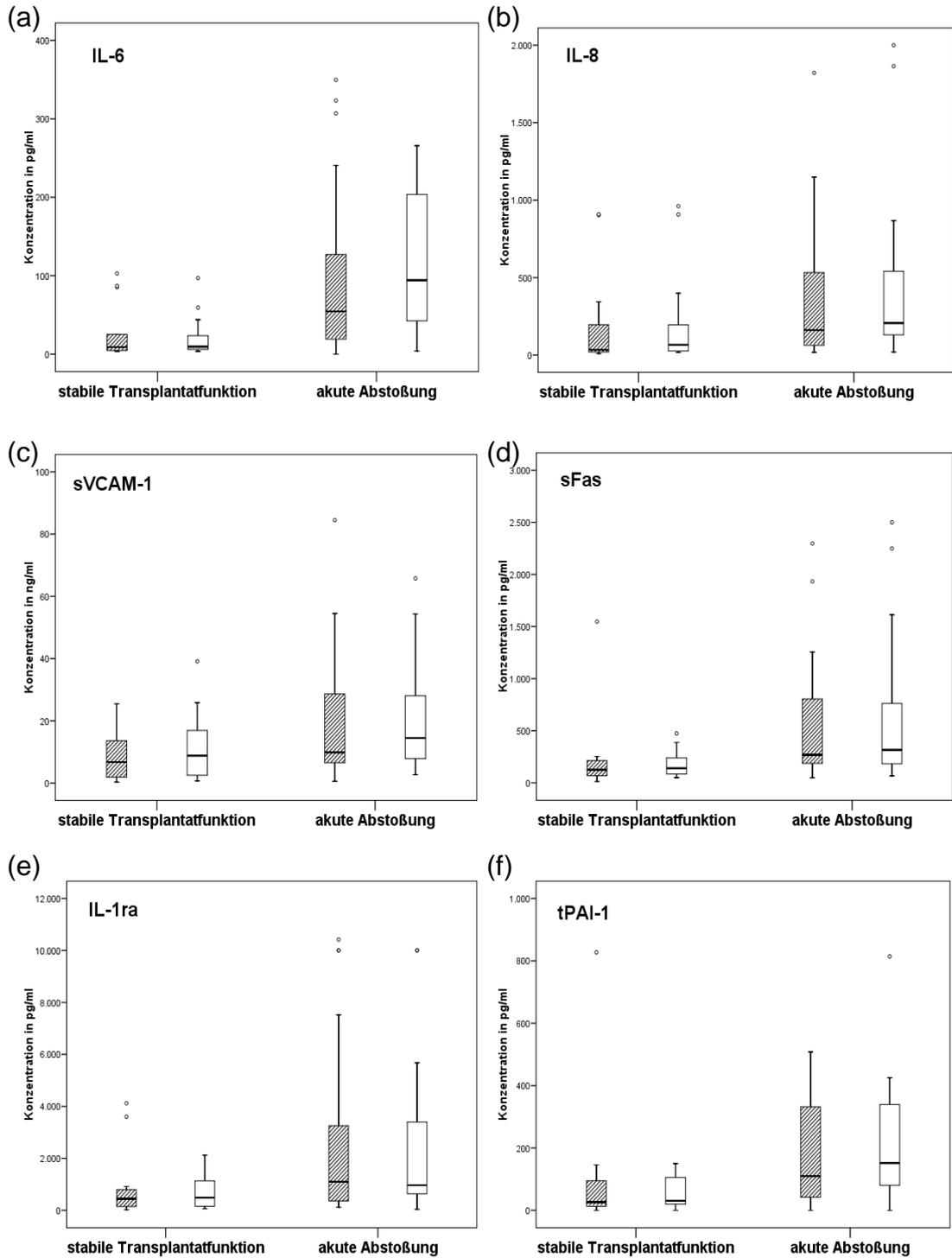


Abbildung 6 (a-f): Biomarker, die bereits einen Tag vor klinisch manifester Abstoßung eine Rejektion anzeigen

Weißer Boxplots signalisieren den Abstoßungstag, graue Boxplots den Tag vor der Abstoßung. „o“ kennzeichnet Ausreißerwerte. Weitere Ausreißerwerte, die über dem angegebenen Messbereich liegen, sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt: (IL-6: 3.Boxplot: 1111 and 2852 pg/ml, 4.Boxplot: 550, 616 and 858 pg/ml; IL-8: 3.Boxplot: 2755 and 5914 pg/ml, 4.Boxplot: 2411, 3305 and 5782 pg/ml; sVCAM-1: 3.Boxplot 176 ng/ml, 4.Boxplot 116 ng/ml; tPAI-1: 3.Boxplot: 1614, 2685 and 4573 pg/ml, 4.Boxplot: 1215, 3257 and 3278 pg/ml. Der 3. Boxplot entspricht den Patienten mit akuter Abstoßung einen Tag vor klinischer Manifestation und der 4. Boxplot repräsentiert Abstoßungspatienten am Tag der Rejektion.)

Zur Vervollständigung der statistischen Analyse wurden univariate und multivariate logistische Regressionsanalysen mit allen im Mann-Whitney-U Test signifikanten Rejektionsmarkern berechnet. Diese zeigten bei Betrachtung aller Parameter im multivariaten Modell (schrittweise Selektion der Parameter) lediglich einen signifikanten Effekt von IL-6 und einen sehr geringen Effekt von IL-8 zur Diagnose einer akuten Abstoßungsreaktion. Die vollständige Analyse ist in **Tabelle 10** zusammengestellt.

Tabelle 10: Berechnung univariater und multivariater Modelle zur Unterscheidung einer stabilen Transplantatfunktion von einer akuten Rejektion

Parameter	Univariate Modelle			Multivariates Modell		
	Regressionskoeffizient	Standardfehler	p-Wert	Regressionskoeffizient	Standardfehler	p-Wert
IL-6	0,034	0,013	0,007	0,045	0,018	0,011
IL-8	0,001	0,001	0,143	-0,001	0,001	0,106
sVCAM-1	0,052	0,032	0,098		-	
sFas	0,005	0,003	0,052		-	
IL-1ra	0,001	0,001	0,054		-	
IL-10	4,628	295,3	0,987		-	
IL-1 β	4,142	279,8	0,988		-	
IP-10	0,004	0,003	0,105		-	
tPAI-1	0,013	0,006	0,018		-	
Konstante				-1,225	0,654	0,061

4.4 Analysen zur Differenzierung der Abstoßungsperiode

Klinisch wird die Steroid-sensitive von der Steroid-resistenten akuten Rejektion unterschieden, die jeweils ein unterschiedliches Therapieregime nach sich ziehen. An Hand des Mann-Whitney-U-Tests konnte belegt werden, dass mit Beginn des ersten Auftretens von klinischen Symptomen im Zuge einer akuten Abstoßung diese Differenzierung mittels bestimmter Parameter ebenfalls möglich ist. So zeigten **sFas, TNF- α , MIF und MIP-1 α** in der SRAR-Gruppe signifikant höhere Konzentrationen als in der SSAR-Gruppe. Bei MIP-1 α war die Differenzierung bereits einen Tag vor klinisch diagnostiziertem Beginn der Rejektion möglich. Für diese Berechnungen wurden nur die beiden Abstoßungsgruppen mit folgenden Patientenzahlen betrachtet: SSAR mit n = 23 und SRAR mit n= 13. In **Tabelle 11** sind die Flächen unter den ROC-Kurven sowie die geschätzten 95% Konfidenzintervalle aller signifikanter Differenzierungsmarker aufgelistet. Diese Analysen bestätigen, dass sFas, TNF- α , MIF und MIP-1 α mit einer hohen Sensitivität Abstoßungsperioden differenzieren können.

Tabelle 11: Analyse von Differenzierungsmarker zur Unterscheidung einer Steroid-sensitiven von einer Steroid-resistenten Abstoßungsreaktion

Steroid-sensitive versus Steroid-resistente Abstoßung		
	Parameter	AUC (95%KI)
Am Abstoßungstag	sFas	0,723 (0,521-0,925)
	TNF- α	0,727 (0,528-0,926)
	MIF	0,719 (0,518-0,919)
	MIP-1 α	0,742 (0,559-0,926)
Einen Tag vor Abstoßung	MIP-1 α	0,740 (0,571-0,908)

AUC (95%KI): *area under the curve* mit 95% Konfidenzintervall

Die graphischen Darstellungen, die diese Signifikanzen unterstreichen, sind in Form von Boxplots in **Abbildung 7** zu sehen.

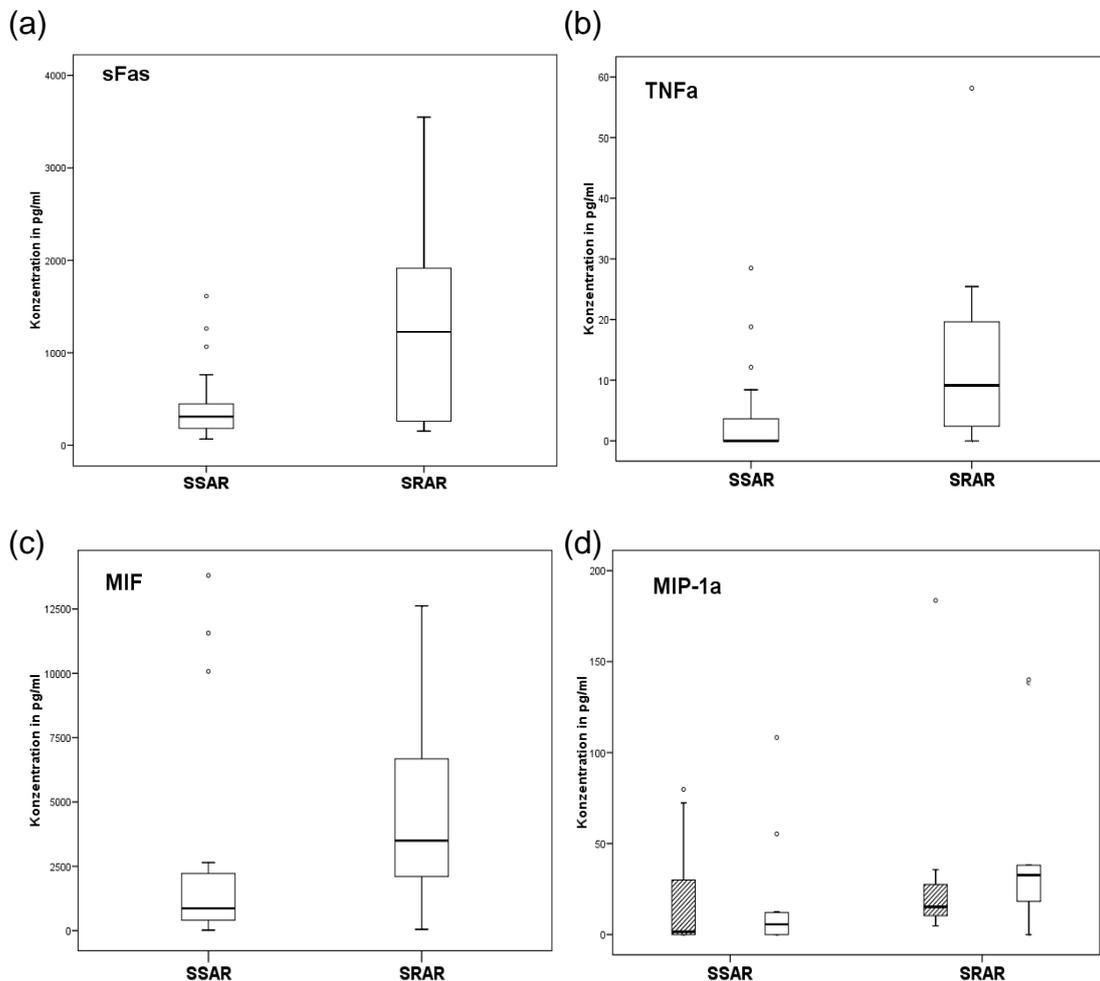


Abbildung 7 (a-d): Graphische Darstellung der Differenzierungsmarker

Das Symbol „o“ kennzeichnet Ausreißerwerte. Jeweils zwei weitere Ausreißerwerte über dem ersten (260 pg/ml und 398 pg/ml) sowie über dem zweiten Boxplot (298 pg/ml und 575 pg/ml) in Abbildung 7d liegen außerhalb des gegebenen Messbereiches, der aus Gründen der Übersichtlichkeit begrenzt wurde.

Im Anschluss wurden ebenfalls von allen signifikanten Differenzierungsmarkern univariate und multivariate Modelle mit Hilfe von logistischen Regressionsanalysen berechnet. Diese zeigten bei Betrachtung aller Parameter in der multivariaten Analyse mit schrittweiser Selektion der Parameter einen signifikanten Effekt von sFas bei der Unterscheidung der Steroid-sensitiven von der Steroid-resistenten Abstoßung. Die vollständige Analyse ist in **Tabelle 12** zusammengestellt.

Tabelle 12: Berechnung univariater und multivariater Modelle zur Differenzierung SSAR und SRAR

Parameter	Univariate Modelle			Multivariates Modell		
	Regressionskoeffizient	Standardfehler	p-Wert	Regressionskoeffizient	Standardfehler	p-Wert
sFas	0,002	0,001	0,022	0,002	0,001	0,022
TNF- α	0,085	0,045	0,060		-	
MIF	0,001	0,001	0,168		-	
MIP-1 α	0,001	0,001	0,426		-	
Konstante				-1,814	0,640	0,005

4.5 Zusammenfassung der statistischen Analyse

Die Parameter sFasL, sICAM-1 und IL-15 zeigten weder während eines Harnwegsinfektes, noch während einer akuten Abstoßung oder einer Steroid-resistenten Abstoßung eine Elevation ihrer Konzentrationen im Urin und wurden daher als unspezifisch klassifiziert. Alle anderen Parameter konnten entweder den HWI-, den allgemeinen Rejektions- und/oder den Differenzierungsmarkern zugeordnet werden. Zusammenfassend zeigt **Tabelle 13**, welche Parameter eine akute Abstoßung bzw. eine Steroid-resistente Abstoßung anzeigen und somit eine diagnostische Relevanz haben könnten. Zu berücksichtigen ist, dass die Konzentrationen einiger Marker auch bei Harnwegsinfekten erhöht sein können. Diese zeigten allerdings in der statistischen Analyse geringere Konzentrationen im Vergleich zu einer akuten Abstoßung.

Tabelle 13: Zusammenfassende Darstellung aller relevante Biomarker

HWI-Marker	Allgemeine Rejektionsmarker	Differenzierungs-Marker	unspezifische Marker
IL-8	IL-6	sFas	sICAM-1
sFas	IL-8	TNF- α	sFasL
IL-1ra	sVCAM-1	MIF	IL-15
IL-1 α	sFas	MIP-1 α	
IP-10	IL-1ra		
MIP-1 α	IL-10		
	IL-1 β		
	IP-10		
	tPAI-1		

4.6 Korrelationsanalyse

In einem weiteren Schritt wurde die Korrelationsstruktur der signifikanten Rejektionsparameter untersucht. Dazu wurden alle Korrelationskoeffizienten nach Spearman's Rank berechnet (**Tabelle 14**). Da alle Koeffizienten größer Null waren, kann die Aussage getroffen werden, dass die Konzentrationen aller Rejektionsmarker gleichsinnig verliefen. Der stärkste Zusammenhang befand sich zwischen IL-6 und IL-8, aber auch tPAI-1 zeigte zu allen andern Marker eine hohe Korrelation.

Tabelle 14: Untersuchung der Korrelationsstruktur der einzelnen Parameter

Bedeutung der Korrelationskoeffizienten: 0,0-0,2 kein bis geringer Zusammenhang; 0,2-0,5 schwacher bis mäßiger Zusammenhang; **0,5-0,8 deutlicher Zusammenhang**; **0,8-1,0 hoher bis perfekter Zusammenhang**

	IL-6	IL-8	sVCAM-1	sFas	IL-1ra	IL-10	IL-1 β	IP-10	tPAI-1
IL-6	1	0,865	0,492	0,731	0,598	0,645	0,520	0,519	0,781
IL-8		1	0,485	0,655	0,472	0,633	0,556	0,472	0,771
sVCAM-1			1	0,501	0,209*	0,464	0,283*	0,405	0,532
sFas				1	0,591	0,577	0,413	0,518	0,788
IL-1ra					1	0,466	0,382	0,425	0,655
IL-10						1	0,722	0,422	0,656
IL-1β							1	0,475	0,572
IP-10								1	0,641
tPAI-1									1

* nicht signifikant

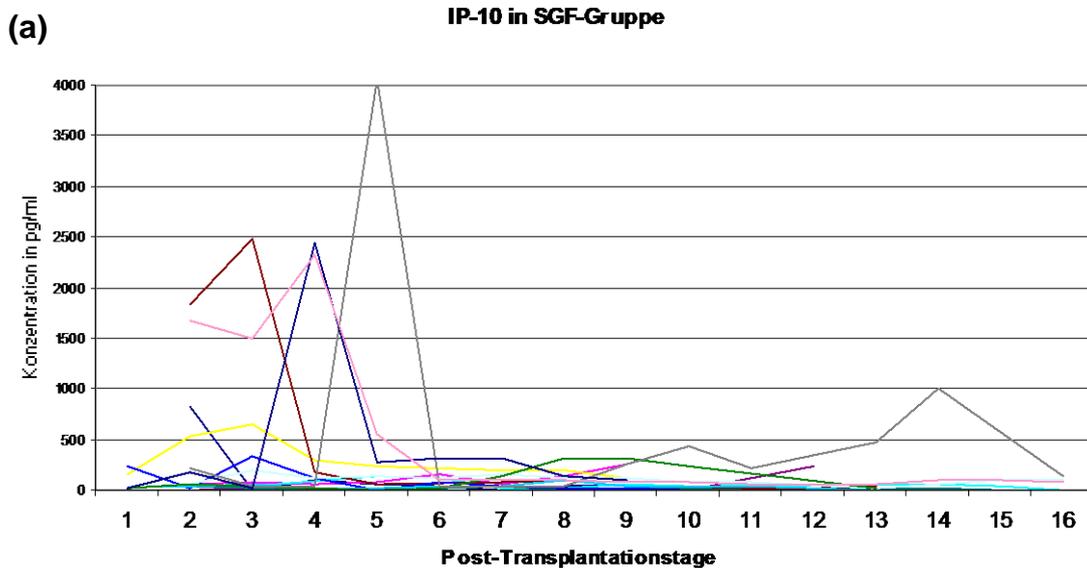
4.7 Analyse möglicher Confounder

Confounder in Bezug auf die Analyse von Rejektionsmarker sind Störfaktoren, die Einfluss auf die Diagnose „akute Rejektion“ haben. Mit Hilfe multivariater logistischer Regressionsanalysen können diese bestimmt bzw. ausgeschlossen werden. Diese Kalkulationen wurden für das Alter, für das Geschlecht, für die Anzahl der Mismatches sowie für die Erkrankung, die zur terminalen Niereninsuffizienz führte, durchgeführt. Alle genannten Patientenmerkmale hatten keinen Einfluss auf die Zielgröße „akute Abstoßung“ und konnten somit als mögliche Confounder ausgeschlossen werden.

4.8 Vergleich der zeitabhängigen individuellen Konzentrationsverläufe am Beispiel von IP-10

Die Konzentrationen innerhalb einer Patientengruppe zeigten erwartungsgemäß große Schwankungen zwischen den einzelnen Patienten. Um nun eine individuelle Konzentrationserhöhung im Urin eines Patienten feststellen zu können, wurde den individuellen Verläufen daher bereits theoretisch eine größere Bedeutung zugemessen. Die folgen

den Abbildungen zeigen am Beispiel von IP-10 trotz der zwischen den individuellen Patienten existierenden unterschiedlichen Konzentrationen auffällige Regelmäßigkeiten im Verlauf der Graphen innerhalb einer Patientengruppe. Patienten mit stabiler Transplantatfunktion zeigten teilweise einen Anfangspeak bis maximal zum fünften postoperativen Tag, der dann rasch auf einen Basiswert fiel. Die gezielte Betrachtung der vier Patienten mit einem anfänglichen Peak erbrachten keine Gemeinsamkeiten bzgl. der Patientenmerkmale. Die meisten Patienten allerdings wiesen einen relativ gleichmäßigen Verlauf ohne große Konzentrationsschwankungen auf mit Werten <500 pg/ml (**Abbildung 8a**). Die Mehrheit der Patienten mit einer akuten Abstoßungsperiode zeigten ihr Konzentrationsmaximum (Werte >1000 pg/ml) am Tag bzw. am Vortag der klinisch detektierten Rejektion. In der Gruppe mit Steroid-sensitiver Abstoßung „normalisierten“ sich allerdings die gemessenen Konzentrationen schnell nach Steroid-Bolustherapie auf Werte <500 pg/ml (**Abbildung 8b**). Im Vergleich dazu fehlte bei Patienten mit einer Steroid-resistenten Abstoßungsperiode dieser schnelle Konzentrationsabfall nach initialer Steroid-Bolustherapie. Erst durch die Zugabe eines polyklonalen Antikörpers (Thymoglobulin und/oder ATG) wurde der Abfall von IP-10 erreicht (**Abbildung 8c**).



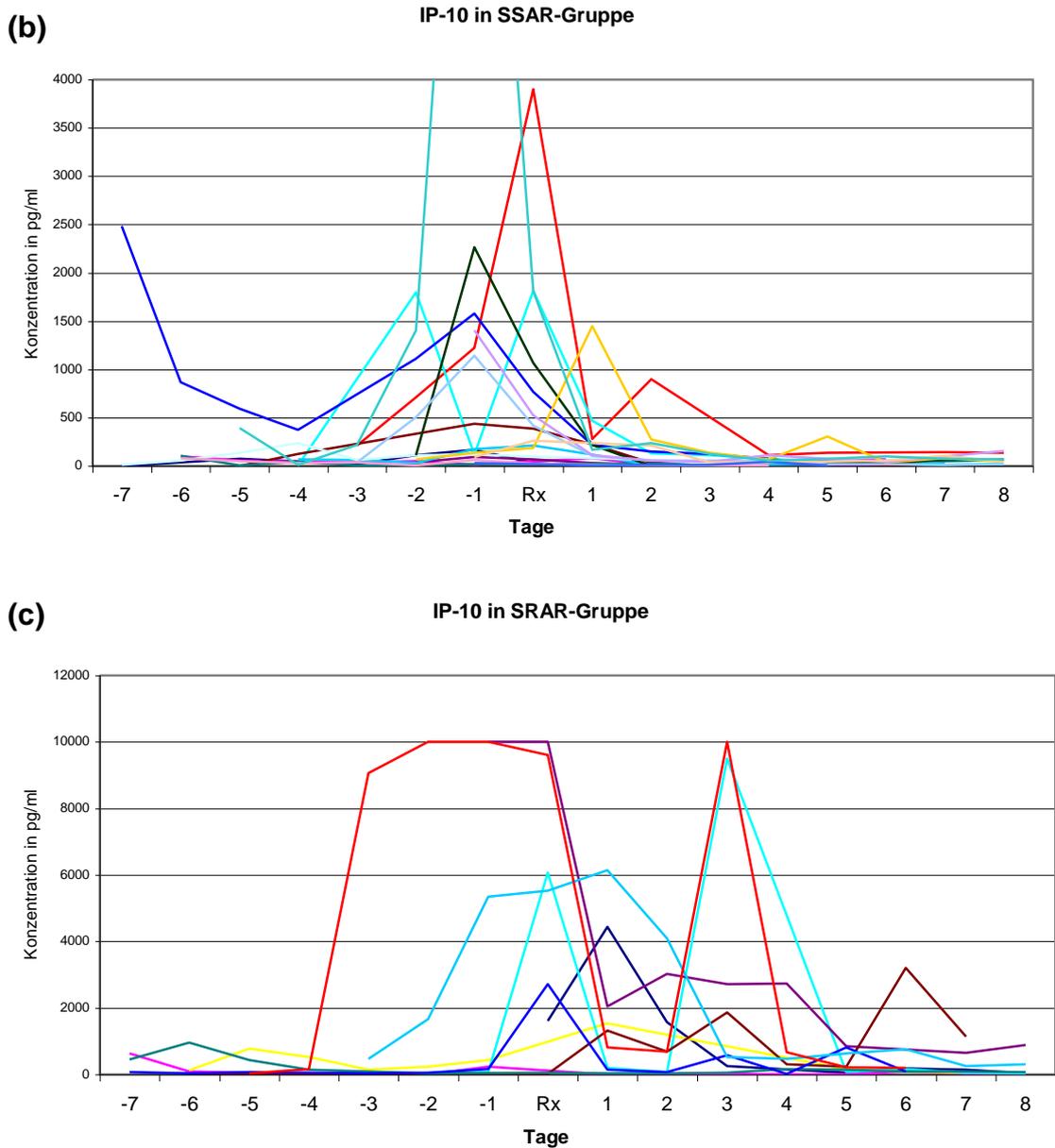


Abbildung 8 (a-c): Individuelle zeitliche Konzentrationsverläufe von IP-10 in den drei Patientengruppen SGF, SSAR und SRAR

Gezeigt sind die individuellen Verläufe aller drei Patientengruppen für die ersten 16 postoperativen Tage im Falle einer stabilen Transplantatfunktion (a). Bei den Patienten mit akuter Abstoßung (b und c) wurde der Abstoßungstag auf Tag 8 adjustiert und jeweils die Konzentrationen an den sieben vorausgehenden und den acht folgenden Tagen graphisch dargestellt. Da IP-10 erst später in das Analysespektrum aufgenommen wurde, sind insgesamt nur 42 Patienten graphisch dargestellt.

5 Diskussion

Die Anzahl der Patienten auf der Warteliste zur Nierentransplantation steigt aufgrund der zunehmenden Lebenserwartung stetig an. Trotz der zunehmenden Anzahl an Lebendspenden reichen die derzeit durchgeführten Transplantationen bei weitem nicht aus, um die Warteliste zu minimieren. Insgesamt wurden im Jahr 2009 2792 Nierentransplantationen in Deutschland durchgeführt. Dem stehen allerdings 3409 Patienten gegenüber, die 2009 in die Warteliste neu aufgenommen wurden (Eurotransplant, Jahresbericht 2009). Das Problem der Organknappheit wird sich in den nächsten Jahren nicht lösen, sondern sich eher noch verschärfen. Daher ist es wichtig, ein bereits transplantiertes Organ möglichst lange zu erhalten. Die Faktoren, die die Langzeitfunktion eines transplantierten Organs einschränken, sind vielfältig. Eine Ursache für eine Funktionseinschränkung kann die akute Rejektion sein. Daher ist es von großer Bedeutung, diese frühzeitig zu erkennen und richtig zu therapieren, um den entstandenen Schaden zu reduzieren bzw. sogar zu verhindern. Dazu sind exakte Verfahren notwendig, die routinetauglich sind und dem Patienten möglichst keinen Schaden zufügen. Diesen Ansprüchen kann auch die derzeit als „Goldstandard“ bezeichnete Nadelbiopsie nicht gerecht werden.

Die vorliegende Arbeit sollte zeigen, dass es möglich ist, mit einer routinetauglichen Methode Biomarker im Urin zu ermitteln, die mit den klinischen und laborchemischen Parametern einer Rejektion korrelieren. Im Anschluss weiterer Studien könnte sich der in der vorliegenden Arbeit entwickelte Ansatz letztlich zu einer diagnostischen Alternative zur Biopsie entwickeln.

5.1 Urin als Analysemedium zur Diagnose einer Rejektion nach Nierentransplantation

Bereits 1963 fand die Analyse von Urin zur Diagnose einer akuten Rejektion Verwendung (Hume *et al.*, 1963). Urin als Analysemedium hat viele Vorteile gegenüber anderen Medien (Clarke *et al.*, 2003): So ist die Gewinnung von Urin absolut risikofrei, nicht invasiv und für den Patienten mit keinerlei Schmerzen oder Unannehmlichkeiten verbunden. Urin ist zudem bis auf den Fall einer Anurie immer vorhanden. Der vorliegenden Arbeit lag die initiale Vorstellung zugrunde, dass Urin im Gegensatz zum Serum außerdem präziser das pathologische Geschehen des gesamten Organs Niere reflektiert. Dagegen sind durch Biopsien Pathologien nur ausschnittsweise darstellbar, da nur jeweils eine Probe vom Oberpol und bzw. vom Unterpol der Nieren gewonnen werden. Allerdings ist gerade ein anfänglicher Prozess in der Niere regional begrenzt, so dass er der Erfassung mittels Biopsie entgehen kann. Serum- oder Plasmaanalysen spiegeln die Proteinvielfalt verschiedenster Gewebe des Körpers wider. Hinzukommt,

dass allein Albumin und die 21 häufigsten Plasmaproteine schon 99% des Gesamtproteins im Plasma repräsentieren. Dies erschwert die Suche nach den krankheitsspezifischen Biomarkern. Urin hingegen setzt sich aus ca. 70% in der Niere generierten und 30% Plasmaproteinen zusammen und kann so genauer nierenspezifische Erkrankungen besser abbilden (Thongboonkerd, 2008). Da die Anzahl der Proteasen im Urin verglichen mit Plasma geringer ist, gilt Urin als stabiles Medium. Eine Ausnahme besteht bei starker Proteinurie, wo Proteasen aus dem Plasma in den Urin übertreten können (Candela *et al.*, 1998). Um die Analyse von Urinproben vergleichbarer zu machen, wurden von den Mitgliedern des Projektes „HKUPP“ (human kidney & urine proteome project) Standardprotokolle zur Sammlung und Lagerung von Urinproben entwickelt. Diese empfehlen u.a. die Verwendung des zweiten Morgenurins, das Angleichen des pH-Wertes auf 8,0, die Vermeidung mehrfachen Auftauens, sowie das Zentrifugieren vor dem Einfrieren des Überstandes um eine eventuelle Proteinvermehrung durch vereinzelte Leukozyten oder Endothelzellen im Urin zu vermeiden. Zurückblickend muss daher angeführt werden, dass die Prozessierung der Urinproben in der vorliegenden Arbeit nicht ganz optimal ausgeführt wurde. Die Urinproben wurden bis zum Eintreffen im HLA-Labor lediglich kühl gelagert (4°C) und erst zur Analyse unmittelbar nach dem Auftauen zentrifugiert.

Nachteilig stellen sich bei der Proteinanalyse im Urin die großen intra- und interindividuellen Unterschiede dar (Thongboonkerd, 2007). Um vermeidbare intraindividuellen Differenzen (z.B. bedingt durch Trinkverhalten oder körperliche Anstrengung) zu minimieren, wurde der Urin für diese Arbeit täglich zur gleichen Zeit und unter gleichen Krankenhausbedingungen gesammelt. Trotzdem sind interindividuelle Varianzen nicht zu vermeiden, die folglich bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen (5.2). Ein weiteres Problem stellt die Manifestation von anderen Erkrankungen im Urin dar, die zu einer Änderung der Konzentrationen von Proteinen führen können (5.3).

5.2 Vorteile und Grenzen des Multiplex-Assays in der Routinediagnostik

Der verwendete Multiplex-Assay könnte aus rein praktischen Überlegungen für die tägliche Routinediagnostik grundsätzlich Verwendung finden: Das Luminex-Gerät steht im HLA-Labor für tägliche Messungen zur Verfügung, und die Ergebnisse der entsprechenden Analysen können bereits am gleichen Tag vorliegen und gegebenenfalls zu Therapieentscheidungen herangezogen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden aus Gründen der zeitlichen Konfiguration alle Assays mit Übernachtinkubationszeiten bearbeitet. Jedoch sind seitens des Herstellers auch kürzere Inkubationszeiten von 1-2 Stunden möglich. Die Inter- und Intraassay Varianzen des Bead-basierenden Assays liegen alle im Bereich derer, die mittels ELISA gemessen wurden. Auch die Experimen-

te von duPont und Mitarbeitern (2005) zeigten Luminex-Daten, u.a. für IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ und TNF- α , die mit ELISA-Messungen vergleichbar waren. Der Kardinalvorteil gegenüber einem ELISA liegt allerdings darin, dass es der vorliegende Multiplex-Assay durch die Bead-Technologie ermöglicht, mehrere Parameter in nur einem Ansatz zu messen. Das spart Zeit und Probenmaterial. Diese Tatsache kann allerdings insofern nachteilig sein, dass z.B. die Konzentration eines Parameters aus dem Messbereich des Assays, der eigentlich für die Serumanalyse entwickelt und hergestellt wurde, herausfällt. Das Probenmaterial kann in einem solchen Fall nicht beliebig verdünnt werden, da sonst andere Parameter aus dem Messbereich fallen würden. Technisch ist es aber dennoch möglich, unter Berücksichtigung der für das Medium „Urin“ relevanten Konzentrationsbereiche ein individuelles Kit mit allen rejektionsrelevanten Markern zusammen zu stellen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen im Konsens mit der Literatur (Thongboonkerd, 2007), dass die Aussagekraft von absoluten Konzentrationsangaben erheblichen Einschränkungen unterliegt und für die Rejektionsdiagnosen eher der individuelle zeitliche Verlauf der Parameter im Urin eines Patienten Auskunft geben kann, wie in den Abbildungen 8 (a-c) sichtbar. So wäre das Festlegen von Grenzwerten mit einem Verlust von Sensitivität oder Spezifität verbunden.

5.3 Probleme, die sich aus der Rejektionsdiagnostik im Nierentransplantationszentrum Halle ergeben

Im Nierentransplantationszentrum Halle wurde im angegebenen Studienzeitraum aufgrund der Invasivität häufig auf eine Biopsie zur Diagnose einer akuten Abstoßung verzichtet. Anstelle dessen wurde die Diagnose an Hand einer Zusammenschau von klinischen und laborchemischen Parametern im Urin und Serum gestellt. Unter anderem basiert dieses Vorgehen auf eigenen Studien, die gezeigt haben, dass CRP-Messungen im Urin sensitiver sind als die Biopsie selbst (Hamza *et al.*, 2006). Daher kann in der vorliegenden Arbeit die in der Literatur fast ausschließlich verwendete Korrelation mit dem Biopsieergebnis nicht geliefert werden. Allerdings existieren zusätzlich bereits erwähnte Studien, die den Verzicht der Nadelbiopsie ebenfalls unterstützen (Lederer *et al.*, 2003; Lasmar *et al.*, 2005). Da die Biopsie dennoch als klinischer Goldstandard gilt, kann nicht 100%ig ausgeschlossen werden, dass Patienten, die innerhalb dieser Arbeit untersucht wurden, eventuell übertherapiert wurden, weil die aufgrund der untersuchten Parameter (GFR, CREA CRP und uCRP) nahe liegende Rejektion, in der Biopsie nicht nachzuweisen wäre. Besonders bei Lebendspenden behandelt der Kliniker schneller und startet frühzeitig eine stärkere Rejektionstherapie. Dadurch könnte sich retrospektiv zeigen, dass Patienten ursprünglich in Gruppen eingeordnet wurden, denen sie *de facto* gar nicht entsprachen (SRAR statt SSAR). Diese letztlich nicht zu

beweisende Vermutung basiert auf der Tatsache, dass in der SRAR-Gruppe im Vergleich zu den anderen beiden Patientengruppen überproportional viele Lebendspenden aufzufinden waren. Umso mehr zeigt sich hier der Bedarf einer nicht invasiven und zuverlässigen Rejektionsdiagnostik.

Problematisch sind weitere Faktoren, die möglicherweise Einfluss auf die Konzentrationsbestimmungen der Urinmarker haben könnten und in der vorliegenden Arbeit aufgrund der geringen Patientenzahl nicht näher untersucht werden konnten. In diesem Zusammenhang könnten folgende Faktoren relevant sein: CMV-Infektion, systemische Infektionen, Grunderkrankungen, verzögerte Transplantatfunktionen sowie kalte Ischämiezeiten. IL-8 zeigt beispielsweise erhöhte Werte nach Reperfusion, die sich in Abhängigkeit von der kalten Ischämiezeit darstellen (Araki *et al.*, 2006). Für das proinflammatorische Zytokin IL-6 wurde bei verspäteter Transplantatfunktion ein verzögerter Abfall der anfänglich erhöhten Konzentration im Urin beschrieben (Kaden und Priesterjahn, 2000). Um eine mögliche Beeinflussung der entsprechenden Proteinkonzentrationen zu untersuchen, müsste theoretisch für jeden möglichen Einflussfaktor eine gesonderte Gruppe gebildet werden, was eine sehr große Anzahl von Patienten voraussetzt. Dies war im Rahmen dieser Pilotarbeit jedoch nicht möglich.

5.4 Vergleich der Resultate mit den bisher publizierten Biomarkerdaten

Die Luminex™-Technologie findet in der Nierentransplantation bisher nur im Screening von anti-HLA-Antikörpern im Serum Verwendung (Lachmann *et al.*, 2009). Die Biomarkeranalysen vorangegangener Arbeiten wurden hingegen überwiegend mittels ELISA oder durch Messen von mRNA-Kopien durchgeführt.

Die vorliegende Arbeit eröffnet daher einen vielversprechenden Ansatz, durch Messung der Urinparameter IL-6, IL-8, sVCAM-1, sFas, IL-1ra, IL-10, IL-1 β , IP-10 und tPAI-1 eine akute Abstoßung zu erkennen. Etliche Proteine, die sich in der vorliegenden Arbeit als Rejektionsmarker heraushoben, zeigten zusätzlich erhöhte Urinkonzentrationen in der Kontrollgruppe mit einem Harnwegsinfekt im Vergleich zu gesunden Probanden. Die statistische Analyse konnte aber zeigen, dass sich außer für sFasL und sICAM-1 die gemessenen Konzentrationen aller Patientengruppen, ob HWI oder AR, voneinander unterscheiden. So zeigten Parameter, die sowohl einen Harnwegsinfekt als auch eine akute Abstoßung anzeigen, bei Rejektionen deutlich höhere Konzentrationen als bei einem Harnwegsinfekt. Trotzdem sollte klinisch eine Entzündung der Harnwege ausgeschlossen werden. Die erhöhten Basiswerte der SGF-Gruppe im Vergleich zur gesunden Probandengruppe lassen sich durch die stressbedingte sowie Immunsystem-aktivierende Situation nach einer Transplantation erklären.

Die Parameter sFas, TNF- α , MIF und MIP-1 α konnten zusätzlich zur Differenzierung zwischen Steroid-sensitiver und Steroid-resistenter Rejektion herangezogen

werden. Die Steroidresistenz wird häufig durch eine humorale Rejektion hervorgerufen, die mit einem geringeren Überleben des Transplantates verbunden ist (Vargha *et al.*, 2006). Aus diesem Grund ist es sinnvoll diese Hochrisikopatienten frühzeitig zu erkennen, um alternative Therapien rechtzeitig anwenden zu können. Allerdings sollte besonders bei dieser Differenzierung der Anspruch an eine hohe Spezifität gestellt werden, denn die Steroidresistenz hat den Einsatz starker Immunsuppressiva zur Folge, die mit einem breiten Spektrum an Nebenwirkungen einhergehen können (Thrombozytopenie, Neutropenie, CMV-Infektion, Lungenaspergillose oder atypische Pneumonien [Colak *et al.*, 2008]). Bisherige Studien konnten nur durch Markierung von Cd4 im Biopstat humorale Abstoßungen nachweisen (Vargha *et al.*, 2006)

Viele der untersuchten Parameter wurden bereits in der Vergangenheit von Forschungsgruppen im Serum oder Urin als potentielle Rejektionsmarker erwähnt. Im Folgenden werden alle rejektions- sowie differenzierungsrelevanten Biomarker diskutiert.

5.4.1 sFas

sFas konnte in der vorliegenden Arbeit sowohl eine akute Rejektion erkennen, als auch diese differenzieren. So stiegen die sFas-Konzentrationen bereits einen Tag vor der klinischen Manifestation einer Rejektion auf das 3,1-fache. Die Werte der SRAR-Gruppe waren im Median 3,9-fach so hoch wie die der SSAR-Gruppe am Abstoßungstag. In der Literatur wird die Rolle von Fas-FasL widersprüchlich diskutiert. *In-vitro*-Experimente von Boonstra und Mitarbeitern (1997) an humanen proximalen Tubulusepithelzellen (PTEC), die aus einer Transplantatbiopsie vor TX gewonnen wurden, zeigten zwar eine vermehrte Anfärbbarkeit für sFas im Vergleich zu Kontrollzelllinien, allerdings konnte nach Hinzugabe von anti-Fas-Antikörpern keine Apoptose ausgelöst werden. Die Autoren vermuteten zusätzliche regulatorische Proteine, die den Apoptosevorgang hemmen können. Sie schlussfolgerten daher eine eher untergeordnete Rolle von Fas-FasL während einer akuten Rejektion. Die *in-vivo*-Situation ließ sich durch die Studien von Boonstra und Mitarbeitern allerdings nicht klären. In zwei weiteren Arbeiten konnte erhöhte FasL-mRNA zum einen im Urin (Yannaraki *et al.*, 2006) und zum anderen im Transplantatbiopstat (Graziotto *et al.*, 2006) bei Patienten mit akuter Abstoßung im Vergleich zu stabilen Transplantatfunktionen nachgewiesen werden. Beide Autorengruppen vermuteten daraus die Beteiligung des Fas-FasL-Apoptosemechanismus während einer akuten Rejektion. Zusammenfassend lassen die vorliegenden Messungen und auch die erwähnte Literatur einen Zusammenhang zwischen erhöhten sFas-Proteinkonzentrationen im Urin und einer akuten Abstoßung vermuten. Aus der Sicht der vorliegenden Arbeit ist allerdings zu beachten, dass dieser Konzentrationsanstieg nicht spezifisch ist, da sFas auch bei Harnwegsinfekten erhöht

war. Dennoch wurden nicht die im Zuge von Rejektionen aufgetretenen Werte erreicht. In der Arbeit von Yannaraki und Mitarbeitern (2006) war die FasL-mRNA im Urin auch bei HWI und CAN (chronische Transplantatnephropathie) erhöht. Als Protein im Urin konnte sFasL im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen nur in einem Teil der Proben überhaupt nachgewiesen werden und ist somit kein sicherer Marker.

5.4.2 IL-1 α und IL-1 β

Sowohl IL-1 α als auch IL-1 β wurden im Urin von Patienten mit bakterieller Zystitis untersucht (Candela *et al.*, 1998). Beide zeigten erhöhte Konzentrationen in messbarem Ausmaß, wobei IL-1 β stärker mit der Leukozyturie korrelierte. Daher wurde seitens der Autoren vermutet, dass IL-1 α zumindest teilweise aus den Blasenepithelzellen stammen könnte. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten für das Krankheitsbild des HWI eine starke Abhängigkeit von IL-1 α , wohingegen IL-1 β in nur 2 von 14 HWI-Proben überhaupt nachweisbar war. In den Urinproben der transplantierten Patienten zeigte sich nach statistischer Analyse IL-1 β als potentieller Rejektionsmarker, allerdings mit der Einschränkung, dass nur 9/44 Proben am Abstoßungstag messbare Konzentrationen aufwiesen, wovon 8 Proben in der Rejektionsgruppe positiv waren.

Auch in der Literatur wurde im Zusammenhang mit der Rejektionsdiagnostik häufig nur IL-1 β untersucht, da IL-1 α bisher eher als Membran-assoziiertes Interleukin bekannt war. Im Gegensatz dazu zirkuliert IL-1 β vermehrt im Kreislauf (Dinarelli, 1993).

5.4.3 IL-1ra

IL-1ra wird durch sein relatives Molekulargewicht von 17kDA frei durch die Niere filtriert. Untersuchungen mit radioaktivem IL-1ra haben gezeigt, dass weniger als 3,2% mit dem Urin ausgeschieden werden. Der weit überwiegende Anteil wird über die tubuläre Reabsorption in den Blutkreislauf zurückgeführt (Arend, 1993). Teppo und Mitarbeiter (1998) schlussfolgerten daraus, dass eine erhöhte IL-1ra Sekretion mit einer Dysfunktion der Tubuli einhergehen könnte. Zusätzlich kann es durch infiltrierende Makrophagen gebildet werden (Oliveira *et al.*, 1998), was erklären könnte, warum dieses Protein während einer akuten Rejektion um das 2,8-fache erhöht und während eines Harnwegsinfektes im Median sogar 50-fach erhöht im Urin messbar ist. Allerdings gilt IL-1ra funktionell als antiinflammatorisches Molekül, welches die Wirkung von IL-1 unterdrückt. Viele Studien unterstützen diese Aussage. So zeigten Teppo und Mitarbeiter (1998) in der Rejektionsgruppe niedrigere Werte von IL-1ra im Urin als in der rejektionsfreien Gruppe. Dieser Unterschied erreichte durch die große Varianz der Werte jedoch keine Signifikanz. Erst der Quotient aus IL-1ra und IL-1 β führte zu statistisch signifikanten Unterschieden, da IL-1 β mit beginnender Rejektion um ein Vielfaches stieg.

5.4.4 IL-6

Das proinflammatorische Zytokin IL-6 wurde bereits in der Literatur als Rejektionsmarker sowohl im Serum als auch im Urin häufig diskutiert. Diverse Untersuchungen haben gezeigt, dass IL-6 ein guter Parameter ist, um Rejektionen anzuzeigen und die Effektivität einer Rejektionstherapie zu bestimmen (vanOers *et al.*, 1988, Waiser *et al.*, 1997, Di Paolo *et al.*, 1997; Casiraghi *et al.*, 1997; Kaden und Priesterjahn, 2000). Jedoch kann die Produktion von IL-6 durch vielfältige Faktoren beeinflusst werden. Beispielsweise besteht ein Zusammenhang von symptomatischen Harnwegsinfekten und der IL-6 Konzentration im Urin (Ohta *et al.*, 1992; Ciszek *et al.*, 2006). Auch das Wiederauftreten der Grunderkrankung, die zur terminalen Niereninsuffizienz führte, kann die Messungen beeinflussen. Bei mesangioproliferativen Glomerulonephritiden wurden bereits erhöhte IL-6 Werte im Urin nachgewiesen (Ohta *et al.*, 1992; Hirano *et al.*, 1990). Ebenso beschrieben Waiser und Mitarbeiter (1997) IL-6 als sensitiven Rejektionsmarker, dessen Spezifität allerdings durch eine mangelnde Differenzierbarkeit zwischen akuter Abstoßung, Infektion, akuter tubulärer Nekrose und ATG-Behandlung reduziert ist.

Im Gegensatz zu den aufgeführten Studien konnten in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit Harnwegsinfekt und gesunden Probanden aufgezeigt werden. Diese Aussage findet Unterstützung in den Untersuchungen von Casiraghi (1997), der nach infektiösen Komplikationen (HWI, CMV, Sepsis, Epididymitis) nach TX keinen IL-6-Konzentrationsanstieg im Urin feststellte.

Eine der größten Studien zur Verwendbarkeit von IL-6 als Abstoßungsmarker wurde von Kaden und Priesterjahn (2000) mit 102 Patienten durchgeführt. Diese zeigte einen deutlichen Konzentrationsanstieg im Urin bei Abstoßung, der sogar der klinischen Diagnose vorausging, sich also prognostisch verhielt. Ein wesentlich kleinerer Konzentrationsanstieg wurde bei nachgewiesenen Harnwegsinfekten festgestellt. Ein noch geringerer Anstieg wurde bei CMV-Infektionen beobachtet. Allerdings fehlen in dieser Studie Angaben zu statistischen Signifikanzen. Die Literatur zusammenfassend sollte IL-6 als Rejektionsmarker unter Berücksichtigung der oben genannten Einflussfaktoren in einem Panel nicht fehlen. Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen dieser Arbeit wider, die demonstrieren, dass IL-6 in der Rejektionsgruppe bereits einen Tag vor der klinischen Manifestation erhöht ist und am Abstoßungstag im Median 10-fach erhöhte Werte annimmt im Vergleich zu einer stabilen Transplantatfunktion.

5.4.5 IL-8

Wie aus dem Ergebnisteil zu entnehmen ist, zählt IL-8 genau wie sFas, IP-10 und IL-1ra sowohl zu den allgemeinen Rejektionsmarkern als auch zu den Parametern, die einen Harnwegsinfekt anzeigen können. Während eines HWI stiegen die IL-8 Werte im Median um ein Vielfaches (102-fache im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe), während die Rejektionsgruppe nur eine mäßige Erhöhung gegenüber der SGF-Gruppe zeigte (4-fach). Diese Resultate finden sich ebenso in der Literatur. IL-8 als Inflammationsmarker zeigte im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe deutlich erhöhte Werte im Urin, die sowohl bei symptomatischen als auch bei asymptomatischen Bakteriurien auftraten (Ciszek *et al.*, 2006). Budde und Mitarbeiter (1997) wiesen in 62% aller Rejektionspatienten erhöhte Proteinkonzentrationen im Urin nach, zeigten aber, dass auch Infektionen der Harnwege die Konzentration im Urin erhöhten. Konträr verhalten sich die Ergebnisse von Diller und Mitarbeitern (2003), die keinen Zusammenhang zwischen den IL-8 Konzentrationen im Urin und akuten Rejektionen finden konnten. Schlussfolgernd ist IL-8 nicht als idealer Rejektionsmarker einzustufen, da er nur nach Ausschluss von Infektionen gut zu interpretieren ist.

5.4.6 IL-10

IL-10 wurde in der statistischen Analyse ebenfalls als Rejektionsmarker identifiziert. Allerdings liegen die Mediane aller 5 Patientengruppen unterhalb der Nachweisgrenze von 3,2 pg/ml und insgesamt waren auch nur 11 von 48 Proben (10 von 31 in der Rejektionsgruppe) der Transplantationsgruppen positiv für IL-10, was die Aussagekraft von IL-10 als Rejektionsmarker erheblich einschränkt. IL-10 zählt im Allgemeinen zu den antiinflammatorischen Molekülen. Allerdings konnte während einer akuten Abstoßung eine signifikant erhöhte Expression von IL-10-mRNA im Biopstat bereits nachgewiesen werden, was eine erhöhte Ausscheidung mit dem Urin begründen könnte (Strehlau *et al.*, 1997; Hribova *et al.*, 2005). Untersuchungen von IL-10 im Urin zeigten ebenso eine Korrelation zwischen erhöhten post-TX-Werten (2, 7, 14 und 30 Tagen post-TX) und einer akuten Abstoßung innerhalb der ersten 6 Monate. Die in dieser Studie ermittelten medianen Konzentrationen lagen zwischen 4,87 und 11,23 pg/ml (Karczewski *et al.*, 2009). Aufgrund der eingeschränkten Nachweisbarkeit in der vorliegenden Arbeit ist IL-10 nur bedingt ein verlässlicher Rejektionsmarker.

5.4.7 IP-10

IP-10 erwies sich in der Messreihe als Rejektionsmarker einen Tag vor Manifestation und als HWI-Marker, was durch frühere Untersuchungen von Matz und Mitarbeitern (2006) unterstützt wird. In diesen zeigte IP-10 bereits 6-7 Tage vor Beginn einer klinisch manifesten Rejektion erhöhte Werte im Urin und galt somit als Marker für eine

verminderte Langzeitfunktion der Niere. Ferner fanden sie allerdings keine Korrelation zu Harnwegsinfekten oder CMV-Infektionen. Die IP-10 Proteinwerte waren während eines HWI leicht erhöht, erreichten aber keinen signifikanten Unterschied zur Gruppe mit stabiler Transplantatfunktion. In der vorliegenden Arbeit zeigte IP-10 signifikant erhöhte Urinkonzentrationen (8,6-fach im Median) bei einer Entzündung der Harnwege allerdings im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe. Das spiegelt sich in den Untersuchungen von Olszyna und Mitarbeitern (1999) wider, die bei Patienten mit Urosepsis erhöhte Proteinkonzentrationen im Urin feststellten, während sie bei gesunden Probanden kein Protein nachweisen konnten. Anzumerken ist, dass in ihrer Arbeit in nur 40 % der Proben IP-10 überhaupt zu messen war (Detektionsgrenze: 120 pg/ml). Hu und Mitarbeiter (2009) untersuchten IP-10 in einem Quadruplex-Assay (Luminex™) mit drei weiteren Proteinen. Auch hier korrelierte der IP-10-Anstieg im Urin mit einer akuten Rejektion und konnte von Patienten mit einer stabilen Transplantatfunktion unterschieden werden. Allerdings wiesen auch BK-Virusinfektionen (humanes Polyomavirus) der Niere sowie akute Tubulusnekrosen (ATN) erhöhte Werte auf. IP-10 erwies sich in der vorliegenden Arbeit als guter Rejektionsmarker mit einem erheblichen Konzentrationsanstieg am ersten Tag der Rejektion im Median um das 27-fache, sowie bereits 2,6-fach einen Tag vorher. Mögliche Begleiterkrankungen oder Differentialdiagnosen sollten vorher aber ausgeschlossen werden.

5.4.8 MIF

MIF zeigte sich der statistischen Analyse entsprechend als potentieller Differenzierungsmarker mit im Median viermal höheren Werten in der SRAR im Vergleich zu der SSAR-Gruppe. Bereits 1977 wurde die MIF-Aktivität gemessen, da durch deren Erhöhung eine akute Abstoßung vermutet wurde (Orita *et al.*, 1977). Die Funktion von MIF während einer akuten Rejektion beschrieben Lan und Mitarbeiter (1998). Sie fanden eine erhöhte MIF-Expression in den Biopaten akuter Rejektionen, die mit der Makrophagen- und T-Zellinfiltration, dem Ausmaß des Funktionsverlustes und dem Schweregrad der Rejektion korrelierte. Auch im Urin konnte eine Erhöhung der MIF-Konzentration während einer Abstoßungsepisode festgestellt werden, allerdings war dieser Anstieg nicht signifikant. Die nicht erreichte Signifikanz wurde mit der geringen Patientenzahl [AR (n=11) und SGF (n=23)] und eventuellen subklinischen Rejektionen in der SGF-Gruppe erklärt, da die erhöhte MIF-Expression in den durchgeführten Biopsien eine deutlich erhöhte Urinkonzentration dieses Proteins vermuten ließ (Brown *et al.*, 2001). Eine Beeinflussung der Proteinmenge durch einen HWI konnte in der vorliegenden Arbeit nicht festgestellt werden. Die Ergebnisse erlauben durchaus den Schluss, MIF in ein Rejektionsmarker-Panel für weitere Untersuchungen aufzunehmen, auch wenn nur in der SRAR-Gruppe die Werte signifikant erhöht waren.

5.4.9 MIP-1 α

Das Chemokin MIP-1 α zeigte sich als Entzündungs- und Differenzierungsmarker mit 5,7-fachen (Median) Konzentrationsanstiegen in der SRAR-Gruppe im Vergleich zu der SSAR-Gruppe. *In-vitro*-Experimente an transplantierten Rattennieren zeigten einen Zusammenhang zwischen der mRNA-Expression von MIP-1 α und der Makrophageninfiltration während einer akuten Abstoßung (Grau *et al.*, 2000). Unter Verwendung humaner Biopate konnte ferner gezeigt werden, dass das Protein direkt von renalen Tubulusepithelzellen gebildet wird (Robertson *et al.*, 2000). Untersuchungen des Proteins im Urin mit Antikörper-Arrays, mit welchem 120 verschiedenen Zytokine und Chemokine gemessen wurden, zeigten jedoch nur eine geringe Expression. Allerdings war MIP-1 δ signifikant im Urin erhöht sowohl bei akuter als auch bei chronischer Rejektion (Hu *et al.*, 2009). In der Arbeit von Olszyna und Mitarbeitern (1999) zeigten gesunde Kontrollpersonen in keinem Fall MIP-1 α , auch nicht die Patienten mit Urosepsis, bei denen nur in 3 von 30 Urinproben überhaupt MIP-1 α -Protein nachweisbar war. Diese geringe Messbarkeit könnte durch die untere Detektionsgrenze von 78 pg/ml bedingt sein. Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Konzentrationen von MIP-1 α lagen nämlich deutlich darunter.

5.4.10 tPAI-1

PAI-1 erlaubte in der Patientengruppe der vorliegenden Arbeit im Median durch eine 6,9-fache Erhöhung am Tag der Rejektion sowie eine 4,3-fache Erhöhung der Konzentration am vorausgehenden Tag eine Unterscheidung zwischen einer akuten Rejektion und einer stabilen Transplantatfunktion. In der Literatur sind bisher noch keine Untersuchungen bezüglich einer messbaren Konzentration von PAI-1 im Urin erwähnt. Erhöhte Plasmawerte konnten im Zusammenhang mit einer chronischen Abstoßung, einhergehend mit einer vermehrten Fibrinablagerung, nachgewiesen werden (Perkowska *et al.*, 2002). Ferner konnte PAI-1 während einer chronischen Transplantatnephropathie (CAN) in größeren Proteinmengen in Tubuli, Glomeruli und Nierengefäßen angefärbt werden, die mit dem Grad der interstitiellen Fibrose korrelierten (Revelo *et al.*, 2005). De Boer und Mitarbeiter (1991) beobachteten die Induktion von PAI-1 in einer Leberzelllinie durch die rekombinanten Zytokine IL-1 und TNF. Zusätzlich wiesen Oda und Mitarbeiter (2001) chemotaktische Eigenschaften für Makrophagen nach. Die beschriebenen Eigenschaften legen in gewisser Weise nahe, dass PAI-1 auch schon während einer akuten Abstoßungsperiode in erhöhtem Maß exprimiert werden könnte. Die genaue Rolle von tPAI-1 während einer akuten Rejektion müssen zukünftige Experimente allerdings noch zeigen.

Die Arbeit von Roelofs und Mitarbeitern (2009) schreibt PAI-1 eine physiologische Aufgabe während einer Pyelonephritis zu. Knock-out Mäuse zeigten ein deutlich

gesteigertes bakterielles Wachstum als die Wildtyp-Mäuse. Diese Aussage erklärten die Autoren mit der positiven Korrelation von PAI-1-Protein und der Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in das entzündete Gebiet, welche die Fähigkeit besitzen die ursächlichen Bakterien (v.a. E.coli) zu phagozytieren. Eine erhöhte Ausschüttung in den Urin während eines HWI konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht festgestellt werden.

5.4.11 TNF- α

Statistisch wurde TNF- α als ein weiterer differenzierungsrelevanter Marker ermittelt. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass nur 4/21 in der SSAR-Gruppe und 7/10 Proben in der SRAR-Gruppe überhaupt nachweisbare Konzentrationen anzeigten und sich TNF- α daher als insgesamt ungeeigneter Marker erwies. Dies kann durch frühere Experimente bestätigt werden, in denen sogar nur 1/26 Urinproben von Patienten mit akuter Rejektion positiv für TNF- α waren (Newstead *et al.*, 1993). Zu vermuten ist, dass das Protein meist in Konzentrationen vorliegt, die lediglich unterhalb der Nachweisgrenze von 3,2 pg/ml liegen. Bestätigt wird diese Aussage durch die Untersuchungen von Karczewski und Mitarbeitern (2009). Diese fanden einen Zusammenhang zwischen erhöhten Urinkonzentrationen von TNF- α am 30. Tag post-TX und einer akuten Abstoßung innerhalb der ersten 6 Monate. Dabei ermittelten sie ebenfalls Konzentrationen zwischen 1,39 und 2,57 pg/ml.

5.4.12 sVCAM-1

Erstmals wurde der Nachweis von sVCAM-1 im Urin von Bechtel und Mitarbeitern (1994) beschrieben. Diese Autoren fanden einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Konzentration im Urin und der Heraufregulierung von mRNA im Transplantatbiopsat. Untersuchungen im Serum zeigten keine statistisch verlässliche Abhängigkeit zwischen sVCAM und einer Abstoßung (Alcalde *et al.*, 1995; Bricio *et al.*, 1996). Die jüngeren Untersuchungen von Lederer und Mitarbeitern (2003) zeigten sowohl in der SSAR als auch in der SRAR-Gruppe eine signifikante Erhöhung von sVCAM im Urin im Vergleich zur SGF-Gruppe. In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Unterschied bestätigt werden. Bereits einen Tag vor der klinischen Diagnose der Rejektion waren die sVCAM-Werte in der Rejektionsgruppe im Vergleich zur SGF-Gruppe erhöht. Ein Einfluss der Konzentrationen durch einen HWI konnte weder in der Literatur noch im Rahmen dieser Arbeit festgestellt werden.

5.5 Schlussfolgerung

Die Resultate der vorliegenden Arbeit führen zu dem Ergebnis, dass es möglich ist, mittels eines Multiplex-Assays Parameter im Urin zu bestimmen, die eine Differenzie-

rung zwischen einer stabilen Transplantatfunktion und einer akuten Rejektion erlauben und die Stärke einer akuten Rejektion anzeigen können. Das angewandte Verfahren präsentiert sich dabei als nicht-invasiv und routinetauglich. Die in der Literatur aufgeführten Aspekte zeigen, dass es durchaus sinnvoll ist, auf ein Panel an Markern zurückzugreifen, da jeweils unterschiedliche Informationen gewonnen werden können. Im Fall parallel verlaufender Erkrankungen (z.B. HWI) ist die Aussagekraft einiger Parameter herabgesetzt. Daher gilt es diese Erkrankungen anderweitig auszuschließen. Die Resultate haben auch gezeigt, dass es nicht von Nutzen ist, absolute Werte zu beurteilen und Schwellenwerte zu berechnen, da die interindividuellen Unterschiede zu groß sind. Vielmehr erwies es sich als sinnvoll, den täglichen Verlauf der einzelnen Parameter zu verfolgen und deutliche Konzentrationsanstiege als auffällig zu bewerten.

5.6 Ausblick und zukünftige Experimente

Die vorliegenden Ergebnisse lassen es notwendig erscheinen, diese Pilotstudie mit einer erheblich erhöhten Patientenzahl auf alle als rejektionsrelevant identifizierten Biomarker (IL-1 β , IL-1ra, IL-6, IL-8, IL-10, IP-10, MIF, MIP-1 α , sFas, sVCAM-1, TNF- α und tPAI-1) auszudehnen. Konkret sollte eine größere Anzahl von Patienten eingeschlossen werden, damit mehrere Gruppen gebildet werden können, um neben einem HWI auch andere mögliche Einflussfaktoren zu ermitteln bzw. auszuschließen. Dazu zählen die CMV-Infektion, die ATN oder die verzögerte Funktionsaufnahme des Transplantates. Parallel sollte die Bedeutung von PAI-1 und sFas während einer akuten Rejektion untersucht werden. Da die Auswahl der in dieser Arbeit gemessenen Parameter durch den Hersteller beschränkt war, ist es sinnvoll in zukünftigen Studien weitere Parameter zu untersuchen und eventuell in das Rejektionspanel aufzunehmen.

Entsprechend den in der vorliegenden Arbeit generierten Daten, sollte es möglich sein, dieses Verfahren in die tägliche Routinediagnostik einzuführen, um die bisherige laborchemische Diagnostik zu ergänzen und von der invasiven Methode der Biopsie unter Umständen komplett Abstand nehmen zu können.

6 Zusammenfassung

Die akute Abstoßungsepisode ist eine häufige Komplikation nach Nierentransplantation, die bis zum Verlust des Organs führen kann. Zur Diagnose wird in den meisten Transplantationszentren noch immer die Transplantatbiopsie als Goldstandard durchgeführt. Ziel dieser Arbeit war es daher, eine routinetaugliche, nicht-invasive Multiparameteranalyse zu etablieren, die es ermöglicht, verschiedene rejektionsrelevante immunologische Faktoren im Urin zu messen, um akute Rejektionen frühzeitig zu erkennen und gegebenenfalls diese zu differenzieren (Steroid-sensitiv und Steroid-resistent). Damit sollten Risikopatienten für eine Steroid-resistente Abstoßung erkannt werden, um die Rejektionstherapie individuell anzupassen.

Dazu wurden Urinproben von 54 Patienten täglich über den Zeitraum vom Tag der Transplantation bis zum Entlassungstag gesammelt. Anhand klinischer und laborchemischer Parameter (u.a. C-reaktives Protein [CRP], Urin-CRP, Serum-Kreatinin) sowie der erhaltenen Medikation ließen sich die Patienten retrospektiv in drei Gruppen einteilen: (i) Patienten mit stabiler Transplantatfunktion (SGF), (ii) Patienten mit Steroid-sensitiver akuter Rejektion (SSAR) und (iii) Patienten mit Steroid-resistenter akuter Rejektion (SRAR). Zusätzlich bildeten 14 gesunde Probanden und 14 Patienten mit einem Harnwegsinfekt die Kontrollgruppen.

Mit Luminex™-Multiplexassays wurden die Konzentrationen folgender 23 Parameter im Urin bestimmt: Interleukin-1alpha (IL-1 α), Interleukin-1beta (IL-1 β), Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist (IL-1ra), die Interleukine (IL)-2, -6, -7, -8, -10, -13, -15 und -17, Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), Makrophagen-Migrations-Inhibierender Faktor (MIF), Interferon-gamma (IFN- γ), Interferon gamma induziertes Protein-10 (IP-10), Makrophagen Inflammatorisches Protein-1alpha (MIP-1 α), lösliches Fibroblasten assoziiertes Protein (sFas) und sein Ligand (FasL), Myeloperoxidase (MPO), lösliches Endothel-Selectin (sE-Selectin), lösliches interzelluläres und vaskuläres Adhäsionsmolekül-1 (sICAM-1, sVCAM-1) sowie gesamter Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (tPAI-1). Mit einem *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) wurde außerdem überprüft, ob sCD30 im Urin als Rejektionsmarker zu detektieren ist.

Die statistische Analyse ergab, dass die Urinkonzentrationen von IL-6, IL-8, sVCAM-1, sFas, IL-1ra, IL-10, IL-1 β , IP-10 und tPAI-1 bei den Abstoßungspatienten am Tag der klinischen Manifestation signifikant höher waren im Vergleich zu Patienten mit stabiler Transplantatfunktion. IL-6, IL-8, sVCAM-1, sFas, IL-1ra, IP-10 und tPAI-1 waren bereits einen Tag vorher erhöht. Die Parameter sFas, TNF- α , MIF und MIP-1 α ermöglichten zusätzlich eine Unterscheidung zwischen Steroid-sensitiver und Steroid-resistenter Rejektion. So konnten signifikant höhere Konzentrationen dieser Parameter in der SRAR-Gruppe als in der SSAR-Gruppe gemessen werden. Die Auswertung der

Kontrollgruppen belegten, dass IL-8, sFas, IL-1ra, IL-1 α , IP-10 und MIP-1 α einen Harnwegsinfekt markieren. Trotzdem ist die Bedeutung dieser Parameter als Rejektions- bzw. Differenzierungsmarker nicht aufgehoben, da sich die Konzentrationen in allen drei Transplantations- sowie der beiden Kontrollgruppen deutlich unterschieden. Die Proteine MPO, IL-2, -7, -13, -17 und sE-Selectin waren in dem durch den Hersteller vorgegebenen Konzentrationsbereich grundsätzlich nicht messbar. sICAM-1, sFasL und IL-15 mussten als unspezifische Marker eingestuft werden, da vergleichbare Werte in allen drei Transplantationsgruppen gemessen wurden. sCD30 konnte lediglich in den Urinproben mit Blutkontaminationen nachgewiesen werden und schied damit im Rahmen dieser Arbeit als im Urin nachweisbarer Parameter aus.

Große individuelle Unterschiede führten zu dem Schluss, dass es nicht sinnvoll ist, absolute Konzentrationswerte zu beurteilen, sondern eher den täglichen Verlauf der Parameter zu verfolgen und deutliche Konzentrationsanstiege als auffällig zu bewerten.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass es durchaus möglich ist, mittels eines Multiplex-Assays Parameter im Urin zu bestimmen, die eine Differenzierung zwischen einer stabilen Transplantatfunktion und einer akuten Rejektion erlauben und zusätzlich die Stärke einer akuten Abstoßung anzeigen. Das angewandte Verfahren präsentiert sich dabei als nicht invasiv und routinetauglich. Daher sollte es möglich sein, dieses Verfahren in die tägliche Routinediagnostik einzuführen, und mit ihm die bisherige laborchemische Diagnostik zu ergänzen. Als Fernziel besteht damit unter Umständen die Möglichkeit, von der invasiven Methode der Biopsie komplett Abstand nehmen zu können.

7 Literaturverzeichnis

Alcalde G, Merino J, Sanz S, Zubimendi JA, Ruiz JC, Torrijos J, de Francisco AL, Cortoruelo JG, Lopez-Hoyos M, Novo MJ (1995) Circulation adhesion molecules during kidney allograft rejection. *Transplantation* 59:1695–1699.

Alderson MR, Armitage RJ, Maraskovsky E, Tough TW, Roux E, Schooley K, Ramsdell F, Lynch DH (1993) Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *J Exp Med* 178:2231–2235.

Allison AC, Eugui EM (2000) Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 47:85–118.

Araki M, Fahmy N, Zhou L, Kumon H, Krishnamurthi V, Goldfarb D, Modlin C, Flechner S, Novick AC, Fairchild RL (2006) Expression of IL-8 during reperfusion of renal allografts is dependent on ischemic time. *Transplantation* 81:783–788.

Arend WP (1993) Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol* 54:167–227.

Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C (1998) Interleukin-1 receptor antagonist: Role in biology. *Annu Rev Immunol* 16:27–55.

Banasik M, Klinger M (2006) Chronic allograft nephropathy - immunologic and nonimmunologic factors. *Ann Transplant* 11:7–10.

Bechtel U, Scheuer R, Landgraf R, König R, Feucht HE (1994) Assessment of soluble molecules (sICAM-1, sVCAM-1, sELAM-1) and complement cleavage products (sC4d, sC5b-9) in urine. Clinical monitoring of renal allograft recipients. *Transplantation* 58:905–911.

Bernhagen J, Bacher M, Calandra T, Metz CN, Doty SB, Donnelly T, Bucala R (1996) An essential role of macrophage migration inhibitory factor in the tuberculin delayed-type hypersensitivity reaction. *J Exp Med* 183:277–282.

Beutler B, Mahony J, Le Trang N, Pekala P, Cerami A (1985) Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced raw 264.7 cells. *J Exp Med* 161:984–995.

Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR (1984) Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. *J Exp Med* 160:618-623

Bevilacqua MP, Nelson RM (1993) Selectins. *J Clin Invest* 91:379–387.

Bodonyi-Kovacs G, Putheti P, Marino M, Abihingsanon Y, Uknis ME, Monaco AP, Strom TB, Pavlakis M (2010) Gene expression profiling of the donor kidney at the time of transplantation predicts clinical outcomes 2 years after transplantation. *Hum Immunol* 71:451–455.

de Boer JP, Abbink JJ, Brouwer MC, Meijer C, Roem D, Voorn GP, Lambers JW, van Mourik JA, Hack CE (1991) PAI-1 synthesis in the human hepatoma cell line HepG2 is increased by cytokines - evidence that the liver contributes to acute phase behaviour of PAI-1. *Thromb Haemost* 65:181–185.

Bonnefoy-Bérard N, Vincent C, Revillard J (1991) Antibodies against functional leukocyte surface molecules in polyclonal antilymphocyte and antithymocyte globulins. *Transplantation* 51:669–673.

Boonstra JG, van der Woude FJ, Wever PC, Laterveer JC, Daha MR, van Kooten C (1997) Expression and function of Fas (CD95) on human renal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 8:1517–1524.

Bricio T, Rivera M, Molina A, Martin A, Burqos J, Mampaso F (1996) Soluble adhesion molecules in renal transplantation. *Ren Fail* 18:75–83.

Brockmeyer C, Ulbrecht M, Schendel DJ, Weiss EH, Hillebrand G, Burkhardt K, Land W, Gokel MJ, Riethmüller G, Feucht HE (1993) Distribution of cell adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1) in renal tissue during allograft rejection. *Transplantation* 55:610–615.

Bromberg JS, (1995) IL-10 immunosuppression in transplantation. *Curr Opin Immunol* 7:639–643.

Brown FG, Nikolic-Paterson DJ, Chadban SJ, Dowling J, Jose M, Metz CN, Bucala R, Atkins RC (2001) Urine macrophage migration inhibitory factor concentrations as a diagnostic tool in human renal allograft rejection. *Transplantation* 71:1777–1783.

Budde K, Waiser J, Ceska M, Katalinic A, Kürzdörfer M, Neumayer HH (1997) Interleukin-8 expression in patients after renal transplantation. *Am J Kidney Dis* 29:871–880.

Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, Cerami A, Bucala R (1995) MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* 377:68–71.

- Cambiaggi A, Cantoni C, Marciano S, De Toter D, Pileri S, Tazzari PL, Stein H, Ferrini S (1993) Cultured human NK cells express the Ki-1/CD30 antigen. *Br J Haematol* 85:270–276.
- Candela JV, Park E, Gerspach JM, Davidoff R, Stout L, Levy SM, Leach GE, Bellman GC, Lad PM (1998) Evaluation of urinary IL-1 α and IL-1 β in gravid females and patients with bacterial cystitis and microscopic hematuria. *Urol Res* 26:175–180.
- Carson WE, Giri JG, Lindemann MJ, Linett ML, Ahdieh M, Paxton R, Anderson D, Eisenmann J, Grabstein K, Caligiuri MA (1994) Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med* 180:1395–1403.
- Casiraghi F, Ruggenenti P, Noris M, Locatelli G, Perico N, Perna A, Remuzzi G (1997) Sequential monitoring of urine - soluble interleukin 2 receptor and interleukin 6 predicts acute rejection of human renal allografts before clinical or laboratory signs of renal dysfunction. *Transplantation* 63:1508–1514.
- Chan RD, Greenstein SM, Tellis V, Corey HE (1993) Renal tubular cells express ICAM-1 during allograft rejection. *Transplant Proc* 25:915–916.
- Ciszek M, Paczek L, Bartlomiejczyk I, Mucha K (2006) Urine cytokines profile in renal transplant patients with asymptomatic bacteriuria. *Transplantation* 81:1653–1657.
- Clarke W, Silverman BC, Zhang Z, Chan DW, Klein AS, Molmenti EP (2003) Characterization of renal allograft rejection by urinary proteomic analysis. *Ann Surg* 237:660–665.
- Cockwell P, Calderwood JW, Brooks CJ, Chakravorty SJ, Savage CO (2002) Chemoattraction of T cells expressing CCR5, CXCR3 and CX3CR1 by proximal tubular epithelial cell chemokines. *Nephrol Dial Transplant* 17:734–744.
- Colak T, Sevmis H, Karakayali H, Moray G, Haberal M (2008) One center's experience with antithymocyte globulin treatment for acute rejection in renal transplantation. *Transplant Proc* 40:123–125.
- Curtis JJ, Julian BA, Sanders CE, Herrera GA, Gaston RS (1996) Dilemmas in renal transplantation: when the clinical course and histological findings differ. *Am J Kidney Dis* 27:435–440.

- Damle NK, Klussman K, Linsley PS, Aruffo A (1992) Differential costimulatory effects of adhesion molecules B7, ICAM-1, LFA-3, and VCAM-1 on resting and antigen-primed CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 148:1985–1992.
- Davatelis G, Tekamp-Olson P, Wolpe SD, Hermsen K, Luedke C, Gallegos C, Coit D, Merryweather J, Cerami A (1988) Cloning and characterization of a cDNA for murine macrophage inflammatory protein (MIP), a novel monokine with inflammatory and chemokinetic properties. *J Exp Med* 167:1939–1944.
- Defrance T, Carayon P, Billian G, Guillemot J, Minty A, Caput D, Ferrara P (1994) Interleukin 13 is a B cell stimulating factor. *J Exp Med* 179:135–143.
- Diller R, Palmes D, Dietl KH, Senninger N, Winde G, Spiegel HU (2003) Interleukin-6, interleukin-8, and interleukin-10 in kidney transplantation: Improved risk strategy? *Transplant Proc* 35:1333–1337.
- Dinarello CA, Wolff SM (1993) The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med* 328:106–113.
- Dong W, Shunliang Y, Weizhen W, Qinghua W, Zhangxin Z, Jianming T, He W (2006) Prediction of acute renal allograft rejection in early post-transplantation period by soluble CD30. *Transpl Immunol* 16:41–45.
- Durie FH, Foy TM, Masters SR, Laman JD, Noelle RJ (1994) The role of CD40 in the regulation of humoral and cell-mediated immunity. *Immunol today* 15:406–411.
- Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA (1986) Induction by IL 1 and interferon- γ : tissue distribution biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 137:245–254.
- Eismann R, Konert J, Schabel J: Nierentransplantation: ein Ratgeber für Patienten und Angehörige. 4. Aufl. TRIAS, Stuttgart, 2004, S. 41-47.
- Elices MJ, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyj S, Hemler ME, Lobb RR (1990) VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 60:577–584.
- Ellis TM, Simms PE, Slivnick DJ, Jäck HM, Fisher RI (1993) CD30 is a signal-transducing molecule that defines a subset of human activated CD45RO+ T cells. *J Immunol* 151:2380–2389.
- Espinoza-Delgado I, Bosco MC, Musso T, Gusella GL, Longo DL, Varesio L (1995) Interleukin-2 and human monocyte activation. *J Leukoc Biol* 57:13–19.

Eurotransplant International Foundation - Leiden: Annual Report 2009 edited by Osterlee A and Rahmel A, pp.38-39, abgerufen am 20.07.2010 unter http://www.eurotransplant.org/files/annual_report/ar_2009.pdf

Fahey TJ 3rd, Tracey KJ, Tekamp-Olson P, Cousens LS, Jones WG, Shires GT, Cerami A, Sherry B (1992) Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function. *J Immunol* 148:2764–2769.

Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G, Burkhardt K, Weiss M, Riethmüller G, Land W, Albert E (1993) Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int* 43:1333–1338.

Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR (1989) Two types of mouse T helper cell IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170:2081–2095.

Fischer K, Hamza A, Eismann R, Amoury M, Heynemann H, Fornara P (2001) Differential diagnostic use of interleukin patterns in patients being monitored after transplantation. *Clinica Chimica Acta* 310:71–80.

Fossiez F, Djossou O, Chomarar P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin J, Garonne P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D *et al.* (1996) T Cell Interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 183:2593–2603.

Furness PN, Philpott CM, Chorbajian MT, Nicholson ML, Bosmans J, Corthouts BL, Bogers JJ, Schwarz A, Gwinner W, Haller H, Mengel M, Seron D, Moreso F, Canas C (2003) Protocol biopsy of the stable renal transplant: A multicenter study of methods and complication rates. *Transplantation* 76:969–973.

Gabay C, Smith MF, Eidlen D, Arend WP (1997) Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra) is an acute-phase protein. *J Clin Invest* 99:2930–2940.

Grabstein KH, Eisenmann J, Shanebeck K, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, Beers C, Richardson J, Schoenborn MA, Ahdieh M (1994) Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 264:965–968.

Grau V, Gemsa D, Steiniger B, Garn H (2000) Chemokine expression during acute rejection of rat kidneys. *Scand J Immunol* 51:435–440.

Graziotto R, Del Prete D, Rigotti P, Anglani F, Baldan N, Furian L, Valente M, Antonello A, Marchini F, D'Angelo A; Gambaro, G (2006) Perforin, Granzyme B, and fas ligand for molecular diagnosis of acute renal-allograft rejection: analyses on serial biopsies suggest methodological issues. *Transplantation* 81:1125–1132.

Gruss HJ, Boiani N, Williams DE, Armitage RJ, Smith CA, Goodwin RG (1994) Pleiotropic effects of the CD30 ligand on CD30-expressing cells and lymphoma cell lines. *Blood* 83:2045–2056.

Hamza A, Kielwagen L, Wicht A, Loertzer H, Rettkowski O, Fischer K, Fornara P (2006) Wertigkeit der Transplantatbiopsie im Vergleich zur laborchemischen Diagnostik der akuten Rejektion bei Z. n. Nierentransplantation. *Transplantationsmedizin* 18:62–66.

Hansen HP, Dietrich S, Kisseleva T, Mokros T, Mentlein R, Lange HH, Murphy G, Lemke H (2000) CD30 shedding from Karpas 299 lymphoma cells is mediated by TNF-alpha-converting enzyme. *J Immunol* 165:6703–6709.

Hedges S, Anderson P, Lidin-Janson G, de Man P, Svanborg C (1991) Interleukin-6 response to deliberate colonization of the human urinary tract with gram-negative bacteria. *Infect Immun* 59:421–427.

Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T (1990) Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol today* 11:443–449.

HKUPP (Human Kidney & Urine Proteome Project) – Standard protocol for urine collection and storage (applicable for the analysis of soluble urine proteins; not for exosome analysis). abgerufen am 29.07.2010 unter <http://www.hkupp.org/Urine%20collectiion%20Documents.htm>

Horii Y, Muraguchi A, Iwano M, Matsuda T, Hirayama T, Yamada H, Fujii Y, Dohi K, Ishikawa H, Ohmoto Y (1989) Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J Immunol* 143:3949–3955.

Hribova P, Kotsch K, Brabcova I, Vitko S, Volk HD, Lacha J (2005) Cytokines and chemokine gene expression in human kidney transplantation. *Transplant Proc* 37:760–763.

Hu H, Kwun J, Aizenstein BD, Knechtle SJ (2009) Noninvasive detection of acute and chronic injuries in human renal transplant by elevation of multiple cytokines/chemokines in urine. *Transplantation* 87:1814–1820.

Hume DM, Magee JH, Kauffman Jr HM, Rittenbury MS, Prout Jr GR (1963) Renal homotransplantation in man in modified recipients. *Ann Surg* 158:608–644.

Janeway CA: *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 5th ed. Garland Science, New York u.a., 2001, pp. 76, 214

Jiang Q, Li WQ, Aiello FB, Mazzucchelli R, Asefa B, Khaled AR, Durum SK (2005) Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16:513–533.

Joosten SA, Sijpkens YW, van Kooten C, Paul LC (2005) Chronic renal allograft rejection: Pathophysiologic considerations. *Kidney Int* 68:1–13.

Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, Mineau F, Pelletier J (1998) IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL- β and TNF- α , by human macrophages. *J Immunol* 160:3513–3521.

Kaden J, Priesterjahn R (2000) Increasing urinary IL-6 levels announce kidney graft rejection. *Transpl Int* 13:S34-41.

Karczewski J, Karczewski M, Glyda M, Wiktorowicz K (2008) Role of TH1/TH2 cytokines in kidney allograft rejection. *Transplant Proc* 40:3390–3392.

Karczewski M, Karczewski J, Poniedzialek B, Wiktorowicz K, Glyda M (2009) Cytometric analysis of TH1/TH2 cytokines in the urine of patients undergoing kidney transplantation. *Ann Transplant* 14:25–28.

Kaye J, Gillis S, Mizel SB, Shevach EM, Malek TR, Dinarello CA, Lachmann LB, Janeway CA (1984) Growth of a cloned helper T cell line induced by a monoclonal antibody specific for the antigen receptor: Interleukin 1 is required for the expression of receptors for interleukin 2. *J Immunol* 133:1339–1345.

Kirchner G, Krämer B, Schlitt H: *Immunsuppression nach Nierentransplantation*. 1. Aufl. UNI-MED, Bremen, 2007, S. 50-57.

Kjoller L, Kanse SM, Kirkegaard T, Rodenburg KW, Ronne E, Goodman SL, Preissner KT, Ossowski L, Andreasen PA (1997) Plasminogen activator inhibitor-1 represses integrin- and vitronectin-mediated cell migration independently of its function as an inhibitor of plasminogen activation. *Exp Cell Res* 232:420–429.

Klebanoff SJ (2005) Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 77:598–625.

Krieger NR, Becker BN, Heisey DM, Voss BJ, D'Alessandro AM, Becker YT, Odorico JS, Kalayoglu M, Pirsch JD, Sollinger HW *et al.* (2003) Chronic allograft nephropathy uniformly affects recipients of cadaveric, nonidentical living-related, and living-unrelated grafts. *Transplantation* 75:1677–1682.

Kutukculer N, Clark K, Rigg KM, Forsythe JL, Proud G, Taylor RM, Shenton BK (1995) The value of posttransplant monitoring of interleukin (IL)-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, and soluble CD23 in the plasma of renal allograft recipients. *Transplantation* 59:333–340.

Labarrere CA, Nelson DR, Miller SJ, Nieto JM, Conner JA, Pitts DE, Kirilin PC, Halbrook HG (2000) Value of serum-soluble intercellular adhesion molecule-1 for the noninvasive risk assessment of transplant coronary artery disease, posttransplant ischemic events, and cardiac graft failure. *Circulation* 102:1549–1555.

Lachmann N, Terasaki PI, Budde K, Liefeldt L, Kahl A, Reinke P, Pratschke J, Rudolph B, Schmidt D, Salama A, Schönemann C (2009) Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. *Transplantation* 87:1505–1513.

Lan HY, Yang N, Brown FG, Isbel NM, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Metz CN, Bacher M, Atkins RC, Bucala R (1998) Macrophage migration inhibitory factor expression in human renal allograft rejection. *Transplantation* 66:1465–1471.

Larsen CG, Anderson AO, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K (1989) The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science* 243:1464–1466.

Lasmar EP, Lasmar MF, Lasmar LF, Giordano LF, Lucas F, Borges JM (2005) Progression of the renal graft: Treatment of acute rejection based on a biopsy against a presumptive diagnosis. *Transplant Proc* 37:2775–2776.

Laupacis A, Keown P, Pus N, Krueger H, Ferguson B, Wong C, Muirhead N (1996) A study of the quality of life and cost-utility of renal transplantation. *Kidney Int* 50:235–242.

Leca G, Mansur SE, Bensussan A (1995) Expression of VCAM-1 (CD106) by a subset of TCR gamma delta-bearing lymphocyte clones. Involvement of a metalloprotease in the specific hydrolytic release of the soluble isoform. *J Immunol* 154:1069–1077.

Lederer SR, Friedrich N, Regenbogen C, Getto R, Toepfer M, Sitter T (2003) Non-invasive monitoring of renal transplant recipients: urinary excretion of soluble adhesion molecules and of the complement-split product C4d. *Nephron Clin Pract* 94:c19-26.

- Lennard AC (1995) Interleukin-1 receptor antagonist. *Crit Rev Immunol* 15:77–105.
- Levi M, de Jonge E, van der Poll T (2003) Sepsis and disseminated intravascular coagulation. *J Thromb Thrombolysis* 16:43-47.
- Linsley PS, Ledbetter JA (1993) The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol* 11:191–212.
- Loong CC, Hsieh HG, Lui WY, Chen A, Lin CY (2002) Evidence for the early involvement of interleukin 17 in human and experimental renal allograft rejection. *J Pathol* 197:322–332.
- López-Hoyos M, Segundo DS, Fernández-Fresnedo G, Marín MJ, González-Martín V, Arias M (2009) Regulatory T cells in renal transplantation and modulation by immunosuppression. *Transplantation* 88:S31-39.
- Loskutoff DJ, Edgington TS (1981) An inhibitor of plasminogen activator in rabbit endothelial cells. *J Biol Chem* 256:4142–4145.
- Luster AD, Unkeless JC, Ravetch JV (1985) Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature* 315:672–676.
- Luster AD (1998) Chemokines - Chemotactic cytokines that mediate inflammation. *New Engl J Med* 338:436–445.
- Lyons PD, Benveniste EN (1998) Cleavage of membrane-associated ICAM-1 from astrocytes: involvement of a metalloprotease. *Glia* 22:103–112.
- Malek TR (2008) The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol* 26:453–479.
- Männel DN, Moore RN, Mergenhagen SE (1980) Macrophages as a source of tumoricidal activity (Tumor Necrotizing Factor). *Infect Immun* 30:523–530.
- Martin DC (1970) Circulation antibodies in renal transplant recipients. *Calif Med* 112:51
- Matsuno T, Sasaki H, Nakagawa K, Okada Y, Endo A, Fujiwara T, Oishi M, Saito S, Yagi T, Haisa M; Tanaka, N (1998) Expression of Fas/Fas Ligand and apoptosis induction during renal allograft rejection. *Transplant Proc* 30:2947–2949.
- Matz M, Beyer J, Wunsch D, Fashreghi MF, Seiler M, Pratschke J, Babel N, Volk HD, Reinke P, Kotsch K (2006) Early post-transplant urinary IP-10 expression after kidney transplantation is predictive of short- and long-term graft function. *Kidney Int* 69:1683–1690.

Mauiyyedi S, della Pelle P, Saidman S, Collins AB, Pascual M, Tolkoff-Rubin NE, Williams WW, Cosimi AB, Schneeberger EE (2001) Chronic humoral rejection: Identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 12:574–582.

Maury CP, Teppo AM (1987) Raised serum levels of cachectin/ tumor necrosis factor alpha in renal allograft rejection. *J Exp Med* 166:1132–1137.

Morange PE, Alessi MC, Verdier M, Casanova D, Magalon G, Juhan-Vague I (1999) PAI-1 produced ex vivo by human adipose tissue is relevant to PAI-1 blood level. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1361–1365.

Munker R, Koeffler HP (1987) Tumor necrosis factor: Recent advances. *Klin Wochenschr* 65:345–352.

Newstead CG, Lamb WR, Brenchley PE, Short CD (1993) Serum and urine IL-6 and TNF-alpha in renal transplant recipients with graft dysfunction. *Transplantation* 56:831–835.

Nickeleit V, Vamvakas EC, Pascual M, Poletti BJ, Colvin RB (1998) The prognostic significance of specific arterial lesions in acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 9:1301–1308.

Oda T, Jung YO, Kim HS, Cai X, López-Guisa JM, Ikeda Y, Eddy AA (2001) PAI-1 deficiency attenuates the fibrogenic response to ureteral obstruction. *Kidney Int* 30:587–596.

van Oers MH, Van der Heyden AA, Arden LA (1988) Interleukin 6 (IL-6) in serum and urine of renal transplant recipients. *Clin Exp Immunol* 71:314–319.

Ohta K, Takano N, Seno A, Yachie A, Miyawaki T, Yokoyama H, Tomosugi N, Kato E, Taniguchi N (1992) Detection and clinical usefulness of urinary interleukin-6 in the disease of the kidney and the urinary tract. *Clin Nephrol* 38:185–189.

Oliveira G, Xavier P, Murphy B, Neto S, Mendes A, Sayegh MH, Guerra LE (1998) Cytokine analysis of human renal allograft aspiration biopsy cultures supernatants predicts acute rejection. *Nephrol Dial Transplant* 13:417–422.

Olszyna DP, Prins JM, Dekkers PE, De Jonge E, Speelman P, Van Deventer SJ, Van der Poll T (1999) Sequential measurements of chemokines in urosepsis and experimental endotoxemia. *J Clin Immunol* 19:399–405.

Oppenheim JJ, Kovacs EJ, Matsushima K, Durum SK (1986) There is more than one interleukin 1. *Immunol Today* 7:45–56.

Orita K, Sakagami K, Fuchimoto S, Arima T, Tanaka S (1977) Early diagnosis of acute renal allograft rejection: efficacy of macrophage migration inhibition test as an immunological diagnosis. *Acta med Okayama* 31:177–186.

Ortiz-Arduan A, Danoff TM, Kalluri R, González-Cuadrado S, Karp SL, Elkon K, Eqido J, Neilson EG (1996) Regulation of Fas and Fas ligand expression in cultured murin renal cells and in the kidney during endotoxemia. *Am J Physiol* 271:F1193-1202.

Osborn L, Hession C, Tizard R, Vassallo C, Lühowskyj S, Chi-Rosso G, Lobb R (1989) Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 59:1203–1211.

Di Paolo S, Gesualdo L, Stallone G, Ranieri E, Schena FP (1997) Renal expression and urinary concentration of EGF and IL-6 in acutely dysfunctioning kidney transplanted patients. *Nephrol Dial Transplant* 12:2687–2693.

Park SJ, Goo JM, Jo CH (2004) Receiver operating characteristic (ROC) curve: practical review for radiologists. *Korean J Radiol* 5:11-18

Pavlakakis M, Strehlau J, Lipman M, Shapiro M, Maslinski W, Strom TB (1996) Intra-graft IL-15 transcripts are increased in human renal allograft rejection. *Transplantation* 62:543–545.

Pellegrini P, Totaro R, Contasta I, Berghella AM, Carolei A, Adorno D (2005) CD30 antigen and multiple sclerosis: CD30, an important costimulatory molecule and marker of a regulatory subpopulation of dendritic cells, is involved in the maintenance of the physiological balance between TH1/TH2 immune response and tolerance. The role of IFN β -1a in the treatment of multiple sclerosis. *Neuroimmunomodulation* 12:220–234.

Perkowska A, Elhasade A, Durlak M, Placha G (2002) The effect of chronic allograft rejection on plasma regulators of fibrinolysis. *Ann Transplant* 7:44–51.

duPont NC, Wang K, Wadhwa PD, Culhane JF, Nelson EL (2005) Validation and comparison of luminex multiplex cytokine analysis kits with ELISA: determinations of a panel of nine cytokines in clinical sample culture supernatants. *J Reprod Immunol* 66:175–191.

Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, Croker BP, Demetris AJ, Drachenberg CB, Fogo AB *et al.* (1999) The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 55:713–723.

Revelo MP, Federspiel C, Helderma H, Fogo AB (2005) Chronic allograft nephropathy: expression and localization of PAI-1 and PPAR- γ . *Nephrol Dial Transplant* 20:2812–2819.

Rice GE, Munro JM, Bevilacqua MP (1990) Inducible cell adhesion molecule 110 (IN-CAM-110) is an endothelial receptor for lymphocytes. A CD11/CD18-independent adhesion mechanism. *J Exp Med* 171:1369–1374.

Rice GE, Munro JM, Corless C, Bevilacqua MP (1991) Vascular and nonvascular expression of INCAM-110. *Am J Pathol* 138:385–393.

Rieckmann P, Michel U, Albrecht M, Brück W, Wöckel L, Felgenhauer K (1995) Soluble forms of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) block lymphocyte attachment to cerebral endothelial cells. *J Neuroimmunol* 60:9–15.

Roberti I, Reisman L (2001) Serial evaluation of cell surface markers for immune activation after acute renal allograft rejection by urine flow cytometry. *Transplantation* 71:1317–1320.

Robertson H, Morley AR, Talbot D, Callanan K, Kirby JA (2000) Renal allograft rejection: beta-chemokine involvement in the development of tubulitis. *Transplantation* 69:684–687.

Roelofs JJ, Teske GJ, Bonta (2009) Plasminogen activator inhibitor-1 regulates neutrophil influx during acute pyelonephritis. *Kidney Int* 75:52–59.

Rothlein R, Dustin ML, Marlin SD, Springer TA (1986) A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol* 137:1270–1274.

Sandovici M, Henning RH, van Goor H, Helfrich W, de Zeeuw D, Deelman LE (2008) Systemic gene therapy with interleukin-13 attenuates renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* 73:1364–1373.

Sauder DN, Mounessa NL, Katz SI, Dinarello CA, Gallin JI (1984) Chemotactic cytokines: The role of leukocytic pyrogen and epidermal cell thymocyte-activation factor in neutrophil chemotaxis. *J Immunol* 132:828–832.

Sayegh MH, Turka LA (1998) The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med* 338:1813–1821.

Schlöndorff D, Nelson PJ, Luckow B, Banas B (1997) Chemokines and renal disease. *Kidney Int* 51:610–621.

Schmouder RL, Strieter RM, Wiggins RC, Chensue SW, Kunkel SL (1992) In vitro and in vivo interleukin-8 production in human renal cortical epithelia. *Kidney Int* 41:191–198.

Schreiber SL, Crabtree GR (1992) The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol today* 13:136–142.

Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75:163–189.

Schuler W, Sedrani R, Cottens S, Häberlin B, Schulz M, Schuurman H, Zenke G, Zerwes H, Schreier MH (1997) SDZ RAD, a new rapamycin derivative: pharmacological properties in vitro and in vivo. *Transplantation* 64:36–42.

Schwab U, Stein H, Gerdes J, Lemke H, Kirchner H, Schaadt M, Diehl V (1982) Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg-Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. *Nature* 299:65–67.

Schwarz A, Gwinner W, Hiss M, Radermacher J, Mengel M, Haller H (2005) Safety and adequacy of renal transplant protocol biopsies. *Am J Transplant* 5:1992–1996.

Shanebeck KD, Maliszewski CR, Kennedy MK, Picha KS, Smith CA, Goodwin RG, Grabstein KH (1995) Regulation of murine B cell growth and differentiation by CD30 ligand. *Eur J Immunol* 25:2147–2153.

Smith CW, Martin SD, Rothlein R, Toman C, Anderson DC (1989) Cooperative interaction of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J Clin Invest* 83:2008–2017.

Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, Campbell PM, Cascalho M, Collins AB, Demetris AJ *et al.* (2007) Banff '05 Meeting Report: Differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy (CAN). *Am J Transplant* 7:518–526.

Span PN, Witjes JA, Grebenchtchikov N, Geurts-Moespot A, Moonen PM, Aalders TW, Vriesema JL, Kiemeneij LA, Schalken JA, Sweep FC (2008) Components of the plasminogen activator system and their complexes in renal cell and bladder cancer: comparison between normal and matched cancerous tissues. *BJU Int* 102:177–182.

Stanciu LA, Roberts K, Lau LC, Coyle AJ, Johnston SL (2001) Induction of type 2 activity in adult human CD8+ T cells by repeated stimulation and IL-4. *Int Immunol* 13:341–348.

Statistisches Bundesamt Deutschland – Neue Modellrechnung zur Lebenserwartung für Geburtsjahrgänge. abgerufen am 20.07.2010 unter http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2006/04/PD06__167__12621.psm1

Steinhoff J, Bühner U, Feddersen A, Wood WG, Preuss R, Fricke L, Faerber P, Dodt C, Hoyer J, Sack K (1992) C-reactive protein in the urine. The differential diagnosis of renal functional disorders following kidney transplantation. *Dtsch Med Wochenschr* 117:894–899.

Steinhoff J, Einecke G, Niederstadt C, de Groot K, Fricke L, Machnik H, Sack K (1997) Renal graft rejection or urinary tract infection? The value of Myeloperoxidase, C-reactive protein, and alpha2-Macroglobulin in the urine. *Transplantation* 64:443–447.

Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, Shapiro M, Vasconcellos L (1997) Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci* 94:695–700.

Sui W, Huang L, Dai Y, Chen J, Yang Q, Huang H (2010) Proteomic profiling of renal allograft rejection in serum using magnetic bead-based sample fractionation and MALDI-TOF MS. *Clin Exp Med* (Epub ahead of print).

Talbot D, Cavanagh G, Coates E, Givan AL, Shenton BK, Lennard TW, Proud G, Taylor RM (1992) Improved graft outcome and reduced complications due to flow cytometric crossmatching and DR matching in renal transplantation. *Transplantation* 53:925–928.

Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S (1995) Expression of the functional soluble form of human Fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J* 14:1129–1135.

Tatapudi RR, Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, Li B, Sharma VK, Lozada-Pastorio E, Seetharamu N, Hartono C, Serur D *et al.* (2004) Noninvasive detection of renal allograft inflammation by measurements of mRNA for IP-10 and CXCR3 in urine. *Kidney Int* 65:2390–2397.

Teppo AM, Honkanen E, Ahonen J, Grönhagen-Riska C (1998) Does increased urinary interleukin-1 receptor antagonist/interleukin-1beta ratio indicate good prognosis in renal transplant recipients? *Transplantation* 66:1009–1014.

Teppo A, Honkanen E, Ahonen J, Grönhagen-Riska C (2001) Urinary markers of renal graft rejection. *Transplant Proc* 33:2485–2486.

Thongboonkerd V (2007) Practical points in urinary proteomics. *J Proteome Res* 6:3881–3890.

Thongboonkerd V (2008) Urinary proteomics: towards biomarker discovery, diagnostics and prognostics. *Mol BioSyst* 4:810-815

Vargha R, Mueller T, Arbeiter K, Regele H, Exner M, Csaicsich D, Aufricht C (2006) C4d in pediatric renal allograft biopsies: a marker for negative outcome in steroid-resistant rejection. *Pediatr Transplantation* 10:449–453.

te Velde AA, de Waal M, Huijbens RJ, de Vries JE, Figdor CG (1992) IL-10 stimulates monocyte FcγR surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN-γ, IL-4, and IL-10. *J Immunol* 149:4048–4052.

Visscher D, Carey J, Oh H, Turza N, Kupin W, Venkat KK, Zarbo R (1991) Histologic and immunophenotypic evaluation of pretreatment renal biopsies in OKT3-treated allograft rejections. *Transplantation* 51:1023–1028.

Vongwiwatana A, Tasanarong A, Hidalgo LG, Halloran PF (2003) The role of B cells and alloantibody in the host response to human organ allografts. *Immunol Rev* 196:197–218.

de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE (1991a) Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174:1209–1220.

de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo M, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE (1991b) Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 174:915–924.

Waiser J, Budde K, Katalinic A, Kuerzdörfer M, Riess R, Neumayer HH (1997) Interleukin-6 expression after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 12:753–759.

Wakatsuki T, Kimura K, Kimura F, Shinomiya N, Ohtsubo M, Ishizawa M, Yamamoto M (1995) A distinct mRNA encoding a soluble form of ICAM-1 molecule expressed in human tissues. *Cell Adhes Commun* 3:283–292.

Wang D, Wu GJ, Wu WZ, Yang SL, Chen JH, Wang H, Lin WH, Wang QH, Zeng ZX, Tan JM (2007) Pre- and post-transplant monitoring of soluble CD30 levels as predictor of acute renal allograft rejection. *Transpl Immunol* 17:278–282.

Weiler M, Rogashev B, Einbinder T, Hausmann J, Kaneti J, Chaimovitz C, Douvdevani A (1998) Interleukin-15, a leukocyte activator and growth factor, is produced by cortical tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 9:1194–1201.

Weiser WY, Temple PA, Witek-Giannotti JS, Remold HG, Clark SC, David JR (1989) Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci* 86:7522–7526.

Wilczek HE (1990) Percutaneous needle biopsy of the renal allograft. *Transplantation* 50:790–797.

Wilkinson PC, Liew FY (1995) Chemoattraction of human blood T lymphocytes by interleukin-15. *J Exp Med* 181:1255–1259.

Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, Held PJ, Port FK (1999) Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 341:1725–1730.

Yannaraki M, Rebibou JM, Ducloux D, Saas P, Duperrier A, Felix S, Rifle G, Chalopin JM, Hervé P, Tiberghien P; Ferrand, C (2006) Urinary cytotoxic molecular markers for a noninvasive diagnosis in acute renal transplant rejection. *Transpl Int* 19:759–768.

Yoshimura T, Matsushima K, Oppenheim JJ, Leonard EJ (1987) Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1). *J Immunol* 139:788–793.

Zlotnik A, Yoshie O (2000) Chemokines: A new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12:121–127.

8 Thesen

1. Die Analyse von Biomarkern im Urin ist ein sicheres, nicht-invasives Verfahren, welches den Zustand der gesamten Niere abbildet, und wobei die Biomarker im Urin einem geringeren Abbau durch Proteasen ausgesetzt sind im Vergleich zu Plasma oder Serum.
2. Luminex™ Multiplex-Assay kann auch zur Analyse von Proteinen im Urin herangezogen werden und erweist sich als eine routinetaugliche Methode, deren Kardinalvorteil es ist, mehrere Parameter in einer geringen Probenmenge gleichzeitig zu messen.
3. Die Intra- und Inter-Assay Varianzen des Luminex™ Multiplex-Assays sind vergleichbar mit Messungen mittels ELISA-Systemen.
4. Ein saurer pH-Wert beeinflusst die Bindung der Antikörper zum Nachweis der Analyte. Daher werden unter sauren Bedingungen deutlich niedrigere Konzentrationen gemessen als unter neutralen bzw. leicht basischen Verhältnissen.
5. sCD30 ist aufgrund seiner Molekülgröße im Urin nicht nachweisbar. Lediglich mit Blut tingierte Urinproben weisen geringe Konzentrationen auf und spiegeln vermutlich das Vorhandensein von Serumresten wider.
6. IL-2, IL-7, IL-13, IL-17, IFN- γ , sE-Selectin und MPO sind im vom Hersteller vorgegebenen Messbereich im Urin nicht messbar.
7. IL-6, IL-8, sVCAM-1, sFas, IL-1ra, IL-10, IL-1 β , IP-10 sowie tPAI-1 zeigen signifikant höhere Werte bei Patienten mit einer akuten Abstoßung im Vergleich zu Patienten mit einer stabilen Transplantatfunktion. Allerdings ist die Sensitivität von IL-8, sVCAM-1, IL-10 und IL-1 als Rejektionsmarker eingeschränkt.
8. Die Konzentrationen von IL-6, IL-8, sVCAM-1, sFas, IL-1ra und tPAI-1 steigen in der Abstoßungsgruppe bereits einen Tag vor klinisch manifester Rejektion.
9. Patienten mit einer Steroid-resistenten Abstoßung haben ein erhöhtes Risiko ihr Transplantat zu verlieren und müssen frühzeitig einer intensivierten Immunsuppression unterzogen werden. Höhere Werte von sFas, TNF- α , MIF und MIP-1 α sind bei Steroid-resistenten Abstoßungen im Vergleich zu Steroid-sensitiven Rejektionen zu beobachten.

10. Die Konzentrationen von IL-8, sFas, IL-1ra, IL-1 α , IP-10 sowie MIP-1 α sind im Vergleich zu gesunden Probanden im Urin von Patienten mit einem Harnwegsinfekt erhöht. Allerdings werden nicht die Werte erreicht, die im Bereich der Abstoßungsgruppen liegen. Trotzdem sollten Harnwegsinfekte im Rahmen der Rejektionsdiagnostik weiterhin anderweitig ausgeschlossen werden.

11. sFasL, sICAM-1 und IL-15 sind unspezifische Marker, die vergleichbare Konzentrationen in allen drei Transplantationsgruppen zeigen.

12. Es ist nicht sinnvoll sog. Schwellenwerte der Biomarker zu berechnen, da große individuelle Unterschiede der Basiswerte vorliegen. Stattdessen sollte der tägliche Verlauf beobachtet werden und deutliche Konzentrationsanstiege als auffällig bewertet werden.

13. Alter, Geschlecht, Anzahl der Mismatches sowie Grunderkrankung der terminalen Niereninsuffizienz beeinflussen nicht das Ergebnis der Rejektionsmarker.

14. Die Konzentrationen aller ermittelten Rejektionsmarker korrelieren miteinander. Der stärkste Zusammenhang besteht zwischen IL-6 und IL-8.

15. Alle ermittelten Rejektions- und Differenzierungsmarker wurden in der Literatur bereits im Zusammenhang mit Abstoßungen nach Nierentransplantation beschrieben. Lediglich die Bedeutung von sFas und tPAI-1 im Rahmen einer akuten Rejektion sollte in zukünftigen Experimenten untersucht werden.

16. Der Einfluss einer CMV-Infektion, verspäteten Transplantatfunktion, akuten Tubulusnekrose sowie eines Ischämie- und Reperfusionsschadens sollten in zukünftigen Studien mit einer größeren Patientenzahl untersucht werden.

17. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass es durchaus möglich ist, mittels eines Multiplex-Assays Biomarker im Urin zu bestimmen, die eine Differenzierung zwischen einer stabilen Transplantatfunktion und einer akuten Rejektion erlauben, sowie eine Individualisierung der Immunsuppression ermöglichen.

Lebenslauf

Name Diana Breuer
Geburtsdatum/-ort 27 März 1984 in Halle (Saale)
Nationalität Deutsch
E-mail Diana.Breuer@gmx.net

Schulbildung

1994 – 2003 Gymnasium Latina August Hermann Francke, Halle (Saale)
2000 – 2001 Austauschjahr in Chicago, USA

Studium

2003 – 2010 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität,
Halle-Wittenberg
2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruflicher Werdegang

seit August 2010 Assistenzärztin für Innere Medizin, Klinikum St. Georg, Leipzig

Wissenschaftlicher Werdegang

2006 Beginn der vorliegenden Dissertation am Institut für Medizinische
Immunologie der Martin-Luther Universität, Halle (Saale)
2008 Posterpräsentation auf der European Federation for Immuno-
genetics Conference, Toulouse
2008 Vortrag auf der 16. Jahrestagung des Arbeitskreises Nieren-
transplantation der Akademie der Deutschen Urologen, Bonn

Forschungspreis

2008 Bernd Schönberger-Preis des Arbeitskreises Nierentrans-
plantation

Halle, den 13.09.2010

Selbstständigkeitserklärung

Die vorliegende Arbeit wurde von mir ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter der Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten in Anspruch genommen habe.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Erklärung über Promotionsversuche

Ich erkläre, dass ich keinerlei frühere Promotionsversuche unternommen habe und an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Promotionsverfahren anhängig ist.

Halle, den 13.09.2010

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische Immunologie der Medizinischen Fakultät bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Barbara Seliger angefertigt.

Frau Prof. Seliger danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, sowie für die vielen Ratschläge und Diskussionen zu meiner Arbeit.

Herrn Dr. Wolfgang Altermann und Herrn Dr. Gerald Schlaf, HLA-Labor Halle, gilt mein besonderer Dank für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit, für die Möglichkeit Poster und Vorträge zu gestalten und für die vielen Diskussionen in netter Runde.

Der gesamten Arbeitsgruppe des HLA-Labors danke ich für die entgegengebrachte Unterstützung in einem hervorragenden Arbeitsklima. Ein besonderer Dank gilt Frau Anja Wahle, die mir jederzeit bei Problemen mit der Computer-Software zur Seite stand.

Herrn Prof. Fornara sowie Herrn PD Dr. Hamza danke ich für das Bereitstellen der Patientenproben, was diese Arbeit überhaupt erst ermöglichte. Frau Haberland, Koordinatorin des Nierentransplantationszentrums Halle (Saale), war mir eine große Hilfe beim Zusammenstellen der benötigten Patientendaten.

Mein großer Dank gilt dem gesamten Team des Nierentransplantationszentrums Halle (Saale) für das geduldige Sammeln unzähliger Urinproben über 2 Jahre.

Frau Dr. Unverzagt vom Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik möchte ich danken für die große Hilfe in allen statistischen Fragen.

Nicht zuletzt danke ich ganz herzlich meiner Familie, meinen Freunden sowie meinem Freund für ihre Geduld und Unterstützung, die sie mir während der Entstehung der vorliegenden Arbeit immer wieder entgegen brachten.