

# **Die Lokalisation des Interleukin-18 in der menschlichen Niere und seine Bedeutung für die allogene Nierentransplantation**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich  
Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
**Olaf Sichler**  
aus Kassel

Frankfurt am Main 2008  
(D 30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. Ingeborg A. Hauser

Prof. Dr. Walter E. Müller

Tag der Disputation:

*Meinen Eltern*



---

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:.....	VI
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 INTERLEUKIN-18.....	1
1.2 DIE AKTIVIERUNG VON IL-18.....	3
1.3 IL-18 SIGNALTRANSDUKTION.....	3
1.4 DAS „IL-18 BINDEPROTEIN“.....	4
1.5 DIE IL-18 EXPRESSION UND PROMOTORGENPOLYMORPHISMEN.....	4
1.6 GENETISCHE POLYMORPHISMEN UND MUTATIONEN.....	5
1.7 NIERENTRANSPLANTATION.....	6
1.8 IMMUNOLOGISCHE GRUNDLAGEN BEI DER NIERENTRANSPLANTATION.....	8
1.9 AKUTE ABSTOßUNGSREAKTIONEN.....	13
1.10 VERZÖGERTER FUNKTIONSBEGINN DER TRANSPLANTIERTEN NIERE.....	14
1.11 CHRONISCHE ALLOGRAFT NEPHROPATHIE.....	15
1.12 MORPHOLOGIE DER NIERE.....	16
1.12.1 Makroskopie der Niere.....	16
1.12.2 Detaillierte Nierenmorphologie.....	17
1.12.3 Histologie der Nephrone und der Sammelrohre.....	18
ZIELSETZUNG.....	21
<b>2 Materialien und Methoden.....</b>	<b>23</b>
2.1 LOKALISATION DES IL-18 IN DER NIERE.....	23
2.1.1 MATERIAL.....	23
2.1.2 FIXIERUNG UND EINBETTUNG DER GEWEBEPROBEN.....	23
2.1.3 ANFERTIGEN UND ENTPARAFFINIEREN VON GEWEBESCHNITTEN.....	24

<b>2.1.4 GEWEBEAUFSCHLUSS FÜR WESTERN BLOT .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1.5 BESTIMMUNG DES GESAMTPROTEINGEHALTES .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1.6 AUFTRENNUNG DER PROTEINE MIT SDS-PAGE .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1.7 WESTERN BLOT .....</b>	<b>26</b>
<b>2.1.8 RNA-ISOLIERUNG .....</b>	<b>27</b>
<b>2.1.9 PHOTOMETRISCHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON DNA UND RNA .....</b>	<b>27</b>
<b>2.1.10 REVERSE TRANSKRIPTASE-REAKTION (RT-REAKTION) .....</b>	<b>28</b>
<b>2.1.11 DNA NACHWEIS MITTELS POLYMERASE-KETTENREAKTION (POLYMERASE CHAIN REACTION) .....</b>	<b>29</b>
<b>2.1.12 AGAROSEGELELEKTROPHORESE .....</b>	<b>31</b>
<b>2.1.13 ISOLIERUNG VON DNA AUS AGAROSEGELEN .....</b>	<b>32</b>
<b>2.1.14 <i>IN SITU</i>-HYBRIDISIERUNG .....</b>	<b>32</b>
2.1.14.1 Herstellung der Sonde .....	33
2.1.14.2 Klonieren der cDNA .....	33
2.1.14.3 Isolieren und Aufreinigen der cDNA.....	34
2.1.14.4 Restriktionsverdau der cDNA und Herstellen des cRNA-Hybrides ....	35
2.1.14.5 Kontrolle der Sonde .....	36
2.1.14.6 Durchführung der <i>in situ</i> -Hybridisierung .....	37
<b>2.1.15 PEROXIDASE FÄRBUNG .....</b>	<b>38</b>
<b>2.1.16 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG .....</b>	<b>39</b>
<b>2.1.17 MIKROSKOPIE .....</b>	<b>41</b>
<b>2.2 POLYMORPHISMENUNTERSUCHUNGEN .....</b>	<b>43</b>
2.2.1 Patienten .....	43
2.2.2 Kontrollgruppe .....	43
2.2.3 Datenerhebung.....	44
2.2.4 Extraktion genomischer DNA aus EDTA-Blut.....	44

---

2.2.5 Bestimmung der Genotypen der IL-18 Promotorgenpolymorphismen....	45
<b>2.3 FÄRBUNGEN DER BIOPSIEN.....</b>	<b>48</b>
<b>2.3.1 FÄRBUNG DER MAKROPHAGEN, T-LYMPHOZYTEN UND B-LYMPHOZYTEN IN BIOPSIEN.....</b>	<b>48</b>
<b>2.3.2 AUSWERTUNG DER BIOPSIEFÄRBUNGEN .....</b>	<b>49</b>
<b>2.4 STATISTISCHE AUSWERTUNGEN .....</b>	<b>49</b>
<b>2.5 REAGENZIEN, VERBRAUCHSMATERIALIEN UND ZUBEREITUNGEN.....</b>	<b>51</b>
2.5.1 Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen und sonstigen Zubereitungen .....	51
2.5.2. Chemikalien und Reagenzien.....	55
2.5.3. Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	56
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>59</b>
<b>3.1 LOKALISATION VON IL-18 IN DER GESUNDEN MENSCHLICHEN NIERE .....</b>	<b>59</b>
3.1.1 Nachweis von IL-18 Protein mit Western Blot.....	59
3.1.2 Nachweis der mRNA Expression von IL-18, P <sub>2X7</sub> und Caspase-1 in der gesunden Niere mittels RT-PCR .....	60
3.1.3 Nachweis der IL-18 Expression mit <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	61
3.1.4 Lokalisation des IL-18 in der menschlichen Niere mit Peroxidase-Färbungen .....	62
3.1.5 Zuordnung der Lokalisation von IL-18 zu spezifischen Tubulusabschnitten mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen .....	67
3.1.5.1 IL-18 wird in Bereichen des distalen Konvolutes, des Verbindungstubulus und im Sammelrohr exprimiert.....	68
3.1.5.2 IL-18 liegt im Zytoplasma von bestimmten Zellen in Abschnitten des distalen Tubulus und des Sammelrohres vor .....	71
3.1.5.3 IL-18 ist in Schaltzellen lokalisiert .....	73
3.1.5.4 IL-18 ist mit den für seine Aktivierung notwendigen Komponenten Caspase-1 und P <sub>2X7</sub> kolokalisiert .....	74

---

3.1.5.5 IL-18 wird konstitutiv im Nierengewebe exprimiert .....	75
<b>3.2 POLYMORPHISMENUNTERSUCHUNGEN .....</b>	<b>76</b>
3.2.1 Beschreibung der Gruppe und klinischer Parameter .....	76
3.2.2 Verteilung der IL-18 Promotorgenpolymorphismen in den verschiedenen Gruppen.....	77
3.2.3 Hardy Weinberg Equilibrium .....	80
3.2.4 IL-18 Promotorgenpolymorphismen und das Auftreten einer verzögerten Nierentransplantatfunktion.....	81
3.2.5 Haplotypenanalyse .....	86
3.2.6 IL-18 Promotorgenpolymorphismen und das Auftreten von Transplantat-Abstoßungsreaktionen.....	87
<b>3.3 FÄRBUNGEN DER BIOPSIEN .....</b>	<b>90</b>
3.3.1 Beurteilung der Färbeintensitäten.....	91
3.3.2 Färbung der infiltrierenden Zellen.....	92
3.3.3 Gemeinsame Betrachtung der Färbeintensitäten und der infiltrierenden Zellen.....	93
3.3.4 Morphologische Begutachtung der IL-18 Expression in der Transplantatniere bei Abstoßungsreaktionen und akuter Tubulusnekrose .....	95
3.3.4.1 Akute Tubulusnekrose.....	95
3.3.4.2 Zelluläre Abstoßung .....	96
3.3.4.3 Vaskuläre Abstoßung .....	97
3.3.4.4 Chronische Allograft Neohropathie.....	98
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>101</b>
<b>4.1 LOKALISATION DES IL-18 IN DER NIERE .....</b>	<b>101</b>
<b>4.2 EINFLUSS VON IL-18 PROMOTORGENPOLYMORPHISMEN AUF DIE ENTWICKLUNG EINER VERZÖGERTEN NIERENTRANSPLANTATFUNKTION .....</b>	<b>106</b>
<b>4.3 EINFLUSS VON IL-18 PROMOTORGENPOLYMORPHISMEN AUF DIE ENTSTEHUNG VON TRANSPLANTAT-ABSTOßUNGSREAKTIONEN .....</b>	<b>113</b>

---

<b>4.4 IL-18 IN BIOPSIEN NACH NIERENTRANSPLANTATION .....</b>	<b>116</b>
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>123</b>
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>125</b>
<b>Publikationen.....</b>	<b>135</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>137</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>138</b>

**Abkürzungsverzeichnis:**

µl	Mikroliter
AMP	Adenosin-Monophosphat
AK	Antikörper
ANV	Akutes Nierenversagen
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
AQP2	Aquaporin-2
ATN	Akute Tubulusnekrose
ATP	Adenosin-Triphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
CaBP	Calbindin-D28k
CAN	Chronische Allograft Nephropathie
CMV	Cytomegalovirus
CNT	Connecting tubule
DAPI	4,6-Diamidin-2-Phenylindol
DCT	Distal convoluted tubule
DGF	Delayed graft function
dNTP	Nukleotidtriphosphate
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
FasL	Fas Ligand
g	Gramm
Glom	Glomerulum
GM-CSF	Granulozyten-/ Makrophagen-stimulierender Faktor
HLA	Humane Leukozyten Antigene
HRP	Horseradish-peroxidase
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
I/R-Schaden	Ischämie/Reperfusions-Schaden

---

ICE	Interleukin-1 converting enzyme
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
IL-18BP	IL-18 Bindeprotein
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
IRAK	IL-1 receptor activating kinase
k.o. Mäuse	Knock out Mäuse
kDa	Kilodalton
KI	Konfidenzintervall
KIZ	Kalte Ischämiezeit
LPS	Lipopolysaccharide
MAP-Kinase	Mitogen aktivierte Protein Kinase
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minuten
ml	Milliliter
MMF	Mycophenolatmofetil
M-MLV-RT	Mäuse-Leukämie-Virus-Reverse-Transkriptase
Mw	Mittelwert
Nf- $\kappa$ B	Nuclear factor- $\kappa$ B
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
OR	Odds Ratio
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction
PRA	Panel reactive antibodies
PT	Proximaler Tubulus
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
RNase	Ribonuklease

SDS	Sodium dodecyl sulfat
sec	Sekunden
SNP	Single nucleotide polymorphism
Stabw	Standardabweichung
Std	Stunden
TAL	Thick ascending limb
THP	Tamm-Horsfall Protein
TLR	Toll-like receptor
U	Units
UpM	Umdrehungen pro Minute
WIZ	Warme Ischämiezeit

# 1 Einleitung

## 1.1 Interleukin-18

Interleukin (IL)-18, welches erstmals 1989 beschrieben wurde, gehört zur IL-1 Familie und ist auch unter dem Namen Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) induzierender Faktor bekannt, da es die Bildung von IFN- $\gamma$  in T-Zellen induzieren kann [Okamura, H. et al. 1995]. Das aktive IL-18 weist in Bezug auf die dreidimensionale Struktur eine hohe Ähnlichkeit zu aktivem IL-1 $\beta$  auf, beide besitzen eine charakteristische  $\beta$ -Faltblattstruktur [Bazan, J. F. et al. 1996]. Vergleicht man die konservierten Aminosäuresequenzen, so zeigt sich eine 19-prozentige Sequenzhomologie zwischen IL-18 und IL-1 $\beta$ . IL-18 wird intrazellulär in einer pro-Form (pro-IL-18) exprimiert und gespeichert. Nach einem entsprechenden Stimulus wird es durch das „Interleukin-1 converting enzyme“ (ICE, nach neuer Nomenklatur Caspase-1) aktiviert. Das inaktive, 24 Kilodalton (kDa) große pro-IL-18 wird durch die Caspase-1 geschnitten und es entsteht ein 18 kDa großes Protein; das reife IL-18. Im Gegensatz zu IL-1 $\beta$  und den meisten anderen Zytokinen wird IL-18 im Menschen weitestgehend konstitutiv gebildet. Monozyten und Makrophagen sind am besten als IL-18 produzierende Zellen charakterisiert [McInnes, I. B. et al. 2000], IL-18 wird jedoch ebenfalls in einer Vielzahl anderer Zellen, wie dendritischen Zellen, Kupffer Zellen oder Epithelzellen der Lunge, der Haut oder des Dünndarmes gebildet [Boraschi, D. et al. 2006].

IL-18 ist ein wichtiger Schlüssel-Mediator in der Signalkaskade der angeborenen und erworbenen Immunabwehr [Mühl, H. et al. 2004]. Als potenter Kostimulator von IL-12 ist IL-18 an der Regulation des Gleichgewichtes in Richtung Th1- oder Th2-Antwort beteiligt [Nakanishi, K. et al. 2001]. Die durch IL-18 ausgelöste Th1-Antwort beinhaltet die Bildung von IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12 und eine Aktivierung von Makrophagen. Außerdem kann durch IL-18 die Bildung weiterer unspezifischer Entzündungsmediatoren wie IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , Fas Ligand (FasL) und Stickstoffmonoxid (NO) [Neighbors, M. et al. 2001] sowie von Adhäsionsmolekülen und chemotaktisch wirkenden CC- und CXC-Chemokinen [Puren, A. J.

et al. 1998] induziert werden. Seine proinflammatorischen Eigenschaften werden zu einem großen Teil über den Transkriptionsfaktor Nf- $\kappa$ B vermittelt.

Im Zuge der Abwehr von Mikroorganismen fördert IL-18 die Bildung von unspezifischen Entzündungsmediatoren, welche die erworbene, spezifische Erregerabwehr unterstützen [Dinarello, C. A. et al. 2003]. Über die Bildung von TNF- $\alpha$ , FasL und IFN- $\gamma$  hat IL-18 eine protektive Funktion in Bezug auf Tumorerkrankungen, IFN- $\gamma$  hat eine starke antivirale Wirkung.

Eine pathologische Funktion wird dem IL-18 bezüglich der Entstehung und dem Verlauf von chronisch entzündlichen Erkrankungen wie juveniler Diabetes mellitus, multipler Sklerose, systemischer Lupus erythematodes und rheumatoider Arthritis zugesprochen, wobei eine Entgleisung der Immunantwort zugrunde gelegt wird [Boraschi, D. et al. 2006]. Die Effekte von IL-18 im Immunsystem sind in der Abbildung 1.1.1 dargestellt.

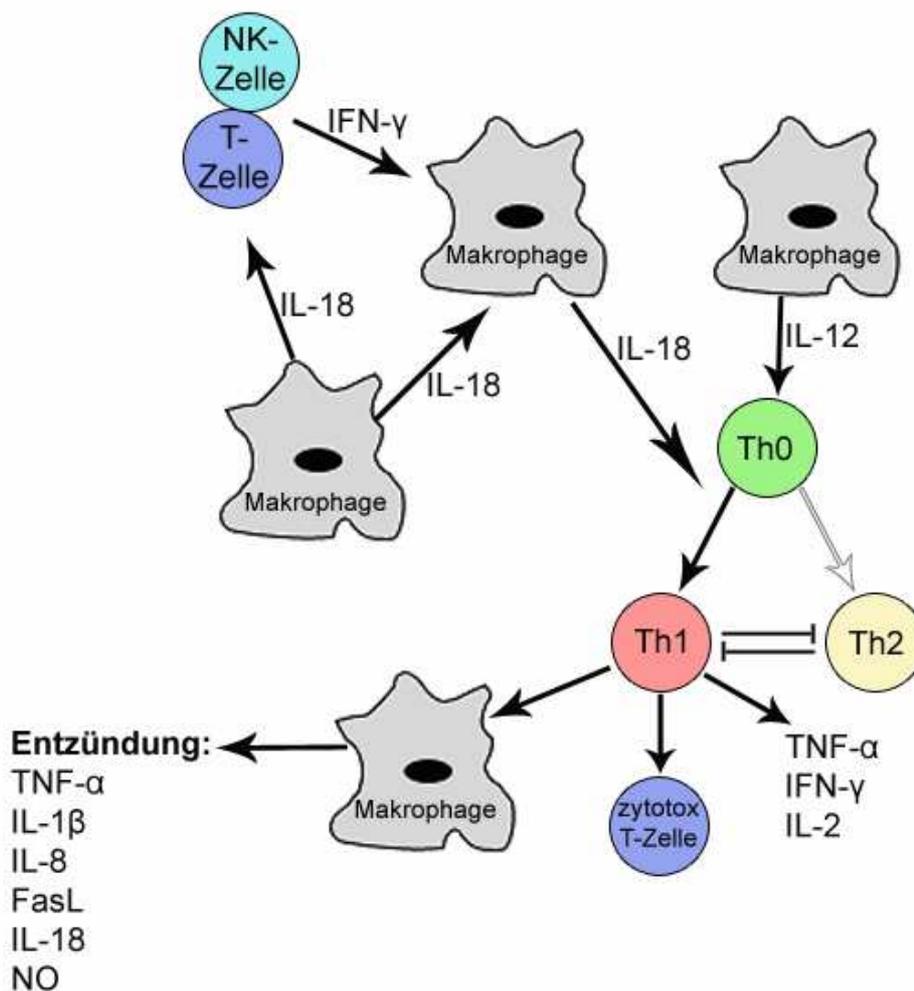


Abbildung 1.1.1: Effekte des IL-18 im Immunsystem

## 1.2 Die Aktivierung von IL-18

Die Aktivierung des IL-18 erfolgt über das „interleukin-1 $\beta$  converting enzyme“ (ICE, Caspase-1). Dieses ist Mitglied einer großen Familie intrazellulärer Proteasen (Caspasen). Caspase steht hierbei für Cystein-Proteasen, die nach der Asparaginsäure schneiden [Alnemri, E. S. et al. 1996]. Das ICE Gen kodiert ein 45 kDa großes, inaktives Protein, welches konstitutiv in vielen Zelltypen exprimiert wird. Der 45 kDa große Vorläufer der Caspase-1 benötigt zwei interne Spaltungen bevor das enzymatisch aktive Heterodimer entsteht und setzt einen entsprechenden Stimulus voraus. Die Aktivierung der Caspase-1 erfolgt über den purinergen Rezeptor P<sub>2X7</sub>. Extrazelluläres Adenosin-Triphosphat (ATP) reagiert mit diesem membranständigen Ionenkanal und löst einen K<sup>+</sup> Efflux aus der Zelle aus, welcher mit einer Aktivierung des ICE und einem Ausschleusen von aktivem IL-18 assoziiert ist [Dinarello, C. A. et al. 2003]. Die Interaktion von ATP mit dem P<sub>2X7</sub> Rezeptor ist für eine Aktivierung von IL-18 essentiell. Außerdem ist ein zusätzlicher Stimulus erforderlich, der durch Bestandteile von Bakterienzellwänden oder durch nekrotische Gewebefragmente (z.B. nach Operation) ausgelöst wird. Der zusätzliche Stimulus wird über Rezeptoren, wie beispielsweise Toll-Like Rezeptoren vermittelt [Bachmann, M. et al. 2006; Hentze, H. et al. 2003].

## 1.3 IL-18 Signaltransduktion

Die Signalweiterleitung des IL-18 erfordert einen Rezeptorkomplex, der aus zwei Untereinheiten besteht. IL-18 bindet an die IL-18R- $\alpha$  Kette, somit entsteht eine hohe Affinität zur IL-18R- $\beta$  Kette, welche das Signal in die Zelle weiterleitet. Der nachfolgende Signaltransduktionsweg verläuft bei den meisten Angehörigen der IL-1/Toll-Like Rezeptor Superfamilie in gleicher Weise über eine Aktivierung der IL-1 receptor activating kinase (IRAK), was schließlich über die Aktivierung von NF- $\kappa$ B zu der Expression von Entzündungsmediatoren führt [Adachi, O. et al. 1998]. Ein weiterer Signaltransduktionsweg verläuft über die Aktivierung der p38 mitogen aktivierten Protein Kinase (MAP-Kinase), worüber es zur

Phosphorylierung und damit zur Aktivierung von weiteren Transkriptionsfaktoren kommen kann [Wyman, T. H. et al. 2002].

#### **1.4 Das „IL-18 Bindeprotein“**

Das IL-18 Bindeprotein (IL-18BP) ist ein natürlich vorkommendes Protein, welches eine hohe Affinität zum IL-18 hat und nach Bindung an IL-18 dessen biologische Funktion neutralisiert. IL-18BP bindet spezifisch an die aktive Form des IL-18, andere Liganden sind nicht bekannt. IL-18BP ist in großen Mengen in immunologisch aktiven Regionen, wie Milz und Dünndarmgewebe präsent. Durch IL-18 induziertes IFN- $\gamma$  stimuliert seinerseits die Expression des IL-18BP und stellt somit einen negativen Rückkopplungsmechanismus zur IL-18 Expression dar [Dinarello, C. A. 2000].

#### **1.5 Die IL-18 Expression und Promotorgenpolymorphismen**

Das humane IL-18 Gen ist auf Chromosom 11q22.2-q22.3 lokalisiert, besteht aus sechs Exons, 5 Introns und hat einen Promotorabschnitt. Im Gegensatz zu den meisten anderen Zytokinen ist der Promotor des IL-18 Gens kontinuierlich aktiv und muß nicht aktiviert werden [Tone, M. et al. 1997]. Während der Entwicklung von Monozyten zu Makrophagen während einer viralen Infektion nimmt die Expression von IL-18 kontinuierlich zu [Pirhonen, J. et al. 1999]. Die 3'-nicht translatierte Region des humanen IL-18 verfügt über keine destabilisierenden AU-reichen Sequenzen, was dazu führt, dass die mRNA eine hohe Halbwertszeit hat [Tone, M. et al. 1997]. Auf dem IL-18 Gen wurden 5 verschiedene Polymorphismen identifiziert, die durch den Austausch einer einzelnen Base gekennzeichnet sind, sogenannte „single nucleotide polymorphisms“ (SNP's, s.Kapitel 1.6). Für die beiden Promotor SNP's -607C/A und -137G/C ist beschrieben, dass sie sich auf die IL-18 Expression auswirken und damit funktionell sind [Giedraitis, V. et al. 2001].

## 1.6 Genetische Polymorphismen und Mutationen

Das humane Genom besteht aus 3 bis 3,5 Milliarden Basen. Von diesen stellen nur ca. 3% kodierende Gene und deren flankierenden regulatorischen Sequenzen dar. Bei allen Säugetierorganismen tritt infolge normaler zellulärer Vorgänge oder zufälliger Wechselwirkung mit der Umwelt eine bestimmte Zahl von genetischen Varianten in allen Bereichen des Genoms auf. Der Begriff des Polymorphismus wird in der Genetik wie folgt definiert: „Durch Mutationen entstandene Unterschiede in der Nukleotidsequenz homologer DNA-Bereiche“. Man bezeichnet eine genetische Variante als „Polymorphismus“, wenn ihre Frequenz größer als 1% in der Normalbevölkerung ist. Varianten, die seltener als 1% vorkommen, bezeichnet man als Mutationen [Tariverdian et al. 2004].

Die meisten stabilen genetischen Varianten zeigen sich in der Form von Einzelbasenaustauschen („single nucleotide polymorphism“ = SNP). Diese stellen ca. 90% der gesamten Variationen im Genom dar. Die restlichen 10% zeigen sich als Insertionen, Deletionen und einer variablen Anzahl von Repeat-Elementen. Häufige Sequenzvarianten treten etwa alle eintausend Basen in kodierenden oder regulatorischen Sequenzen auf. Da jedes Basenpaar der DNA mutieren kann, wird bei SNPs unterschieden zwischen Transition und Transversion. Die häufigste Form ist die Transition: hierbei wird eine Pyrimidinbase durch eine andere ersetzt (G/C) oder eine Purinbase durch eine andere (T/A). Seltener ist die Form der Transversion, bei der eine Purin- durch eine Pyrimidinbase (oder umgekehrt) ersetzt wird (z.B. C/A). Polymorphismen werden fast immer im Kontext komplexer genetischer Erkrankungen gesehen und sind regelmäßig in der „Normalbevölkerung“ nachweisbar, wenn auch mit unterschiedlichen Allelfrequenzen in verschiedenen ethnischen Gruppen. Im Unterschied zu den seltenen Mutationen, die zu monogenen Erkrankungen führen können, sind genetische Polymorphismen häufig und erhöhen bei einzelnen Individuen das Risiko für die Ausbildung bestimmter Erkrankungen, besonders beim Zusammentreffen mehrerer prädisponierender Allele. Befinden sich verschiedene Allele auf einem Chromosom in bestimmten Genregionen die gemeinsam weitervererbt werden, spricht man von „Haplotypen“. Bestimmte Haplotypen (die eine spezifische Kombination von prädisponierenden Allelen enthalten) können dann einen

besonders großen Einfluss auf die Entstehung einer Erkrankung ausüben [Knippers, R. 1995].

## 1.7 Nierentransplantation

Eine Nierentransplantation ist das Mittel der Wahl bei der terminalen Niereninsuffizienz. Aufgrund der deutlich verbesserten Lebensqualität und der erniedrigten Morbidität und Letalität gegenüber der dauerhaften maschinellen Nierenersatztherapie (z.B. Hämodialyse) wird die Indikation zur Nierentransplantation relativ weit gestellt. Jeder Patient mit bestehender oder innerhalb von 6 Monaten zu erwartender terminaler Niereninsuffizienz, bzw. mit einer glomerulären Filtrationsrate unter 15 ml/min, gilt als Transplantationskandidat, sofern nicht besondere Gründe dagegen sprechen (Lebenserwartung weniger als 2 Jahre, aktive systemische Infektionen, metastasierendes Malignom).

Unter Niereninsuffizienz versteht man eine unzureichende oder völlig ausgefallene Fähigkeit der Niere, harnpflichtige Substanzen auszuscheiden und die Regulation des Elektrolyt-, Wasser-, Säure- und Basen-Haushaltes aufrechtzuerhalten. Es handelt sich dabei um einen meist langsam fortschreitenden Verlust von funktionsfähigem Nierengewebe, dem unterschiedliche Grunderkrankungen zugrunde liegen können. Bei den Patienten, bei denen 2005 die Diagnose der chronischen Niereninsuffizienz gestellt wurde, lagen laut Jahresbericht 2005/2006 der „Quasi-Niere“ (s.u.) folgende Grunderkrankungen vor:

- Diabetische Nephropathie 35 % (Typ I Diabetes 3 %, Typ II Diabetes 32 %)
- Vaskuläre Nephropathie 23 %
- Chronische Glomerulonephritis 13 %
- Interstitielle Nephritis 8 %
- Erblich bedingte Erkrankungen (v.a. Zystennieren) 5 %
- Systemerkrankungen wie z.B. systemischer Lupus erythematodes 4 %
- Analgetikanephropathie und sonstige Ursachen 4 %
- Unbekannte Genese 8 %

Die Transplantatüberlebensrate liegt bei ca 90 % nach dem ersten Jahr und bei ca. 70 % nach 5 Jahren. Die erste erfolgreiche Nierentransplantation wurde 1954 in Boston zwischen eineiigen Zwillingen durchgeführt, ohne dass es zu einer befürchteten Abstoßungsreaktion kam. Erst 15 Jahre später konnten die ersten erfolgreichen Allogen-Transplantationen zwischen genetisch unterschiedlichen Menschen vorgenommen werden. Zur Erhaltungs-Immunsuppression wurden die neu entdeckten Cortikosteroide und der Purinsynthesehemmer Azathioprin eingesetzt. In den folgenden Jahrzehnten konnten durch Fortschritte in der Transplantationsmedizin das Transplantat- und Patientenüberleben deutlich verbessert werden. Die Entwicklung weiterer wichtiger Immunsuppressiva, wie Calcineurininhibitoren zur IL-2 Synthesehemmung oder polyklonaler T-Zell-antikörper führte zu einer deutlichen Verminderung von Transplantatverlusten durch Abstoßungsreaktionen.

Wegen des Mangels an Spenderorganen von verstorbenen Spendern und den damit verbundenen langen Wartezeiten nimmt die Zahl von Lebendspende-Nierentransplantationen von Jahr zu Jahr zu. Von den ca. 3200 im Jahre 2005 in Deutschland transplantierten Nieren kamen ca. 500 Organe von Lebendspendern. Die Transplantatthalbwertszeit der Lebendspendernieren liegt deutlich über der von Nieren aus postmortaler Organspende.

Akute und chronische Abstoßungsreaktionen sind die Hauptfaktoren, die die Langzeit-Transplantat-Überlebensrate negativ beeinflussen. Eine hohe Anzahl an HLA-Mismatches (s. Kapitel 1.8) erhöhen die Wahrscheinlichkeit eine Abstoßungsreaktion zu erleiden.

Weitere Faktoren die ein Transplantat-Langzeitüberleben negativ beeinflussen und die Entstehung eines chronischen Transplantatschadens fördern, sind ein erhöhtes Spenderalter, Hypertonus und/oder Hyperlipidämie des Empfängers sowie lange Ischämiezeiten und damit verbundene Reperfusionsschäden.

Eine bedeutende Komplikation stellt eine Infektion mit dem Zytomegalievirus („Cytomegalovirus“ = CMV) dar. CMV ist eine beim Gesunden latent verlaufende Infektion, der 50-80% der Bevölkerung je nach Alter schon einmal ausgesetzt waren. Unter immunsupprimierten Bedingungen nach Transplantation kann diese Infektion schädlich für das Transplantat und lebensbedrohlich werden. Eine CMV-Diagnostik wird vor Transplantation vom Empfänger und vom Spender

durchgeführt. Hat ein Mensch zuvor eine Infektion durchlebt, zeigen sich IgG-Antikörper im Serum gegen das CMV. Bei einer frischen oder reaktivierten Infektion zeigen sich IgM-Antikörper. Ist ein Empfänger CMV-positiv, weist er, besonders bei zusätzlicher T-Zell-Antikörper-Induktionstherapie, ein Risiko auf, an CMV zu erkranken. Ist ein Empfänger CMV negativ und erhält ein CMV positives Transplantat, so gehört er der Hochrisikogruppe für eine CMV-Erkrankung an, was eine prophylaktische medikamentöse antivirale Therapie erfordert.

*Die Grundlagen für dieses Kapitel sind den Büchern „Nierenerkrankungen“ von Geiger, Jonas, Lenz, Kramer [Geiger, H. et al. 2003] und „Neue Medikamente in der Transplantationsmedizin“ von Neumayer [Neumayer, H. 2001] entnommen. Die statistischen Daten entstammen dem Jahresbericht 2005/2006 der „Quasi Niere“ [Frei, U. et al. 2006]. Quasi Niere ist eine gemeinnützige GmbH zur Qualitätssicherung in der Nierenersatztherapie und veröffentlicht jährlich einen Bericht mit Jahresvergleichen in der Nierenersatztherapie in Deutschland. Der Jahresbericht 2005/2006 war bei der Erstellung dieser Arbeit der aktuellste vorliegende Bericht der Quasi Niere.*

## **1.8 Immunologische Grundlagen bei der Nierentransplantation**

Als allogene Transplantation wird die Übertragung von Organen zwischen genetisch nicht-identischen Individuen der gleichen Spezies bezeichnet. Das zentrale Problem bei einer solchen Transplantation stellen beim Menschen die humanen Leukozyten Antigene (HLA) des Spenderorganes dar, die im Falle von genetisch unterschiedlichen Individuen zu einer Aktivierung der spezifischen Immunabwehr des Empfängers führen können und somit eine Transplantat-Abstoßungsreaktion auslösen können. HLA, auch Histokompatibilitätsantigene („Major histocompatibility complex“ = MHC) genannt, sind Oberflächenmoleküle, welche die immunologische Identität eines Individuums bestimmen, anhand dieser es dem Immunsystem möglich ist, zwischen körpereigenen und -fremden Zellen zu unterscheiden.

MHC sind transmembranäre Proteine (Heterodimere), deren N-terminales Ende auf der extrazellulären Seite liegt. Über dieses Ende können den T-Zellen Antigene präsentiert werden. Bei Transplantationen wird das N-terminale Ende

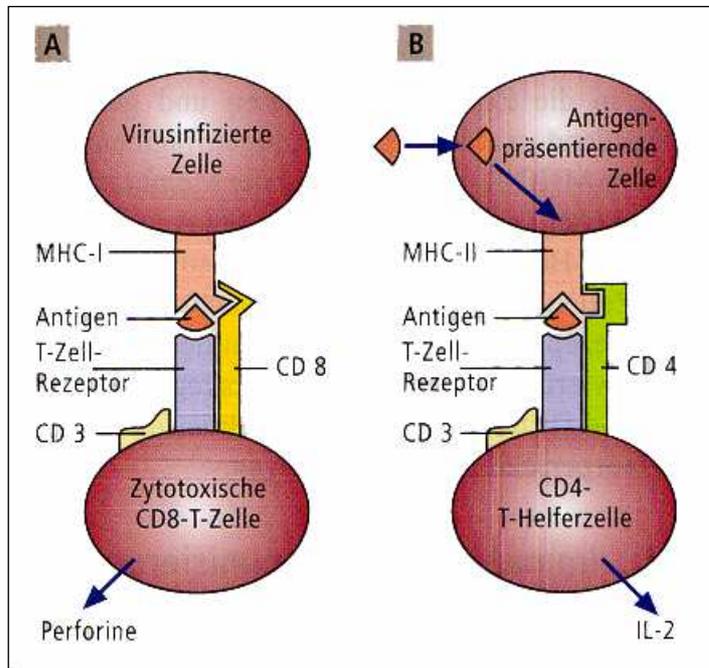
von körperfremden Zellen durch körpereigene T-Zellen als Antigen erkannt, wodurch eine Abstoßung des Transplantates eingeleitet wird. MHC werden in zwei verschiedene Klassen eingeteilt:

**A. Klasse-I MHC** (A, B, C) werden auf der Oberfläche von nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Über die MHC-I-Moleküle werden den (CD8+)-T-Lymphozyten (auch zytotoxische T-Zellen genannt) Antigene präsentiert. Unterscheiden sich Spender und Empfänger bezüglich dieser MHC's, so werden die Transplantatzellen zu Zielzellen der Immunantwort durch die zytotoxischen T-Zellen des Empfängers. Es kommt, u.a. über die Freisetzung von Perforinen, zur zellvermittelten Zytotoxizität, die mit einer Apoptose der Spenderzellen einhergeht. Dabei reagieren die zytotoxischen T-Zellen auf die Zellen des Transplantates wie auf körpereigene Zellen, die mit einem Virus infiziert sind.

**B. Klasse-II MHC** (Dr, Dq, Dp) werden auf antigenpräsentierenden Zellen (APZ), wie Makrophagen, B-Lymphozyten und aktivierten (CD4+)-T-Lymphozyten (T-Helferzellen) exprimiert. Diese MHC Moleküle dienen der Präsentation von zuvor durch die APZ aufgenommenen und prozessierten Antigenen gegenüber T-Helferzellen, die dadurch aktiviert werden. Unterscheiden sich Spender und Empfänger hinsichtlich der MHC-II Moleküle, erkennen T-Helferzellen die MHC-II des Spenders und werden aktiviert, wodurch eine „zelluläre Immunreaktion vom verzögerten Typ“, oder eine „humorale Immunantwort mit Antikörperbildung“ ausgelöst wird. Im Zuge dessen werden die Vermehrung von T-Helferzellen sowie die klonale Vermehrung eines spezifischen T- oder B-Zellklons ausgelöst.

Alle MHC tragenden Zellen sind zur Antigenpräsentation gegenüber T-Zellen befähigt. Die genetischen Informationen für die MHC liegen in einem Genkomplex auf dem kurzen Arm des Chromosom 6. Dieser Genkomplex wird in die Haupttypen HLA- A, B, C, Dr, Dq und Dp eingeteilt. Diese Genabschnitte sind hoch polymorph, d.h. innerhalb einer Population existiert eine Vielzahl unterschiedlicher Allele dieser Gene. Da die Klasse-I (HLA- A, B, C) und die Klasse-II (HLA- Dr, Dq, Dp)-Gene eng benachbart sind, werden sie im Regelfall

als Einheit („en bloc“) auf die Nachkommen vererbt. Die HLA-Vererbungseinheiten werden als HLA-Haplotypen bezeichnet. Die HLA-Haplotypen werden nach den

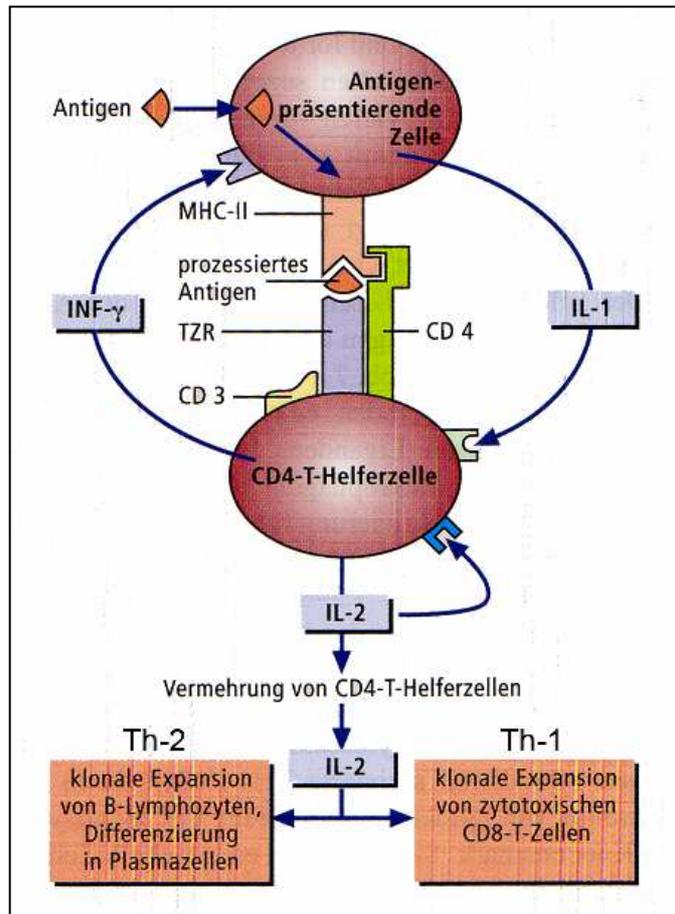


**Abbildung 1.8.1:** Zytotoxische T-Zellen (A) bzw. T-Helferzellen (B) erkennen Antigene in Verbindung mit unterschiedlichen MHC-Molekülen, die auf verschiedenen Zelltypen exprimiert werden. Zytotoxische T-Zellen erkennen das Antigen über MHC-I Moleküle, T-Helferzellen über MHC-II Moleküle. Das CD-4 und CD-8-Protein sind spezifische stimulierende Korezeptoren. Die CD-3-Proteine unterstützen die Expression des T-Zell-Rezeptors auf der Zelloberfläche und die Signaltransduktion nach Bildung des Antigen-MHC-Komplexes. (nach Thews, Mutschler, Vaupel)

Loci A, B und Dr jeweils zwei Antigene identifiziert. Durch die Anzahl an nicht-übereinstimmenden HLA-Typen ergibt sich die Anzahl an sogenannten „Mismatches“, die ein Langzeit-Transplantatüberleben negativ beeinflusst. Auf jedem Haupttyp der HLA kann es entsprechend des im Menschen vorliegenden diploiden Chromosomensatzes maximal 2 Mismatche geben. Vollidentische „Fullhouse“ Nieren zeigen das beste Transplantatüberleben. Eine schlechte HLA-Kompatibilität mit bis zu 6 möglichen Mismatches hat eine höhere Wahrscheinlichkeit eine Transplantat-Abstoßungsreaktion nach sich zu ziehen. Im Zuge einer Alloimmunisierung kommt es zur Ausbildung von HLA-Antikörpern

Mendelschen Regeln vererbt. Jedes Individuum besitzt somit zwei HLA-Haplotypen, wobei einer vom Vater und einer von der Mutter stammt. Da die Vererbung autosomal kodominant erfolgt, werden beide Haplotypen exprimiert. Für Transplantat-Abstoßungsreaktionen sind nur die Gene der Haupttypen A, B und Dr relevant. Vor einer Transplantation werden serologische Untersuchungen vorgenommen, um eine Gewebeverträglichkeit durch die HLA-Kompatibilität zu überprüfen. Für Spender und Empfänger werden auf den für eine Transplantat-Abstoßung wichtigen HLA-

(PRA = Panel Reactive Antibodies), die gegen Fremdartigene gerichtet sind. Potentielle Transplantat-Empfänger werden regelmäßig auf das Vorhandensein von PRA „gescreent“. Dabei wird der prozentuale Anteil von PRA bestimmt und somit ein Status über den Grad einer Alloimmunisierung erhoben. PRA entstehen bei Allogenkontakt z.B. durch Bluttransfusionen, Schwangerschaft oder ein früheres Transplantat. Der Grad der Alloimmunisierung kann je nach Immunitätslage oder Antigenkontakt schwanken. Bestehen sogenannte „historische“ PRA, so kann es bei einer Transplantation zu einer starken Alloreaktion nach ca. 3-5 Tagen kommen, die durch eine Boosterung von PRA's durch neu präsentierte Antigene hervorgerufen (akzelerierte Abstoßungsreaktion). Durch Identifizierung der im potentiellen Empfänger vorliegenden PRA besteht die Möglichkeit bestimmte HLA bei einer Transplantation auszuschließen, um so das Risiko einer schwerwiegenden Abstoßungsreaktion zu vermindern. Für eine Abstoßungsreaktion grundlegend wichtige Zytokine sind IL-2, welches die Proliferation aktivierter T-Zellen fördert und IFN- $\gamma$ , welches Makrophagen aktiviert. Unter dem Einfluss von IFN- $\gamma$  können Gefäßendothelzellen und Tubuluszellen die



**Abbildung 1.8.2:** Eine T-Helferzelle erkennt das prozessierte (Fremd-)Antigen im Komplex mit dem MHC-II Molekül. Es folgt die Kommunikation mit der APZ über Zytokine. IL-1 der APZ stimuliert die Proliferation der T-Helferzelle. Die T-Helferzelle stimuliert die APZ über IFN- $\gamma$  zur MHC-II Expression. IL-2 bewirkt über eine positive Rückkopplung eine weitere Vermehrung der T-Helferzellen, und unterstützt eine weitere Entwicklung in Richtung Th1- oder Th2-Zellen, woraus eine zytotoxische oder humorale Immunantwort resultiert. (modifiziert nach Thews, Mutschler, Vaupel)

Unter dem Einfluss von IFN- $\gamma$  können Gefäßendothelzellen und Tubuluszellen die

Fähigkeit erlangen MHC-II Moleküle zu exprimieren. Durch die verstärkte Antigenexpression kann eine Abstoßungsreaktion verstärkt werden und es werden mehr Zielmoleküle für Antikörper und aktivierte T-Zellen zur Verfügung gestellt. Es wird vermutet, dass den T-Helferzellen die wichtigste Rolle für den Beginn von Abstoßungsreaktionen zukommt. Durch die von ihnen produzierten Zytokine kommt es über eine autokrine Wirkung zu einer Verstärkung der Immunantwort. Gleichzeitig werden andere Zellen wie T-Killerzellen, NK-Zellen und Makrophagen aktiviert. Die insgesamt verstärkte Immunantwort führt zu einem ausgeprägten Entzündungsprozeß im Transplantat.

Eine Abstoßungsreaktion setzt sich aus drei verschiedenen Phasen zusammen:

1. Erkennungsphase:

- Fremdantigenpräsentation durch Donor-APZ (direkter Weg) oder Empfänger-APZ (indirekter Weg).
- Aktivierung der T-Zelle über T-Zell Rezeptor und kostimulatorischem Molekül.

2. Aktivierungs- und Proliferationsphase:

- Klonale Vermehrung von antigenspezifischen zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen.
- Rekrutierung von T-zellabhängigen Effektorzellen wie NK-Zellen und Makrophagen.

3. Effektorphase:

- Antigen-spezifischer Zelltod durch zytotoxische T-Zellen.
- Th1 Immunreaktion. Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ mit Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen, die zur unspezifischen Entzündungsreaktion führen. Vor allem vermittelt durch Makrophagen.

Oder

- Th2 Immunreaktion. Antikörpervermittelter komplementabhängiger Zellschaden mit Gewebszerstörung des Transplantats (humorale Abstoßungsreaktion).

Die Grundlagen für dieses Kapitel sind, sofern nicht anders angegeben, den Büchern „Nierenerkrankungen“ von Geiger, Jonas, Lenz, Kramer, Kapitel „Nierentransplantation“ von I.A. Hauser [Geiger, H. et al. 2003], „Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen“ von Thews, Mutschler, Vaupel [Thews et al. 2007] und Karlsons „Biochemie und Pathobiochemie“ [Karlson, P. 2005] entnommen.

## 1.9 Akute Abstoßungsreaktionen

Besteht ein klinischer Verdacht auf eine Abstoßungsreaktion, so wird durch eine Nadelbiopsie Nierengewebe entnommen, welches histopathologisch untersucht wird. Abstoßungsreaktionen werden anhand der Banff Klassifikation, die erstmalig 1997 aufgestellt wurde, in unterschiedliche Schweregrade eingeteilt, die sich nach dem Ausmaß der Infiltrationen durch lymphatische Zellen und der Schädigung von tubulären und vaskulären Bereichen richten [Racusen, L. C. et al. 1999]. Bei einer geringgradigen Abstoßung (Grad I nach Banff) sind mehr als 25% des kortikalen Bereiches des Nephrons von Infiltraten befallen, gleichzeitig liegt eine Tubulitis vor. Bei einer mäßiggradigen Abstoßung (Grad II nach Banff) liegt zusätzlich eine Arteritis vor. Bei beiden Klassen spricht man von einer „**zellulären Abstoßung**“. Eine „**vaskuläre Abstoßung**“ ist die schwerste Form der akuten Abstoßung (Grad III nach Banff). Hierbei liegt zusätzlich zu den Infiltraten eine ausgedehnte, transmurale Gefäßentzündung mit Nekrosen und Zerstörung der glatten Muskelzellen vor, die oft mit flächenhaften Infarkten und interstitiellen Hämorrhagien einhergehen. Selten sind zusätzlich die Glomeruli betroffen.

Die Bezeichnung „zelluläre“ und „vaskuläre“ Abstoßung bezieht sich nicht etwa auf eine Einteilung nach Th1 oder Th2 Immunantwort, und die Bezeichnung „vaskuläre“ Abstoßung meint nicht, dass es sich hierbei im Gegensatz zur zellulären Abstoßung etwa um eine humorale Immunantwort handeln könnte. Die Erfassung des Komplementfaktoren C4d als Marker für eine humorale Abstoßung mit Antikörperbildung gewinnt erst in in letzter Zeit an Bedeutung [Feucht, H. E. 2003]. Eine Revision der Banff Klassifikation mit Definition der humoralen Abstoßungsreaktion erfolgte 2005 und 2007 [Solez, K. et al. 2007; Solez, K. et al. 2008].

*Die Grundlagen für dieses Kapitel entstammen, sofern nicht anders angegeben, dem Kapitel „Nierentransplantation“ von I.A. Hauser aus dem Buch „Nierenerkrankungen“ von Geiger, Jonas, Lenz, Kramer [Geiger, H. et al. 2003].*

## **1.10 Verzögerter Funktionsbeginn der transplantierten Niere**

Eine weitere wichtige Komplikation nach Nierentransplantation stellt der verzögerte Funktionsbeginn („delayed graft function“ = DGF) dar. DGF äußert sich in einer erniedrigten glomerulären Filtrationsrate von unter 25 ml/min und kann bis zum akuten Nierenversagen (ANV) mit Hämodialysepflicht führen. Dabei kommt es zu einer Schädigung der Tubuli, die bis zu einer akuten Tubulusnekrose (ATN) fortschreiten kann. Die DGF tritt in ca 30-40% der Nierentransplantationen auf und wirkt sich negativ auf das Transplantatüberleben aus. Faktoren, die das Entstehen einer DGF begünstigen sind u.a. schlechte Organqualität aufgrund eines gehobenen Alters (>55 Jahre) oder Erkrankungen (z.B. Diabetes oder Hypertonie) des Spenders, körperliche Verfassung des Empfängers (z.B. Dauer der Dialysepflichtigkeit vor Transplantation, Grunderkrankung) und nephrotoxische Substanzen, wie zur Immunsuppression eingesetzte Calcineurininhibitoren. Den größten Einfluss auf das Entstehen einer DGF haben jedoch die Dauer der kalten und warmen Ischämiezeiten (KIZ und WIZ), die besagen, wie lange das Transplantat vom Blutkreislauf getrennt war. Der eigentliche Schaden nach einer langen Ischämiezeit tritt erst bei der Reperfusion auf, man spricht vom Ischämie/Reperfusion (I/R)-Schaden. Durch den I/R-Schaden wird eine Reihe von für das Nierengewebe schädigenden Prozessen ausgelöst und es kommt zu einer erhöhten Immunogenität des Transplantates. Durch die Minderversorgung des Transplantates mit Sauerstoff und Nährstoffen kommt es zu einer Verarmung an ATP. Die anaerobe Glykolyse wird aktiviert und führt zu einem vermehrten Anfall von Laktat. Der intrazelluläre pH Wert sinkt. Zudem wird bei Ischämie vermehrt ATP zu AMP katabolisiert, welches teilweise über Adenosin zu Hypoxanthin umgewandelt wird. Nach Reperfusion, also Wiederherstellung der Sauerstoffzufuhr, kann Hypoxanthin zu Xanthin oxidiert werden, wobei reaktive Sauerstoffspezies entstehen [Koyama, I. et al. 1985]. Dies führt neben massiven Gewebeschädigungen zur Aktivierung von proinflammatorischen Zytokinen, die

eine Immunreaktion auslösen. Über die Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen werden Leukozyten (Makrophagen, Granulozyten) rekrutiert, die eine Entzündungsreaktion und dadurch den Gewebeschaden verstärken. Über das im Zuge der Entzündungsreaktion freigesetzte IFN- $\gamma$  erfolgt eine verstärkte MHC-I/-II Expression [Daemen, M. A. et al. 1999]. In der Folge werden T-Lymphozyten aktiviert und die Gefahr einer Abstoßungsreaktion steigt.

Eine ATN äußert sich typischerweise im histologischen Bild durch eine Aufweitung der Tubuli, eine Degeneration des Bürstensaumes bei proximalen Tubuli und ein abgeflachtes Tubulusepithelium [McLaren, B. K. et al. 2004].

*Die Grundlagen für dieses Kapitel entstammen, sofern nicht anders angegeben, dem Kapitel „Nierentransplantation“ von I.A. Hauser aus dem Buch „Nierenerkrankungen“ von Geiger, Jonas, Lenz, Kramer [Geiger, H. et al. 2003].*

## **1.11 Chronische Allograft Nephropathie**

Die Chronische Allograft Nephropathie (CAN) ist eine weitere schwerwiegende Diagnose, die mit einem Funktionsverlust des Transplantates einhergeht und ist das Resultat multipler schädigender Faktoren. Als immunologisch bedingte Form hat sie die ungünstigste Prognose und ist mit dem Auftreten chronisch subakuter oder chronisch rezidivierender akuter Abstoßungen assoziiert. Die CAN beinhaltet aber auch das Transplantat schädigende nichtimmunologische Faktoren (z.B. Bluthochdruck, Ciclosporintoxizität). Differentialdiagnostisch lassen sich diese Ursachen für die Entstehung einer CAN schlecht trennen. Die Entstehung einer CAN wird weiterhin durch das Transplantat schädigende Faktoren wie I/R-Schaden begünstigt. Histologische Hauptmerkmale sind Interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie (IF/TA) sowie Gefäßschäden wie Intimahyperplasie und -Fibrose.

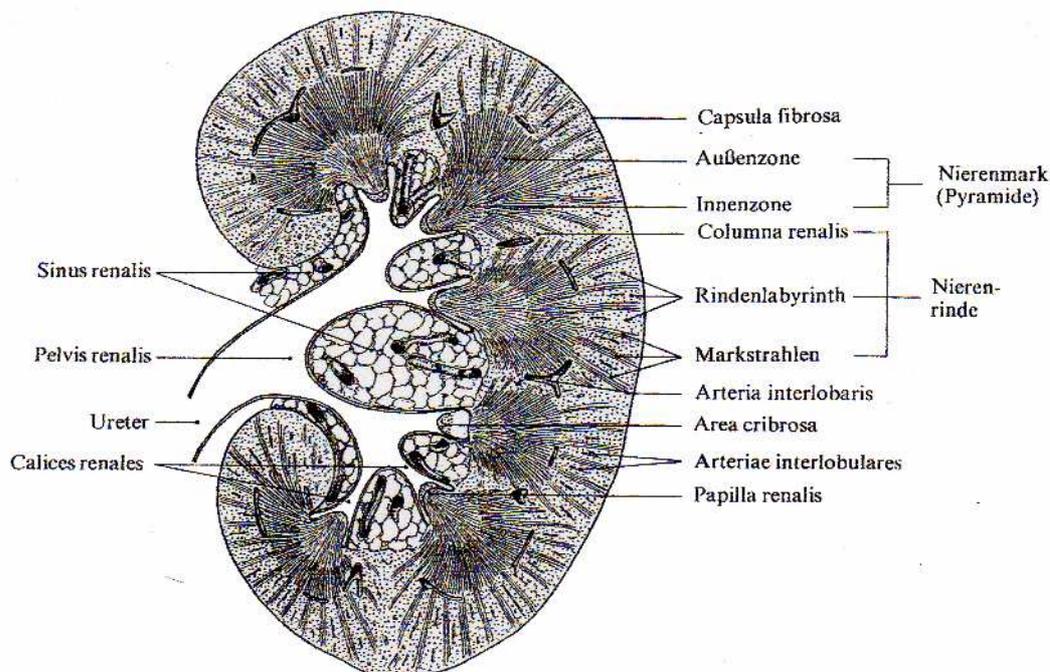
*Die Grundlagen für dieses Kapitel entstammen dem Kapitel „Nierentransplantation“ von I.A. Hauser aus dem Buch „Nierenerkrankungen“ von Geiger, Jonas, Lenz, Kramer [Geiger, H. et al. 2003].*

## 1.12 Morphologie der Niere

Die Beschreibung der Nierenmorphologie bezieht sich in erster Linie auf das Tubulus- mit Sammelrohrsystem.

### 1.12.1 Makroskopie der Niere

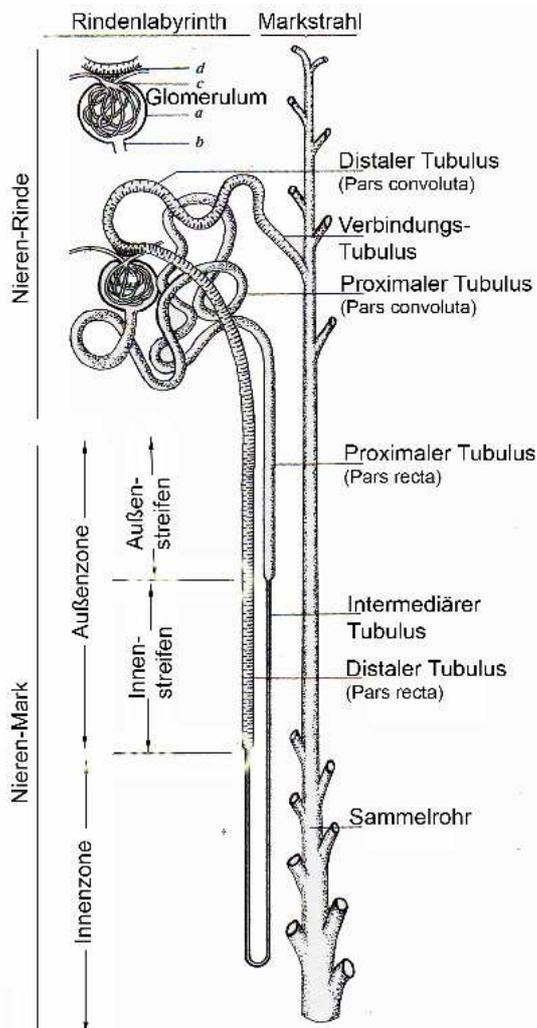
In der Übersichtsmakroskopie der Niere (Abbildung 1.12.1.1) sind zwei verschiedene Zonen zu erkennen; die Nierenrinde und das Nierenmark, die sich in ihrer Struktur unterscheiden. Das Nierenmark besteht aus fein gestreiften Markpyramiden, die mit ihren zugespitzten, leistenförmigen Enden, den Markpapillen (Papillae renalis) in die Nierenkelche reichen. Zwischen der Basis der Nierenpyramiden und der Capsula fibrosa liegt die Nierenrinde, die sich als Columnae renales auch hiluswärts zwischen die Pyramiden ausdehnt. Die Rindenschicht besteht aus dem Rindenlabyrinth (Pars convoluta), das von Fortsätzen der Marksubstanz, den Markstrahlen (Pars radiata), durchsetzt ist.



**Abbildung 1.12.1.1:** Längsschnitt durch eine menschliche Niere (halbschematisch, natürliche Größe) zeigt die grobe Architektonik der Niere (nach Bucher et al.).

### 1.12.2 Detaillierte Nierenmorphologie

Die Bestandteile des Nierenparenchyms sind die Nephrone und das Sammelrohrsystem. Die Nephrone bestehen aus den Nierenkörperchen (Glomeruli), in



**Abbildung 1.12.1.2:** Schematische Darstellung eines Nephrons mit langer Henle'scher Schleife und den verschiedenen Nierenzonen sowie eines Glomerulum mit Bowmanscher Kapsel (a), Harnpol (b), Gefäßpol (c), distalem Tubulus mit Macula densa (d) (nach Bucher et al.).

denen der Primärharn gebildet wird. Der Primärharn wird in den zum Nephron gehörenden Nierenkanälchen (Tubuli) zu 99% rückresorbiert. Die Tubuli laufen in der Nierenrinde zum Teil gewunden (Pars convoluta), zum Teil in das Rindenlabyrinth hineinragend gestreckt (Pars recta). Die Glomeruli und die Partes convolutae liegen im Rindenlabyrinth. Die Partes rectae und die Sammelröhrchen bilden, zu kleinen Bündeln vereinigt, zunächst die Markstrahlen des Cortex und schließlich einen Teil der Medulla renalis. In den Markpyramiden finden sich außer den Gefäßbündeln und dem Sammelrohrsystem nur gerade verlaufende Kanälchen. Das Mark wird in zwei Zonen eingeteilt, die schon makroskopisch zu erkennen sind. Dies sind zum einen die an die Rinde angrenzende Außenzone, in der arterielle und venöse Blutgefäße sowie proximale und distale gestreckte Tubuli (Partes rectae), intermediäre Tubuli und astlose Sammelrohre zu erkennen sind. Zum anderen ist dies

die zur Papille abschließende Innenzone, in der von Bestandteilen des Nephrons nur noch die den Scheitel der langen Schleifen bildenden intermediären Tubuli vorkommen. Die Sammelrohre sind hier verzweigt und vereinigen sich schließlich

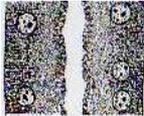
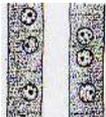
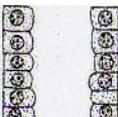
zu den Ductus papillares. Die Grenze zwischen Außen- und Innenzone liegt dort, wo die intermediären Tubuli in die distalen Tubuli (dicker aufsteigender Teil der Henle'schen Schleife, englisch: „Thick ascending limb“ (TAL)) übergehen. Die Außenzone wird in äußeren und inneren Streifen unterteilt, die Grenze liegt am Übergang von proximalen Tubuli in die intermediären Tubuli. Im Innenstreifen liegen somit keine proximalen Tubuli vor. In der Abbildung 1.12.1.2 ist eine lange Henle'sche Schleife zu erkennen, die aus intermediärem Tubulus besteht und in die Innenzone hineinreicht. Bei der größeren Anzahl an Henle'schen Schleifen handelt es sich allerdings um kurze Henle'sche Schleifen, deren Scheitelpunkt in der Außenzone liegt.

### 1.12.3 Histologie der Nephrone und der Sammelrohre

Nach dem wechselnden mikroskopischen Bau werden an den Nierenkanälchen verschiedene Teilstücke beschrieben (Abbildung 1.12.1.2), die sich auch in ihrer Funktion unterscheiden. Die morphologischen Kennzeichen der einzelnen Abschnitte sind in Tabelle 1.12.3.1 beschrieben. In allen Tubulusabschnitten besteht die Wand aus einem einschichtigen Epithel und einer Basalmembran, welche mit dem spärlichen interstitiellen Bindegewebe in Verbindung steht. Der **proximale Tubulus (PT)**, dem etwas mehr als die Hälfte des Nephrons angehört, beginnt mit dem gewundenen Teil, welcher lichtmikroskopisch gleich dem nachfolgenden gestreckten Teil gebaut ist. Die Zellen des PT besitzen eine mikroskopisch erkennbare basale Streifung. Die Zellgrenzen der Epithelzellen des PT sind meist nicht zu erkennen. Die freie Epitheloberfläche ist unscharf gegen das Lumen abgegrenzt, weil der PT einen ausgeprägten Bürstensaum aufweist. Die Ausbildung des Bürstensaumes wird von proximal nach distal schwächer. Der **intermediäre Tubulus**, auch dünne Henle'sche Schleife genannt, hat einen deutlich geringeren Durchmesser als das Hauptstück. Die Epithelzellen sind stark abgeplattet und nur dort in das Lumen vorgebuchtet, wo der dunkle, linsenförmige Zellkern liegt. Der **distale Tubulus** hat im Gegensatz zum PT scharf gegen das Lumen begrenzte Zellen. Es liegt ebenfalls eine mikroskopisch erkennbare basale Streifung vor. Der distale Tubulus hat im Verlauf von gestrecktem (TAL) und

---

gewundenem (distales Konvolut, englisch: „Distal convoluted tubule“ (DCT)) Teil unterschiedliche große Durchmesser und Lichtungen. Der **Verbindungstubulus** (englisch: „Connecting tubule“, (CNT)) ist der etwas unauffällige kurze Endabschnitt des Nephron, der ohne ersichtliche Grenzen oder Übergänge das distale Konvolut und das Sammelrohr verbindet. Das Epithel des **Sammelrohrsystems** besteht aus hellen Hauptzellen mit deutlich sichtbaren Zellgrenzen. Mit der Größe der Kanälchen nimmt die Zellhöhe zu: In den initialen Sammelrohren sind die Epithelzellen noch kubisch wie in den Verbindungstubuli, im Ductus papillares hochprismatisch. Neben den charakteristischen segmentspezifischen Zellen existieren ab dem distalen Teil des DCT sowie im Verbindungstubulus und Sammelrohr eingestreute spezielle Zellen, die sogenannten „intercalated cells“ (Schaltzellen).

Kanälchenabschnitt	Morphologisches Bild	Durchmesser	Epithelzellen	Freie Oberfläche	Zellgrenzen	Zellkerne	Basale Streifung
Proximaler Tubulus (PT)		50-60 µm	Kubisch	Oft konvex, undeutl. begrenzt (Bürstensaum)	i.d.R. nicht sichtbar	± kugelig	Gut ausgebildet, in Richtg. distal abnehmend
Intermediärer Tubulus		10-15 µm	Stark abgeplattet	Durch Kerne vorgebuchtet	Nicht sehr scharf	Linsenförmig vorspringend	Fehlt
Distaler Tubulus, pars recta (TAL)		25-30 µm	Etwas niedriger als im PT	Scharf begrenzt kein Bürstensaum	Undeutlich	Kugelig bis linsenförmig	Gut ausgebildet
Distales Konvolut (DCT)		40-45 µm	Etwas niedriger als im PT	Scharf begrenzt kein Bürstensaum	Etwas deutlicher	Etwas näher Richtg. Lumen liegend	Gut ausgebildet
Verbindungstubulus (CNT)	Nahtloser Übergang	ca.25 µm	Kubisch	Scharf begrenzt	Etwas deutlicher	± kugelig	Fehlt
Sammelrohrsystem ↓ bis Papille		40 µm ↓ bis 200-300 µm	Kubisch ↓ bis hochprismatisch	Scharf begrenzt, oft etwas konvex	Deutlich ↓ bis Sehr deutlich	± kugelig zahlreich	Fehlt

**Tabelle 1.12.3.1:** Übersicht über den lichtmikroskopischen Bau der verschiedenen Nierenkanälchen. Modifiziert nach Bucher et al.

Die Grundlagen für das Kapitel 1.12 sind dem Artikel „A standard nomenclature for structures of the kidney“ von Kriz [Kriz, W. et al. 1988] und dem Buch „Cytologie und mikroskopische Anatomie des Menschen“ von Huber und Wartenberg entnommen [Bucher, O. et al. 1997].

## Zielsetzung

IL-18 ist ein Schlüssel-Zytokin der angeborenen und erworbenen Immunabwehr und hat grundlegenden Einfluss auf die Entstehung verschiedener systemischer und lokaler Entzündungsreaktionen. Eine konstitutive Expression des IL-18 ist in vielen Gewebetypen des Menschen bekannt. Eine Beteiligung des IL-18 an immunologischen Komplikationen bei Transplantationen konnte in Tiermodellen gezeigt werden und wird beim Menschen vermutet.

In der vorliegenden Arbeit sollte aufgeklärt werden, ob eine Beteiligung des IL-18 an immunologischen Prozessen in der menschlichen Niere aufgrund einer lokalen Expression möglich ist. Dazu sollte überprüft werden, ob die Voraussetzungen gegeben sind, um aktives IL-18 in der gesunden humanen Niere freizusetzen. Es sollten die Kompartimente und Zelltypen identifiziert werden, die IL-18 in der gesunden menschlichen Niere bilden.

Da beschrieben ist, dass sich genetische Unterschiede auf die Bildung von IL-18 auswirken können, sollte die Beteiligung relevanter IL-18 Polymorphismen an der Entstehung immunologischer Komplikationen aufgedeckt werden, die häufig nach Nierentransplantation auftreten. Dazu sollte eine mögliche Auswirkung der IL-18 SNP's auf die Inzidenz von DGF und Abstoßungsreaktionen geprüft werden.

Außerdem sollte geprüft werden, ob sich Unterschiede in der Schwere und der Genese verschiedener Transplantatnephropathien wie ATN, CAN sowie zelluläre und vaskuläre Abstoßung in einer unterschiedlichen zellulären Expressionsstärke und Lokalisation von IL-18 im Transplantat niederschlagen.



## **2 Materialien und Methoden**

Die Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen ist in Kapitel 2.5.1 aufgestellt. Die Bezugsquellen bzw. Hersteller der verwendeten Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte sind in den Kapiteln 2.5.2 und 2.5.3 angegeben.

### **2.1 Lokalisation des IL-18 in der Niere**

#### **2.1.1 Material**

Das Material für die Untersuchungen von IL-18 in gesundem Nierengewebe wurde aus den unbetroffenen Regionen von Tumornephrektomiepräparaten gewonnen. Das Material wurde für diagnostische Zwecke freigegeben und nach nationalen ethischen Leitlinien behandelt, personenbezogene Daten wurden anonymisiert.

#### **2.1.2 Fixierung und Einbettung der Gewebeproben**

Die Gewebeproben, aus denen Gewebeschnitte für immunhistochemische Färbungen und *in situ*-Hybridisierung hergestellt werden sollten, wurden über Nacht in Paraformaldehydlösung fixiert. Anschließend wurden sie entwässert und in Paraffin eingebettet. Die Entwässerung und Einbettung der Gewebeproben in Paraffinblöcke erfolgte im Institut für Pathologie der J.W. Goethe-Universität Frankfurt mit freundlicher Unterstützung durch Herrn R. Liebertz.

### 2.1.3 Anfertigen und Entparaffinieren von Gewebeschnitten

Aus den Paraffinblöcken der Gewebeproben wurden mit Hilfe von einem Schlittenmikrotom und Einmal-Stahlklingen 4 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Diese wurden auf silanisierte Objektträger aufgezogen und anschließend bei 4°C gelagert. Bei der Anfertigung der Schnitte, die für *in situ*-Hybridisierung verwendet werden sollten, wurden die Gerätschaften zuvor mit Alkohol gereinigt und es wurden Einmalhandschuhe getragen, um die Kontaminationsgefahr mit RNasen zu minimieren. Vor der Durchführung von immunhistochemischen Färbungen oder von *in situ*-Hybridisierungen wurden die Gewebeschnitte entparaffiniert und rehydriert. Dazu wurden die Gewebeschnitte in einem Brutschrank 45 min bei 37°C ablaufen gelassen. Anschließend wurden die Gewebeschnitte zwei-mal für 10 min in Xylol deparaffiniert. Anschließend erfolgte zur Rehydrierung die Behandlung in der absteigenden Alkoholreihe (2-mal 5 min Ethanol 100 %, 5 min Ethanol 96 %, 5 min Ethanol 70 %, 5 min Ethanol 50 % und 5 min Aqua dest.).

### 2.1.4 Gewebeaufschluss für Western Blot

Die in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Gewebeproben wurden unter permanenter Kühlung mit flüssigem Stickstoff in einer Reibeschale zerrieben. Anschließend wurde das Gewebe mit einem Homogenisator nach Potter in SDS Probenpuffer homogenisiert.

### 2.1.5 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Homogenate erfolgte mit einem BCA-Assay. Bei dem BCA-Assay bilden Proteine mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in alkalischer Lösung Komplexe. Die  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen des Komplexes werden zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduziert, welche mit BCA (Bicinchoninsäure) im Alkalischen einen violetten Farbkomplex bilden. Die Absorption des Farbkomplexes ist proportional zu der Menge an reduzierten

Kupferionen bzw. der Proteinmenge. Anhand einer Eichgeraden der Messwerte von Proben mit bekannter Proteinkonzentration kann die Proteinmenge bestimmt werden. Die Reduktion der Kupferionen erfolgt durch die Seitenketten von Cystein, Tyrosin, Tryptophan und die Peptidbindung.

Die alkalische BCA-Lösung wurde auf einer Mikrotiterplatte vorgelegt. Gleiche Mengen an Proteinlösungen der Homogenate und von Rinderserum-Eichlösungen mit bekannter Konzentration wurden hinzupipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend die Absorption bei 550 nm mit einem ELISA-Reader ausgelesen. Die Proteinmengen wurden durch Auswertung der Messwerte mit Hilfe einer Exceltabelle ermittelt.

### **2.1.6 Auftrennung der Proteine mit SDS-PAGE**

Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach der Methode von Laemmli. Hierbei erfolgt eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe auf einem Polyacrylamidgel in einem elektrischen Feld („Polyacrylamidgelelektrophorese“ = PAGE). Damit die Auftrennung der Proteine unabhängig von ihrer Ladung erfolgt, wird den Proteinproben Natrium Dodecyl Sulfat (SDS) zugesetzt. SDS wirkt als Detergenz und denaturiert die Proteine. Die assoziierten SDS-Moleküle verleihen dem Molekül soviel negative Ladung, dass die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld unabhängig von der Proteinladung ist. In einem vertikalen Gießstand wurde zunächst ein Trenngel gegossen, welches nach vollständiger Polymerisation von einem Sammelgel überschichtet wurde, in welches der Trennkamm gesteckt wurde. Die Proteinproben wurden 10 min bei 95°C inkubiert. Es wurden von jeder Proteinprobe 40 µg Gesamtprotein auf das Gel aufgetragen. Ein Molekulargewichtstandard wurde ebenfalls aufgetragen. Die Laufzeit im Trenngel betrug bei 170 Volt und 15 A ca. 1 Stunde.

### 2.1.7 Western Blot

Nachdem die Proteine mit SDS-PAGE aufgetrennt wurden, wurden sie auf eine Polyvinyliden-Difluorid (PVDF)-Membran geblottet. Zu diesem Zweck wurden zwischen Anode und Kathode das Gel und eine mit Transferpuffer getränkte Membran gelegt. Zwischen Anode und Membran sowie zwischen Kathode und Gel wurden mit Transferpuffer getränkte Filterpapiere gelegt. Der Transfer erfolgte im elektrischen Feld bei 400 mA für 1,5 Stunden. Zur Kontrolle eines erfolgreichen Transfers wurde die Membran in einer Ponceaulösung geschwenkt. Dadurch wurden die Proteine angefärbt. Der Marker wurde auf der Membran angezeichnet und die Membran mit Aqua dest. gewaschen. Zur Blockierung von unspezifischen Bindungen (und zur Vermeidung einer Interaktion des Antikörpers mit der Membran) wurde die Membran für 2 Stunden bei 4°C mit der Blockierlösung auf einem Rotierschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran in TBS gewaschen und über Nacht mit dem Maus Anti-human IL-18 Antikörper (Immunotools, 3,5 µg/ml, in der AK-Pufferlösung), bzw. mit dem Ziege Anti-human IL-18 Antikörper (R&D Biosystems, 3,5 µg/ml, in der AK-Pufferlösung) inkubiert. Am nächsten Tage wurde die Membran 3-mal für 3 min mit TTBS gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen und einmal für 5 min in TBS um Tween zu entfernen. Anschließend wurde die Membran für 2 Stunden mit dem Meerrettich-Peroxidase („horseradish-peroxidase“ = HRP)-konjugierten Kaninchen Anti-Maus, bzw. Kaninchen Anti-Ziege Sekundärantikörper (beide Amersham, 1:5000 in TBS) inkubiert. Es folgten 3 5-minütige Waschschrte mit TBS. Nach einem Waschschrte (s.o.) wurde der gebundene Antikörper über das „Enhanced Chemoluminescence (ECL) kit“ detektiert. Durch die emittierten Lichtsignale wurden Biomax X-Ray Filme belichtet und hierüber die Proteinbanden sichtbar gemacht. Der Größenmarker wurde von der Membran auf den entwickelten Film übertragen.

### 2.1.8 RNA-Isolierung

Das Nierengewebe wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Unter weiterer Kühlung mit flüssigem Stickstoff wurde das Gewebe in einem Mörser zerrieben. Zur Freisetzung der RNA wurde eine zur Homogenisierung erforderliche Menge der  $\beta$ -Mercapto-Ethanol-haltigen Lösung D hinzugegeben (ca. 3 ml). In einem Potter wurde das Gewebe homogenisiert. Das Homogenisat wurde zu jeweils 300  $\mu$ l in autoklavierte Eppendorf Reaktionsgefäße aliquotiert und jedes Aliquot mit 30  $\mu$ l 2 M Natriumacetatlösung angesäuert und gevortext. Anschließend wurden jeweils 300  $\mu$ l Phenol hinzugegeben, gevortext und die Proben 15 min auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurden jeweils 60  $\mu$ l eines Gemisches aus Chloroform und Isoamylalkohol (49:1) hinzugegeben und in der Kühlzentrifuge bei 4°C für 20 min und 16000 UpM zentrifugiert.

Zur Präzipitation wurde jeweils die obere wässrige, RNA-haltige Lösung abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß, in dem 300  $\mu$ l eiskaltes Isopropanol vorgelegt war, überführt. Die RNA wurde über Nacht bei -20°C gefällt und am nächsten Tag bei 4°C, 15 min bei 13800 UpM ab zentrifugiert.

Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die Pellets mit 300  $\mu$ l 70 %-igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und nochmals mit 100 %-igem Ethanol gewaschen. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die Pellets ca. 30 min luftgetrocknet. Die Pellets wurden dann jeweils in 30  $\mu$ l nukleasefreiem Wasser (DEPC-H<sub>2</sub>O) aufgenommen und bei 37°C für 20 min in einem Thermomixer gelöst. Anschließend wurde die Konzentration der RNA-Lösungen photometrisch bestimmt und die Aliquots bei -80°C eingefroren.

### 2.1.9 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Nukleinsäurebestimmung erfolgte über die photometrische Messung der Absorption bei 260 nm mit Hilfe eines Spektralphotometers. Um die optische Dichte der Nukleinsäurelösung zu messen, wurde zuvor als Nullwert die Extinktion

von Wasser (Verdünnungsmedium) bestimmt. Zur Berechnung der Konzentration der Nukleinsäurelösung wurde die gemessene optische Dichte multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor der Lösung sowie einem Multiplikationsfaktor, der für doppelsträngige DNA 50 und für RNA 40 beträgt. Der Verdünnungsfaktor gibt die Konzentration in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  an, die die jeweilige Nukleinsäurelösung bei einer optischen Dichte (OD) von 1 in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 10 mm besitzt. Eine OD<sub>260</sub> von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bzw. einer RNA-Konzentration von 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

### **2.1.10 Reverse Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion)**

Die RT-Reaktion wird angewendet um aus der isolierten RNA cDNA zu gewinnen, welche dann als Ausgangsmaterial für PCR (s.Kap.2.1.11) genutzt werden kann. Dazu dient die aus Retroviren gewonnene reverse Transkriptase, welche eine RNA-abhängige DNA-Polymerase ist. Es wurde die Mäuse-Leukämie-Virus-Reverse-Transkriptase (M-MLV-RT) verwendet.

Die Menge an eingesetzter RNA wurde anhand der ermittelten RNA-Konzentrationen berechnet. Zunächst wurden die berechnete Menge Wasser und RNA in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Es wurden randomisierte Hexamer-Primer hinzupipettiert. Das Reaktionsgefäß wurde bei 75°C für 10 min in einem Thermomixer inkubiert. Hierbei wurde die Sekundärstruktur der RNA aufgespalten und den Primergemischen ermöglicht, sich an den Poly-A-Schwanz der RNA anzulagern. Nachdem die Probe abgekühlt war, wurde  $\text{MgCl}_2$ , PCR-Puffer,  $\beta$ -Mercapto-Ethanol, Nukleotidtriphosphate (dNTP), RNase-Inhibitor und M-MLV RT, nach Pipettierschema (Tab. 2.1.10.1) hinzugegeben. Die Reaktion wurde bei 37°C 30 min ablaufen gelassen und durch eine 5 minütige Inkubation bei 95°C beendet.

10 µg	RNA
2 µl	Random hexamer-Primer
8 µl	MgCl <sub>2</sub> (25mM)
4 µl	PCR-Puffer (10x)
2 µl	β-Mercapto-Ethanol
4 µl	dNTP (10mM)
2 µl	RNase Inhibitor
0,5 µl	M-MLV RT
ad 40 µl	Aqua dest.

**Tabelle 2.1.10.1:** Pipettierschema RT-Reaktion

### 2.1.11 DNA Nachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)

Durch die Polymerase Kettenreaktion-Methode (engl.: „Polymerase chain reaction“ = PCR) können kurze und spezifische Abschnitte der DNA kopiert und amplifiziert werden, in dem der in vivo DNA-Replikationsprozeß nachgeahmt wird. Für das zu vervielfältigende DNA-Fragment werden zwei flankierende Oligonukleotide (Primer) gesucht, die eine komplementäre Sequenz zur Matrize haben und deren 5`-Terminus die Produktlänge begrenzt. Die DNA-Polymerase braucht einen kurzen Abschnitt doppelsträngiger DNA, um einen Startpunkt zu finden. Die zu amplifizierende DNA wird bei einem bestimmten Ionenmilieu, den Primern, der desoxy-Nukleotidtriphosphaten (dNTPs; N = A, T, G, C) und einer thermostabilen DNA-Polymerase (z.B. Taq-Polymerase, ein rekombinantes und modifiziertes Enzym von *Thermus aquaticus*, einem Bakterium aus heißen Quellen) zu sehr hohen Kopienzahlen innerhalb kurzer Zeit repliziert. Dabei verläuft die Reaktion in sich wiederholenden Schritten von Denaturierung, Primeranlagerung (annealing) und Primerverlängerung (extension). Die Hitzestabilität der Enzyme ist wichtig für die vielen Denaturierungsschritte während der PCR.

Zum Nachweis von IL-18, Caspase und P<sub>2X7</sub> aus Nieren-mRNA wurde das Produkt der RT-Reaktion (cDNA) eingesetzt. Es wurden die in Tabelle 2.1.11.1

aufgelisteten Primer eingesetzt, die zuvor durch die Firma Invitrogen geliefert wurden.

	Primer-Forward	Primer-Reverse
<b>IL-18</b>	5`-CAGACCTTCCAGATCGCTTC-3`	5`-CCCCCAATTCATCCTCTTTT-3`
<b>P<sub>2X7</sub></b>	5`-CTGTCCCCAGGAAGTTGTGT-3`	5`-GCGAGTCTGGTCTTGGACTC-3`
<b>Cas-pase-1</b>	5`-GTTTCTTGGAGACATCCC-3`	5`-TAATGTCCTGGGAAGAGG-3`

**Tabelle 2.1.11.1:** Tabelle der eingesetzten Primerpaare

Die Reaktionsbedingungen in einem 30 µl Ansatz waren wie folgt:

6 µl	RT-Produkt
1,2 µl	MgCl <sub>2</sub> (25mM)
2,4 µl	PCR-Puffer (10x)
1 µl	dNTP (10mM)
1 µl	Primer-Forward
1 µl	Primer-Reverse
0,2 µl	Taq-Polymerase
17,2 µl	Aqua dest.

**Tabelle 2.1.11.2:** Pipettierschema PCR

Die Annealing-Temperaturen wurden je nach G/C-Gehalt der Basensequenzen berechnet. Dazu wurde folgende Formel angewendet:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 4 \times \text{GC} + 2 \times \text{AT}$$

In das PCR-Programm wurde die Annealing-Temperatur des Primers mit der niedrigsten Temperatur gewählt. Die Durchführung der PCR erfolgte nach folgendem Schema in einem Biometra Thermocycler:

	Zeit	Temperatur	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	4 min	95°C	1
Denaturierung	30 sec	95°C	30
Annealing	30 sec	50°C (IL-18)	
		52°C (P <sub>2x7</sub> ) 54°C (Caspase-1)	
Extension	60 sec	72°C	
Finale Extension	5 min	72°C	1

**Tabelle 2.1.11.2:** PCR-Schema

Die PCR-Produkte wurden anschließend durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und visualisiert (s. Kap. 2.1.12).

## 2.1.12 Agarosegelelektrophorese

DNA ist ein negativ geladenes Makromolekül. An jeder Monomereinheit trägt die DNA eine Ladungseinheit. Somit ist die Länge eines DNA-Abschnittes proportional zu seiner negativen Ladung. Geladene Makromoleküle lassen sich ihrer Größe nach mit Hilfe von Agarosegelen in einem elektrischen Feld auftrennen. Um die aufgetrennten DNA-Fragmente sichtbar zu machen, werden diese mit Ethidiumbromid behandelt. Ethidiumbromid lagert sich in der DNA an und interkaliert mit dieser. Nach Anregung mit UV-Licht fluoresziert diese Verbindung. Für die Auftrennung der PCR-Produkte wurden 2 %-ige Agarosegele gegossen. Dazu wurde die entsprechende Menge an Agarose in Elektrophorese-puffer erhitzt, bis die Lösung klar war. Unter Rühren wurde die Lösung auf etwa 50°C abkühlen gelassen und es wurde 0,1 µg/ml Ethidium bromid hinzugegeben. Die Agaroselösung wurde in Gelträger gegossen und ein Gelkamm zur Bildung der Probenaschen eingesteckt. Nach dem Abkühlen wurden die Gele in eine Gelkammer, welche mit Elektrophorese-puffer befüllt war, gegeben. Die DNA-Proben wurden mit 10 % DNA-Probenpuffer versetzt und für 10 Minuten bei 75°C

inkubiert, anschließend auf Eis abgekühlt. Das im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau wandert aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften an der DNA-Front, so kann die Wanderung der DNA im Gel verfolgt werden. Neben die entsprechenden DNA-Proben wurde ein Größenstandard in die Probetaschen der Gele gegeben. Es wurde ein elektrisches Feld angelegt und die Proben 40 Minuten bei 70 V und 400 mA aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend unter UV-Beleuchtung ausgewertet und fotografisch dokumentiert.

### **2.1.13 Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

Nach elektrophoretischer Auftrennung konnte die DNA mit Hilfe des Perfectprep Gel Cleanup Kits aus dem Agarosegel eluiert werden. Dazu wurde die DNA-Bande unter UV-Bestrahlung mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in ein leer gewogenes Eppendorfgefäß überführt und gewogen. Pro mg Gel wurden 3 µl Bindepuffer zugesetzt, und die Gelstücke bei 50°C unter permanentem Schütteln auf einem Thermomixer für 10 Minuten inkubiert. Nach dem vollständigen Auflösen des Geles wurde die DNA-Agarose-Lösung mit der gleichen Menge Isopropanol versetzt und auf einen Eppendorf Spin-Filter pipettiert. Dieses wurde bei 10000 UpM für 1 Minute in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die an die Filtereinheit gebundene DNA wurde durch Zugabe von 750 µl Waschpuffer und anschließendes Zentrifugieren für 1 Minute bei 10000 UpM gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit 30 µl Aqua dest. durch erneute Zentrifugation (1 min, 10000 UpM) eluiert.

### **2.1.14 *In situ*-Hybridisierung**

Das Prinzip der *in situ*-Hybridisierung dient dem Nachweis von Nukleinsäuren (hier mRNA) in einzelnen Zellen von Gewebeschnitten. Dabei wird eine künstlich hergestellte Sonde aus Nukleinsäure eingesetzt, die über Basenpaarung an die nachzuweisende mRNA bindet („hybridisiert“). Die Sonde ist spezifisch (komplementär) zur nachzuweisenden mRNA-Sequenz. Über den Nachweis der

mRNA kann die Aktivität eines Genes in einzelnen Zellen nachgewiesen werden. Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Variante wurde eine cRNA Sonde verwendet, deren Uridintriphosphate mit Digoxigenin markiert waren, worüber sie sich mit einer Antikörperreaktion nachweisen ließ. Für die Herstellung von *in situ*-Sonden wird eine Sequenz des nachzuweisenden Genabschnittes in Plasmide von kompetenten Zellen transfiziert. Dies geschieht, um über die Vermehrung der Bakterienkolonien eine große Menge an cDNA herzustellen. Diese cDNA wird anschließend extrahiert und linearisiert. Anschließend wird mittels entsprechender RNA-Polymerase unter Zusatz von markierten Nukleotiden die eigentliche RNA-Sonde hergestellt.

#### **2.1.14.1 Herstellung der Sonde**

Bei der Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Sonde wurde das TOPO TA Cloning Kit verwendet. Es wurde die in Kapitel 2.1.11 gewonnene IL-18 DNA eingesetzt. Der pCRII-TOPO-Plasmid-Vektor besitzt einen SP6- und einen T7-Promotor, die gegenläufig die Klonierungs-Stelle begrenzen. Es wurden spezifische Restriktionsenzyme (NOT1 und KPN1) eingesetzt, die jeweils vor einer Polymerase-Bindungsstelle schneiden. Bei der folgenden *in vitro* Transkription wurde jeweils ein DNA-Fragment amplifiziert, dessen interner IL-18-spezifischer Anteil in Sense-Richtung am 5'-Ende vom Sp6-Promoter, in Antisense-Richtung vom T7-Promotor flankiert wurde. Über eine PCR mit SP6- bzw. T7-Polymerase, der jeweils ein Nukleotidmix mit Digoxigenin-markiertem Uridintriphosphat zugesetzt wurde, konnte so eine spezifische markierte RNA-Sonde „Sense“ und „Antisense“ mit einheitlicher Länge hergestellt werden.

#### **2.1.14.2 Klonieren der cDNA**

Das IL-18 DNA-Fragment wurde in den pCRII-TOPO-Vektor der Plasmide von chemisch kompetenten *E. coli* Bakterien ligiert, welche durch Hitzeschockbehandlung in die Zellen aufgenommen wurden. Dazu wurden die Zellen im

Wasserbad genau 30 Sekunden bei 42°C behandelt. Anschließend wurden die Zellen 2 Minuten auf Eis gestellt. Die Zellen wurden anschließend 1 Stunde bei 37°C im Schüttelinkubator bei 225 Upm in SOC-Medium inkubiert um sie anschließend auf Ampicillin- und X-Gal-haltige Agarplatten auszuplattieren. Die Klonierungsstelle der Plasmide lag in einem  $\beta$ -Galaktosidase-Reportergen, welches die Bildung des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase kodiert. Dieses Enzym kann das Substrat X-Gal zu einem blauen Farbstoff umsetzen. Bei einer erfolgreichen Transfektion wird das  $\beta$ -Galaktosidase-Reportergen zerstört und die Zellkolonien erscheinen weiß. Am nächsten Tag wurde eine Blau-Weißselektion durchgeführt. Transformierte (weiße) Zellkolonien wurden aufgenommen und in 3 ml ampicillinhaltiges LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert.

#### **2.1.14.3 Isolieren und Aufreinigen der cDNA**

Am nächsten Tage wurde die Vektor-DNA mit dem PlasmidMini Kit freipräpariert und aufgereinigt. Dazu wurden die Zellen in Falcon-Tubes bei 6000 UpM für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und zum Entsorgen autoklaviert. Die Zell-Pellets wurden in 10 ml RNase-haltigem S1-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 10 ml S2-Puffer und 10 minütigem Behandeln mit einem Schüttler wurde die DNA freigesetzt. Anschließend wurden 10 ml S3-Puffer hinzugefügt und für 10 min geschüttelt. Zur Präzipitation der Proteine und der genomischen DNA wurde für 15 min bei 10000 UpM in der Standzentrifuge zentrifugiert. Ein Rundfilter und Fix 100 Säulen wurden mit N2-Puffer befeuchtet. Der Überstand wurde filtriert und über die Säulen gegeben. Die Plasmid-DNA adsorbierte an den Säulen und wurde 2 mal mit 4 ml N3-Puffer gewaschen. Zur Elution der Plasmid-DNA wurden 2 ml N5-Puffer über die Säulen gegeben und zu jeweils 1 ml in Eppendorfgefäßen aufgefangen. Die DNA wurde mit jeweils 700  $\mu$ l Isopropanol durch 20 minütiges Zentrifugieren bei 4°C gefällt. Das Pellet wurde mit 70 %-igem und 100 %-igem Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in jeweils 100  $\mu$ l Aqua dest. aufgenommen. Die DNA-Mengen wurden photometrisch bestimmt.

#### 2.1.14.4 Restriktionsverdau der cDNA und Herstellen des cRNA-Hybrides

Zur Herstellung der linearsierten Template-DNA's wurde jeweils ein Verdau mit 10 µg der cDNA und dem Restriktionsenzym KPN1 für die „Sense“ Sonde und NOT1 für die „Anti-Sense“ Sonde angesetzt. Die Ansätze wurden 3 Stunden bei 37°C inkubiert, anschließend wurden die Enzyme durch 5-minütiges Inkubieren bei 95°C deaktiviert.

Um zu bestätigen, dass es sich um die gewünschte Basensequenz handelte, wurde eine Probe der DNA mit der Post zum Sequenzieren an die Firma GATC (Konstanz) geschickt.

Nun wurde das markierte RNA-Hybrid hergestellt. Dazu wurden für die „Sense“ bzw. „Antisense“-Sonde jeweils ein Reaktionsansatz nach folgendem Schema in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert:

1 µl	RNase-Inhibitor
2 µl	Dig-NTP- Markierungsmaix
2 µl	Transkriptions-Puffer
2 µl	DNA
2 µl	Sp6-/ T7-Polymerase
11 µl	Aqua dest.

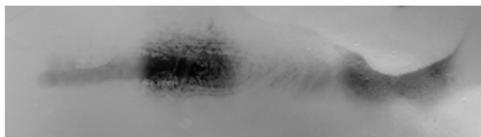
##### 2.1.14.4.1 Pipettierschema cRNA Synthese

Die Ansätze wurden für 2 Stunden bei 37°C auf einem Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde durch Zusatz von 2 µl DNase (20 Units) und 15-minütiger Inkubation bei 37°C überschüssige DNA abgebaut. Anschließend erfolgte die Fällung der RNA-Sonde. Dazu wurden zu den Ansätzen jeweils 1 µl RNase-Inhibitor, 2 µl t-RNA als Sondenträger und RNase-Schutz, 2,4 µl Lithiumchlorid (4 M) und 75 µl eiskaltes Ethanol (100 %) zugesetzt. Die Ansätze wurden für 2 Std bei -80°C gelagert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 13000 UpM wurden die entstandenen Pellets mit Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in 100 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Die Lagerung der Sonde erfolgte bei -80°C.

### 2.1.14.5 Kontrolle der Sonde

Von den erhaltenen Sense- und Antisense-Sonden wurden jeweils 5  $\mu$ l und 0,5  $\mu$ l in 5  $\mu$ l RNA-Probenpuffer pipettiert und der Ansatz jeweils auf 10  $\mu$ l mit Aqua dest. Aufgefüllt. Die Proben wurden neben einem RNA-Größenmarker auf ein 2 %-iges Agarosegel aufgetragen und 45 min bei 70 V und 400 mA laufen gelassen. Nachdem die Banden in der richtigen Größe (598 bp) detektiert wurden, wurde die RNA auf eine Nylon-Membran geblottet, um anschließend eine Kontrolle der Dig-markierten Sonde mittels Farbreaktion durchführen zu können. Der Aufbau des

Sense		Antisense	
0,5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	5 $\mu$ l



**Abbildung 2.1.14.5.1** zeigt das Ergebnis der qualitativen Prüfung der Sonden „Sense“ und „Antisense“ bei 2 verschiedenen Konzentrationen.

Kapillarblot erfolgte gemäß dem folgenden Schema: Zwei Lagen Whatman 3 MM Filterpapier wurde auf die Gelaufungsfläche der Apparatur gelegt, wobei die Enden der Papierstreifen jeweils in die 20x SSC-Lösung der Elektrophorese-Tanks tauchten. Danach wurden das Agarosegel, das an den Kanten mit Parafilm abgedeckt wurde, die zurechtgeschnittene Nylon-Membran und 4

Lagen Whatman 3 MM Filterpapier aufgelegt. Für die Kapillarwirkung sorgte eine 10 cm hohe Schicht an zurechtgeschnittenen Papiertüchern, die mit einem 2 Kilogramm-Gewicht beschwert wurden. Der Transfer der RNA-Moleküle erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Nach dem Waschen in Leitungswasser wurde die Nylonmembran 5 min unter UV-Licht fixiert. Als Qualitätscheck erfolgte eine Detektion der cRNA-Sonde über das gekoppelte Digoxigenin mittels Anti-Digoxigenin-Antikörper, an die alkalische Phosphatase gekoppelt ist (Anti-Digoxigenin-Fab-Fragment-aP). Hierfür wurde die Membran 5 min in Dig I-Puffer äquilibriert und zur Absättigung der Membran 1 Stunde bei Raumtemperatur in Blocking- Lösung geschwenkt. Anschließend wurde die Nylon-Membran 30 min in frischer Blocking-Lösung, die auf 1:15000 Anti-Digoxigenin-Fab-Fragment-aP eingestellt war, inkubiert. Nach der Erstantikörper-Reaktion wurde die Membran zweimal 15 min mit Dig I-Puffer gewaschen, um überschüssig gebundene Antikörper zu entfernen. Die Antikörperdetektion erfolgte über die Behandlung mit

der Cromogenlösung, die durch Auflösen einer kommerziell erhältlichen NBT-Tablette hergestellt wurde. Nach eintretender Färbung wurde die Reaktion durch Waschen mit Leitungswasser beendet.

#### **2.1.14.6 Durchführung der *in situ*-Hybridisierung**

Die Durchführung erfolgte unter Einhaltung von Vorsichtsmaßnahmen, die ein Kontaminationsrisiko mit RNasen verminderten und das Verwenden von autoklavierten (Glas-) Geräten und die Verwendung von Einmalhandschuhen einschloß.

Die Gewebeschnitte wurden vor der *in situ*-Hybridisierung in einem Brutschrank bei 56°C für 45 min getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte entparaffiniert und rehydriert (s.Kap. 2.1.3). Nach zweimaligem Waschen mit PBS-Puffer für 5 min wurden die Schnitte 30 min bei 37°C mit Proteinase K-Lösung behandelt, um die RNA durch Andauen der Proteine für die Sonde zugänglich zu machen. Daraufhin wurde 5 min mit PBS-Puffer gewaschen. Zur Fixierung der Schnitte wurden diese anschließend für 5 min mit PFA-Lösung behandelt. Es folgte eine Azetylierung, um die Bildung unspezifischer Amidbindungen zu vermeiden. Dazu wurden die Schnitte für 10 min mit einer Triethanolamin-Lösung behandelt, die unmittelbar vor Verwendung auf 0.25 % Essigsäureanhydrid eingestellt wurde. Die Schnitte wurden 2-mal für 5 min mit PBS-Puffer gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 3 min 30 %, 50 %, 70 %, 96 % Ethanol) dehydriert. Nachdem die Schnitte 2-mal 3 min mit 100 % Ethanol behandelt wurden, wurden sie für 30 min an der Luft getrocknet.

Die Sonden Sense bzw. Antisense wurden mit einer Konzentration von 5 µg pro 100 µl Hybridisierungs-Puffer auf verschiedene Schnitte gegeben. Diese wurden bei 42°C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert .

Nach der Hybridisierung ist das RNase-freie Arbeiten nicht mehr notwendig, da die gebildeten cRNA/mRNA Doppelstränge stabil gegenüber dem Abbau durch Nukleasen sind.

Zur Entfernung nicht hybridisierter oder unspezifisch gebundener Sonde schlossen sich nach der Hybridisierung folgende Waschschr tte an:

- 10 min mit 4x SSC, Raumtemperatur
- 30 min mit 4x SSC, 42°C
- 30 min mit 4x SSC, 42°C

Um Hintergrundfärbung durch überschüssige RNA-Sonde zu vermeiden, erfolgte eine Behandlung mit 400 µl RNase A in 200 ml Rnase-Puffer (30 min, 37°C). Es folgten weitere Waschschr tte:

- 30 min mit 4x SSC, 42°C
- 30 min mit 4x SSC, 42°C
- 10 min PBS, Raumtemperatur

Nach dem letzten Waschschr tt wurden die Schnitte 5 min mit Dig I-Puffer inkubiert, um sie auf die nachfolgende Immundetektion der cRNA-mRNA-Hybride vorzubereiten. Um unspezifische Bindungen des anti-Digoxigenin-Antikörpers im Gewebeschnitt zu verhindern, wurden die Schnitte zunächst mit 5 % BSA/0.3 % Tween in Dig I-Puffer behandelt. Die Antikörperreaktion erfolgte über Nacht bei 4°C mit Anti-Digoxigenin in Dig I-Puffer (1:400). Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS-Puffer entfernt.

Für die sich anschließende Detektion der gebundenen Antikörper wurde die Cromogenlösung, die durch Auflösen einer kommerziell erhältlichen NBT-Tablette hergestellt wurde, auf die Schnitte gegeben. Unter dem Mikroskop wurde die Färbung kontrolliert und nach beginnender Lila-Färbung wurde die Farbreaktion abgestoppt. Dazu wurden die Schnitte 2-mal 10 min mit Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte eingedeckt und über das Mikroskop fotografisch dokumentiert.

### **2.1.15 Peroxidase Färbung**

Bei der angewendeten Peroxidase-Färbung wird ein unmarkierter Primärantikörper gegen ein Antigen (hier menschliches IL-18) eingesetzt. Mit einem biotinylierten Sekundärantikörper wird der Primärantikörper markiert.

Anschließend wird ein Peroxidasekonjugat (Extravidin) hinzugegeben, welches an den Biotinrest des Sekundärantikörpers bindet. Durch die Zugabe eines Chromogens (AEC), welches durch die Peroxidase zu einem Farbstoff umgesetzt wird kann der Komplex schließlich sichtbar gemacht werden.

Die Gewebeschnitte wurden, wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben, entparaffiniert und rehydriert. Um die Antigene zu demaskieren wurden die Schnitte in dem Citratpuffer in der Mikrowelle 10 min bei 500 Watt und 10 min bei 250 Watt behandelt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Schnitte 3-mal 5 min in PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 5 min mit 3%-igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt, um die endogene Peroxidase zu inaktivieren. Es wurde anschließend 2-mal für 5 min mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu blockieren wurden die Gewebeschnitte für 30 min mit humanem Serum (20% in PBS) inkubiert. Anschließend wurde der Maus Anti IL-18 Antikörper (Firma Immunotools) 1:300 verdünnt in PBS auf die Schnitte gegeben und diese in einer feuchten Kammer für eine Stunde bei 37°C und anschließend über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3-mal 5 min in PBS gewaschen und mit dem biotinylierten Kaninchen Anti-Maus Antikörper (Dako, 1:250 verdünnt in PBS mit 1% Rinderserum) für 30 min bei 37°C inkubiert. Es folgten 3 Waschschrte in PBS für 5 min. Anschließend wurde das Peroxidase-Konjugat (Extravidin 1:100) auf die Schnitte gegeben und 30 min inkubiert. Nach 3 5-minütigen Waschschrten in PBS wurde die Färbung durch Zugabe von einer AEC-Lösung entwickelt. Der Fortschritt der Färbung wurde unter dem Mikroskop beobachtet und nach Eintritt der Färbung in Leitungswasser abgestoppt. Die Schnitte wurden eingedeckt, mikroskopisch begutachtet und fotografisch dokumentiert.

### **2.1.16 Immunfluoreszenzfärbung**

Bei der Immunfluoreszenzfärbung werden, wie bei der Peroxidasefärbung, unmarkierte Primärantikörper eingesetzt. Die gegen die konstante Region des Primärantikörpers gerichteten Sekundärantikörper sind hierbei jedoch mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Bei Bestrahlung der Antikörper emittieren sie Licht

mit einer spezifischen Wellenlänge. Durch die Verwendung von Antikörpern verschiedener Spezies, die anschließend mit unterschiedlich markierten Sekundärantikörpern detektiert werden, können bei dieser Methode verschiedene Antigene in unterschiedlichen Farben dargestellt werden. Bei der Betrachtung der Färbungen durch einen entsprechenden Filter, der nur für die emittierte Wellenlänge durchlässig ist, können verschieden markierte Proteine nacheinander betrachtet bzw. fotografiert und ihre Lokalisation ausgewertet werden. Der (ungefärbte) Hintergrund erscheint dunkel, und es können geringe Mengen Antigen detektiert werden.

In den hier durchgeführten Färbungen wurden Doppelfärbungen von IL-18 mit verschiedenen Markerproteinen durchgeführt. Der IL-18 Antikörper war ein Maus Anti-human IL-18 (Immunotools), die Markerproteine waren Kaninchen Antikörper. Die Sekundärantikörper waren Ziegenantikörper und gegen Maus bzw. Kaninchen gerichtet. Eine Übersicht über die verwendeten Antikörper ist in den Tabelle 2.1.16.1 und 2.1.16.2 gegeben.

Die Gewebeschnitte wurden, wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben, entparaffiniert und rehydriert. Um die Antigene zu demaskieren wurden die Schnitte in einem Citratpuffer in der Mikrowelle 10 min bei 500 Watt und 10 min bei 250 Watt behandelt. Nach dem Abkühlen folgten 3 Waschschrte für 5 Minuten in PBS. Um unspezifische Bindungen zu blockieren wurde 100% fötales Rinderserum auf die Schnitte gegeben und bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Primärantikörper, Maus Anti-IL18 und ein Kaninchenantikörper, in der entsprechenden Verdünnung in PBS auf den Schnitt gegeben und für eine Stunde bei 37°C und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde 3-mal 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Sekundärantikörper entsprechend in PBS verdünnt und auf die Schnitte gegeben. Nach dem einstündigen Inkubieren bei 37°C wurde für die Kernfärbung bei Durchlicht-Mikroskopie eine 4,6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)-Lösung (1:1000 in PBS) auf die Schnitte gegeben und für 5 min inkubiert. Für Schnitte an denen konfokale Mikroskopie durchgeführt werden sollte, erfolgte die Kernfärbung für 5 min mit dem Farbstoff TO-PRO-3 (2 µM in PBS). Anschließend wurden die Schnitte 3-mal für 5 Minuten in PBS gewaschen.

Schnitte, die als Negativkontrollen dienten, wurden gleich behandelt und anstelle der Primärantikörper wurden Maus- bzw. Kaninchenserum in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt. Die Schnitte wurden mit Aqua-Tex eingedeckt, mikroskopisch betrachtet und fotografisch dokumentiert.

### Primärantikörper

<i>Humanes Antigen</i>	<i>Spezies</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>
IL-18	Maus	1:300	Immunotools
Calbindin-D28k	Kaninchen	1:1000	Sigma
Aquaporin-2	Kaninchen	1:500	Sigma
Caspase-1	Kaninchen	1:120	Santa Cruz
P <sub>2X7</sub>	Kaninchen	1:50	Chemicon
V-H <sup>+</sup> -ATPase	Kaninchen	1:500	Santa Cruz
Tamm-Horsfall Protein	Kaninchen	1:500	Biotrend
Nf-κB	Kaninchen	1:50	Santa Cruz

**Tabelle 2.1.16.1** zeigt die eingesetzten Primärantikörper mit entsprechenden Verdünnungen, Antigen, Spezies und Herstellern

### Sekundärantikörper

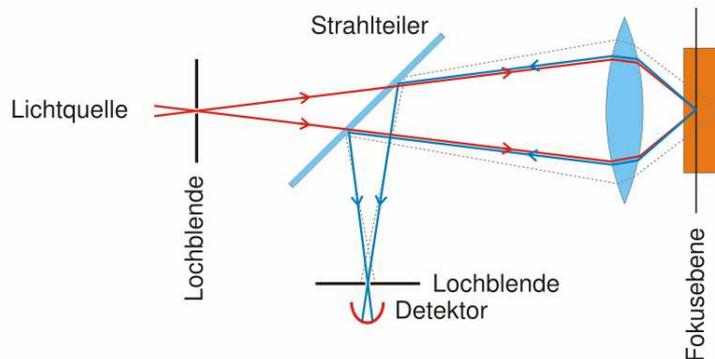
<i>Antigen (Spezies)</i>	<i>Gekoppelter Farbstoff</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Emissions- maximum</i>
Maus	Cy-3 (rot)	1:500	Dianova	565 nm
Kaninchen	FITC (grün)	1:20	Sigma	518 nm

**Tabelle 2.1.16.2** zeigt die verwendeten Sekundärantikörper mit entsprechender Verdünnung, Antigen, Farbstoff, Wellenlänge und Hersteller

## 2.1.17 Mikroskopie

Die Immunfärbungen wurden mit einem Durchlicht-Mikroskop bei 100 und 200-facher Vergrößerung begutachtet und mit einer digitalen Mikroskopier-Kamera dokumentiert. Um eine zelluläre Lokalisation von IL-18 auszuschließen und die Lokalisation in den Schaltzellen zu bestimmen wurde eine konfokale Laserscanning-Mikroskopie durchgeführt. Der Vorteil dieser Mikroskopiermethode

ist eine größere Auflösung bei relativ dicken verwendeten Gewebeschnitten von 4  $\mu\text{m}$ . Mit der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie kann man zusätzlich zu den



**Abbildung 2.1.17.1:** Schematische Darstellung eines konfokalen Laserscanning Mikroskopes. Ein Laserstrahl rastert punktweise ein Objekt ab, wobei er in der Fokusebene der zu mikroskopierenden Probe maximal fokussiert ist. Es werden nun die Fluoreszenzmoleküle angeregt, die sich im Lichtweg des fokussierten Laserstrahles befinden. Die reflektierten Lichtstrahlen aus der fokussierten Ebene werden durch eine Lochblende gefiltert und auf der Bildebene abgebildet. Die Signalanteile, die aus anderen Ebenen oberhalb oder unterhalb der Fokusebene in der Probe stammen, werden dadurch ausgeblendet und es kommt zu einer Schichtaufnahme. Hinter der Lochblende befindet sich ein lichtempfindlicher Empfänger, aus dessen Signal punktweise ein Bild zusammengesetzt wird. Der Durchmesser der Blende bestimmt zusammen mit dem Mikroskop-Objektiv und dessen Apertur die Dicke des optischen Schnittes.

horizontalen x- und y-Ebenen in der vertikalen z-Ebene fokussieren und einzelne Punkte darstellen, die genau einer Brennebene des Objektes entsprechen. Dadurch bietet sich die Möglichkeit eine Aussage zu treffen, ob mehrere Proteine in ein und derselben Zelle oder Zellkompartiment vorliegen. So kann eine Überlagerung von verschiedenen Zellkompartimenten ausgeschlossen werden, die bei der Durchlichtmikroskopie aufgrund dicker Gewebeschnitte auftreten können. Die konfokalen Bilder wurden mit freundlicher Unterstützung von Herr Dr. R. Popp und Herr PD Dr.

R.P. Brandes des Institutes für kardiovaskuläre Physiologie des Klinikums der J.W. Goethe-Universität Frankfurt aufgenommen. Bei der Aufnahme der Bilder wurde ein Multi-Tracking Verfahren angewendet. Dabei wurde jeder Kanal einzeln abgescannet, um das Auftreten von Nebensignaleffekten zu vermeiden. Es wurden optische Schichtdicken von 1-2,5  $\mu\text{m}$  abgescannet. Die Auswertung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen erfolgte nach fotografischer Dokumentation mit der Software Adobe Photoshop, Version 9,0. Dabei wurden die durch die

verschiedenen Farbfilter aufgenommenen Bilder als Ebenen übereinandergelegt und es konnte somit die Lokalisation der Färbungen bewertet werden.

## **2.2 Polymorphismenuntersuchungen**

### **2.2.1 Patienten**

Die Patientengruppe umfasste 147 Nierentransplantatempfänger kaukasischer Herkunft mit terminaler Niereninsuffizienz. Bei den Patienten wurde im Zeitraum vom 23. Februar 2000 bis 11. Mai 2006 am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main eine Nierentransplantation durchgeführt. Das Alter der Patienten betrug zwischen 21 und 74 Jahre, das mittlere Alter betrug  $50,8 \pm 12,9$  Jahre, der Median lag bei 53 Jahren. 94 Empfänger (63,9%) waren männlich, 53 waren weiblich (36,1%). Die Patienten erhielten standard-mäßig eine immunsuppressive Kombinationstherapie, bestehend aus Cyclosporin A, Mycophenolatmofetil (MMF) und Steroiden. Im Falle eines hohen immunologischen Risikos (z.B. hohe PRA Konzentrationen), erhielten die Patienten zusätzlich Anti-T-Zell Antikörper oder Anti IL-2 Rezeptor Antikörper zur Prophylaxe einer Abstoßungsreaktion.

Von den zu den Transplantaten zugehörigen Spendern konnte in 70 Fällen Blut gewonnen werden, welches zur Identifizierung der Spender-Genotypen diene. Die Genotypen von verwandten Lebendspendern wurden nicht in die Auswertungen einbezogen um eine erblich bedingte Beeinflussung der Allelverteilungen zu vermeiden.

Die Patienten wurden über die Inhalte der Studie informiert und erklärten schriftlich ihre Einverständnis zur Teilnahme und zur erforderlichen Blutentnahme.

### **2.2.2 Kontrollgruppe**

Die Kontrollgruppe bestand aus 326 gesunden Kaukasiern. Davon waren 153 Personen weiblich und 173 Personen waren männlich. Das Blut wurde vom Blutspendedienst Frankfurt zur Verfügung gestellt, alle personenbezogenen Daten wurden anonymisiert.

### **2.2.3 Datenerhebung**

Die klinischen Verlaufsdaten sowie die transplantations- und spenderbezogenen Daten wurden anhand der Krankenakten der Patienten am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität im Archiv, der Transplantationsambulanz und im Frankfurter Büro der deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO) erhoben.

### **2.2.4 Extraktion genomischer DNA aus EDTA-Blut**

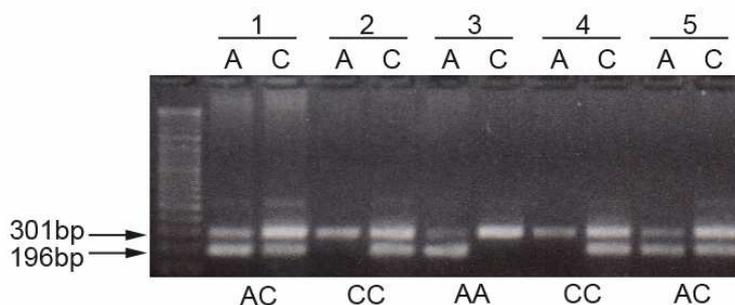
Die durch Venenpunktion gewonnenen Blutproben wurden in EDTA-Röhrchen abgenommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Extraktion der genomischen DNA aus Vollblut wurde mit Hilfe des QIAamp-DNA Blood Mini Kit durchgeführt. Der erste Schritt bestand aus der Lyse der zellulären Bestandteile der Blutprobe. Nach dem Auftauen wurden 200  $\mu\text{l}$  EDTA-Blut mit 20  $\mu\text{l}$  Qiagen Protease-Stammlösung und 200  $\mu\text{l}$  Qiagen-ALPuffer versetzt, 15 Sekunden lang gevortext und 10 Minuten bei  $56^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

Anschließend wurden zum Lysat 200  $\mu\text{l}$  100% Ethanol zugegeben und 15 sec gevortext. Im nächsten Schritt wurde das Lysat in die Spin-columns mit einer Filtersäule mit Silica-Membran gegeben und 1 Minute mit 8000 UpM zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und die an die Silica-Membran der Säule adsorbierte DNA wurde in 2 Schritten gewaschen.

Dazu wurden zunächst 500  $\mu\text{l}$  Qiagen-AW-1-Waschpuffer, in die Spin-columns gegeben und bei 8000 UpM mit der Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurden 500  $\mu\text{l}$  Qiagen-AW-2-Waschpuffer auf die Säule gegeben und bei 13000 UpM 3 min zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Zur Elution der an die Säule gebundenen DNA wurden 200  $\mu\text{l}$  Elutionspuffer AE auf die Säule gegeben und 4 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 8000 UpM mit der Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Filtrat enthielt die genomische DNA. Diese wurde photometrisch vermessen, anschließend aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 2.2.5 Bestimmung der Genotypen der IL-18 Promotorgenpolymorphismen

Die SNP's -607C/A und -137G/C wurden jeweils mit einer sequenzspezifischen PCR bestimmt die mit einem „Touch down Verfahren“ optimiert wurde. Bei dieser Methode wird für jeden Genotypen des entsprechenden SNP ein Primerpaar generiert, bei dem eine Primersequenz genau auf der Mutationsstelle liegt. Die Annealingtemperatur wird so gewählt, dass sich das Primer-DNA-Hybrid nur dann bildet, wenn der jeweilige Genotyp vorliegt. Nach einigen wenigen Zyklen wird die Annealing-Temperatur erniedrigt, um eine genügend hohe Ausbeute zu erhalten. Unspezifisch gebildete Amplimere fallen dann mengenmäßig nicht mehr ins Gewicht, da eine ausreichend hohe Menge von spezifischen Amplimere bei der höheren Annealingtemperatur

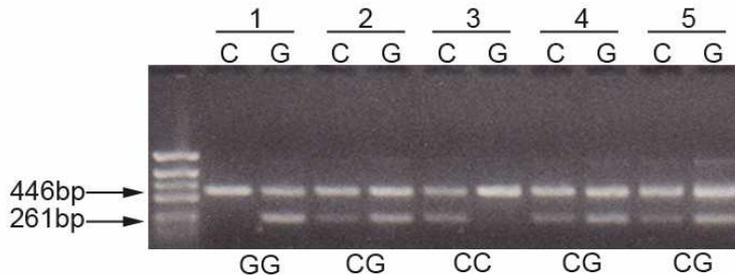


**Abbildung 2.2.5.1:** Das Agarosegel zeigt die Amplimere von 5 verschiedenen DNA Proben des SNP -607C/A. Für jede DNA-Probe wurden die PCR-Produkte der beiden sequenzspezifischen PCR's nebeneinander aufgetragen. Bei den Individuen 1 und 5 ist in beiden PCR's neben der Kontrollbande (301 bp) eine sequenzspezifische Bande (196 bp), sie sind somit heterozygot für SNP -607C/A. Individuum 2 und 4 haben nur eine sequenzspezifische Bande bei der PCR für das C-Allel und sind C-homozygot. Individuum 3 ist A-homzygot bei SNP -607C/A.

amplifiziert wurde. Es müssen für jeden SNP 2 PCR-Ansätze mit 2 unterschiedlichen Primerpaaren angesetzt werden. Als interne Kontrolle fungierte ein Primer, der oberhalb der mutierten Stelle ansetzte und mit dem gemeinsamen Antisense Primer ein größeres PCR Produkt ergab. Die für die PCR eingesetzten Primer sind in Tabelle 2.2.5.3 aufgeführt, die Pipettierschemata sind der Tabelle 2.2.5.4 zu entnehmen. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Endvolumen von 25 µl durchgeführt. Die Temperaturverläufe der PCR für SNP -607C/A sind in Tabelle 2.2.5.5 dargestellt. Durch die sequenzspezifischen Primer des SNP -607C/A wurden 196 Basenpaar (bp) Amplimere gebildet, der Kontrollprimer ergab ein 301 bp großes Amplimer. Die Temperaturverläufe der PCR für SNP -137G/C sind in Tabelle 2.2.5.6 dargestellt. Die sequenzspezifischen Primer

ergaben ein Amplimer von 261 bp, der Kontroll-Primer ergab ein Amplimer von 446 bp.

Um die Richtigkeit der DNA-Typisierung zu kontrollieren wurden in jedem PCR-



**Abbildung 2.2.5.2:** Das Agarosegel zeigt die Amplimere der DNA von 5 verschiedenen Individuen. 2, 4 und 5 sind heterozygot für SNP -137G/C, da sie bei beiden sequenzspezifischen PCR's (für das C-Allel und das G-Allel) neben der 446 bp großen Bande eine spezifische 261 bp große Bande aufweisen. Individuum 1 ist homozygot für das G-Allel, da hier nur eine sequenzspezifische 261 bp-Bande bei der PCR für das G-Allel vorliegt. Individuum 3 ist homozygot für das C-Allel.

wurden in 2%igen Agarosegelen mit einer Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht, fotografiert und ausgewertet.

Ansatz bereits typisierte DNA-Proben nochmals typisiert. So wurden ca. 15% der DNA-Proben doppelt typisiert. Die Ergebnisse stimmten in allen Fällen mit den bereits vorhandenen Ergebnissen überein. Die entsprechenden Primer wurden von der Firma Invitrogen geliefert. Die Amplimere

<b>SNP -607C/A</b>	
Forward „C“	5'-GTTGCAGAAAGTGTA AAAATTATTAC-3'
Forward „A“	5'-GTTGCAGAAAGTGTA AAAATTATTAA-3'
Forward „Control“	5'-CTTTGCTATCATTCCAGGAA-3'
Common Reverse	5'-TAACCTCATTCCAGGACTTCC-3'
<b>SNP -137G/C</b>	
Forward „G“	5'-CCCCAACTTTTACGGAAGAAAAG-3'
Forward „C“	5'-CCCCAACTTTTACGGAAGAAAAC-3'
Forward „Control“	5'-CCAATAGGACTGATTATTCCGCA-3'.
Common Reverse	5'-AGGAGGGCAA AATGCACTGG-3'

**Tabelle 2.2.5.3:** Auflistung der in den sequenzspezifischen PCR's verwendeten Primer

	<b>-607</b>	<b>-137</b>
PCR-Puffer (10x)	2,5 µl	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,0 µl	1,5 µl
dNTP (10 mM)	1,0 µl	1,0 µl
Primer Control Forward	1,0 µl	0,8 µl
Primer Common Reverse	1,0 µl	1,0 µl
Sequenzspezifischer Primer	1,0 µl	1,2 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl	0,2 µl
Aqua dest.	16,3 µl	16,8 µl

**Tabelle 2.2.5.4:** Pipettierschema für die sequenzspezifischen PCR's der SNP's -607 C/A und -137G/C. Die Primer-Stammlösungen lagen in einer Konzentration von 100 µM vor.

	<b>Zeit</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zyklenanzahl</b>
Initiale Denaturierung	4 min	95°C	1
Denaturierung	20 sec	95°C	
Annealing	40 sec	64°C	7
Extension	40 sec	72°C	
Denaturierung	20 sec	95°C	
Annealing	40 sec	57°C	25
Extension	40 sec	72°C	
Finale Extension	5 min	72°C	1

**Tabelle 2.2.5.5:** PCR-Programm für die sequenzspezifische PCR des SNP -607C/A

	Zeit	Temperatur	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung	4 min	95°C	1
Denaturierung	20 sec	95°C	
Annealing	40 sec	68°C	5
Extension	40 sec	72°C	
Denaturierung	20 sec	95°C	
Annealing	40 sec	62°C	25
Extension	40 sec	72°C	
Finale Extension	5 min	72°C	1

**Tabelle 2.2.5.6:** PCR-Programm für die sequenzspezifische PCR des SNP -137C/A

## 2.3 Färbungen der Biopsien

Die Färbung von IL-18 an den Biopsien erfolgte analog der in Kapitel 2.1.15 beschriebenen Methode.

### 2.3.1 Färbung der Makrophagen, T-Lymphozyten und B-Lymphozyten in Biopsien

Die immunhistochemischen Färbungen der Makrophagen, T- und B-Lymphozyten wurden mit freundlicher Unterstützung von Frau Dr. Kiss im Institut für Zelluläre und Molekulare Pathologie DKfZ Heidelberg durchgeführt. Für die Färbung der Makrophagen wurde ein Anti-CD68 Antikörper, für T-Lymphozyten ein Anti-CD45RO Antikörper und für B-Lymphozyten ein Anti-CD45RA Antikörper verwendet. Alle Antikörper stammten von der Firma DAKO, Glastrup Dänemark.

### 2.3.2 Auswertung der Biopsiefärbungen

Die Auszählung der infiltrierenden Zellen erfolgte bei 400-facher Vergrößerung. Es wurden pro Biopsie in 20 zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern die IL-18 positiv gefärbten Zellen im Interstitium ausgezählt. Die Bewertung der Färbeintensität der Nierenparenchymzellen erfolgte nach subjektiver Einschätzung. Es wurden die gefärbten Schnitte mikroskopisch begutachtet und in die 4 Kategorien „keine Färbung“, „leichte Färbung“, „mittelgradige Färbung“ und „starke Färbung“ eingestuft. Die Auswertungen liefen verblindet, d.h. während des Auszählens war die Diagnose nicht bekannt und erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Frau Dr. Kiss im Institut für Zelluläre und Molekulare Pathologie DKfZ Heidelberg.

### 2.4 Statistische Auswertungen

Um zu überprüfen, ob sich verschiedene Gruppen in ihren Testergebnissen signifikant voneinander unterscheiden, wurden die Gruppen im Falle von kategoriellen Variablen mittels zweiseitigem Chi-Quadrat Test verglichen. Da Chi-Quadrat Tests bei den berechneten Werten erst ab einer Gruppengröße  $>5$  zuverlässig sind, wurde bei kleineren Gruppengrößen der exakte Fisher-Test angewendet.

Im Falle von metrischen Variablen wurde das Vorliegen einer Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft. Bei diesem Rechenmodell wird eine bestimmte Verteilungsfunktion zugrunde gelegt und die Abweichung der Messwerte von der Normalverteilung wird auf einem 5% Signifikanzniveau überprüft. Da bei den metrischen Variablen keine Normalverteilungen vorlagen, wurden die Werte der Gruppen mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen, bei mehr als 2 Gruppen wurde hierzu der Kruskal Wallis Test verwendet. Ergaben sich bei den Kruskal Wallis Tests signifikante Unterschiede, erfolgte ein Post-Hoc Test nach Bonferroni mit paarweisem Datenvergleich.

Als Schätzgröße für das relative Risiko wurde die Odds-Ratio (OR) gewählt und mit dem 95%-Konfidenzintervall (Vertrauensbereich) angegeben. Die Odds-Ratio gibt das Quotenverhältnis von den Gruppen mit bzw. ohne Risikofaktor an und gilt

als Maß dafür, um wieviel die Chance größer ist zu erkranken oder ein bestimmtes Merkmal auszuprägen. Bei einer Odds-Ratio von 1,0 ist das Risiko für ein bestimmtes Ereignis in beiden Gruppen gleich groß. Das Konfidenzintervall beschreibt die Präzision der Lageschätzung eines Parameters (z.B. Mittelwert). Das hierbei berechnete Konfidenzintervall gibt den Bereich um die berechnete Maßzahl an, in dem der wahre Parameter der Grundgesamtheit mit hoher Wahrscheinlichkeit (95%), liegt. Liegt bei der Odds-Ratio das 95% Konfidenzintervall insgesamt unter 1 oder über 1, kann man davon ausgehen, dass das berechnete Risiko relevant ist.

Im Rahmen einer Qualitätskontrolle wurden die Häufigkeiten der verschiedenen SNP's auf eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) überprüft. Dabei wurden die tatsächlich beobachteten Häufigkeiten mit den erwarteten Werten aus dem entsprechenden mathematischen Gesetz (Hardy-Weinberg-Gesetz:  $p^2+2pq+q^2=1$ ) verglichen. Dieses Gesetz besagt, dass die Häufigkeiten der beiden homozygoten Genotypen (homozygoten p-Allel und homozygoten q-Allel) und die Häufigkeit des heterozygoten Genotyps (pq) von Generation zu Generation in einer Idealpopulation konstant bleiben. Um eine Abweichung vom HWE bewerten zu können, wurde mit einem Chi-Quadrat Anpassungstest die erwarteten mit den beobachteten Genotypen-Häufigkeiten verglichen.

Die Haplotypenanalysen wurden mit Hilfe der Software PHASE 2.1 durchgeführt. Diese Software bedient sich eines auf einem Bayes-Verfahren beruhenden Algorithmus [Stephens, M. et al. 2001; Stephens, M. et al. 2003]. Dabei wurde für die gegebenen Genotypen das jeweils wahrscheinlichste zugehörige Haplotypenpaar eines jeden Individuums rekonstruiert. Darüber hinaus wurde mit dem Chi-Quadrat-Test beidseitig geprüft, ob sich die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Haplotypen zwischen den Gruppen signifikant unterschied.

Die statistischen Berechnungen wurden mit den Softwarepaketen SPSS (Version 12,0) und BIAS (Version 8.4.2) vorgenommen, es wurde bei allen Berechnungen ein Signifikanzniveau von 5% zugrundegelegt; P-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

## 2.5 Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Zubereitungen

### 2.5.1 Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen und sonstigen Zubereitungen

Im Folgenden sind die Puffer und Lösungen in der Reihenfolge ihres Erscheinens im Methodenteil aufgelistet.

PBS-Puffer	150 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	1,4 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	4,3 mM	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		pH 7,4
Paraformaldehydlösung	4 %	Paraformaldehyd
		in PBS
		pH 7,4
SDS-Probenpuffer	62,5 mM	Tris-HCl
	4 %	SDS
	10 %	Glycerin
		pH 6,8
Trenngelpuffer	18,18 g	Tris
	0,4 g	SDS
	ad 100 ml	pH 8,8
Trenngel	12 %	Acrylamid
	0,1 %	SDS
	in	Trenngelpuffer
	0,05 %	APS
	0,1 %	TEMED

---

Sammelgelpuffer	6,06 g	Tris
	0,4 g	SDS
	ad 100 ml	
		pH 7,0
Sammelgel	3 %	Acrylamid
	0,1 %	SDS
	in	Sammelgelpuffer
	0,05 %	APS
	0,1 %	TEMED
Laufpuffer (10x)	30,28 g	Tris
	10 g	SDS
	144 g	Glycin
	ad 1000 ml	Aqua dest.
Ponceaulösung	0,2 %	Ponceau S
	3 %	Essigsäure
Blockierlösung für Western Blot	5 %	Milchpulver (fettfrei)
	0,3 %	Triton
	0,05 %	Tween 20
		In PBS
TBS-Puffer	150 mM	NaCl
	50 mM	Tris
	2,7 mM	KCl
		pH 7,4
TTBS	10 g	Tween 20
	ad 1000 ml	TBS

---

Lösung D	4 M	Guanidin-Isothiocyanat
	25 mM	NaCitrat
	0,5 %	Na-Lauroylsarcosin
	0,1 M	$\beta$ -Meracpto-Ethanol
Elektrophoresepuffer	500 mM	NaAcetat
	50 mM	EDTA
	2 M	Tris pH 7,8
DNA Probenpuffer	25 %	Saccharose
	1 %	SDS
	0,1 %	Bromphenolblau
	0,1 %	Xylencyanol
RNA Probenpuffer	2 ml	Glycerin (50 %)
	1 mM	EDTA (pH 8,0)
	0,25 %	Bromphenolblau
	0,25 %	Xylencyanol
SOC-Medium	20 g	Bacto-Trypton
	5 g	Yeast-Extract
	0,5 g	NaCl
	83 $\mu$ l	KCl-Lösung (3M)
	ad 1000 ml	Aqua dest. pH 7,0 Autoklavieren
	5 ml	MgCl <sub>2</sub> -Lösung (2 M)
	0,02 M	Sterilfiltrierte Glucose

LB-Medium	1 %	Bacto-Trypton
	0,5 %	Yeast-Extract
	0,5 %	NaCl
		Aqua dest.
		Autoklavieren
	100 µg/ml	Ampicillin
20x SSC Pufferlösung	3 M	NaCl
	0,3 M	NaCitrat
		pH 7,8
Dig-I Puffer	2 %	BSA
	0,1 %	Tween
Blocking-Lösung	10 %	Blockinglösung (Roche)
		In Dig-I Puffer
		In der Mikrowelle aufkochen
Proteinase-K Lösung	0,2 M	Tris
	0,02 M	CaCl <sub>2</sub>
		In DEPC-H <sub>2</sub> O
		pH 7,5
	20 µg/ml	Proteinase K
Triethanolamin-Lösung	0,1 M	Triethanolamin
		In DEPC-H <sub>2</sub> O
		pH 8,0
Hybridisierungspuffer	5 ml	Formamid
	2,5 ml	20x SSC
	2,5 ml	DEPC-H <sub>2</sub> O
	40 µl	Heringssperma-DNA (40 µg/ml)

RNase-Puffer	0,5 M	NaCl
	10 mM	Tris
	5 mM	EDTA
		pH 8,0
Citratpuffer pH 6	41 ml	NaCitrat-Lösung (0,1 M)
	9 ml	Zitronensäure-Lösung (0,1 M)
	ad 500ml	Aqua dest.
AEC-Lösung	0,8 mg/ml	AEC
	0,03%	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
		In Acetatpuffer (0,05 M)
		pH 5,0

### 2.5.2. Chemikalien und Reagenzien

Sämtliche Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in bestmöglicher Qualität von den Herstellern Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Irvine, UK) bezogen. Die weiteren Reagenzien sind (sofern nicht im Text angegeben) nachfolgend in der Reihenfolge ihres Erscheinens im Methodenteil aufgelistet.

<b>Chemikalien /Reagenzien</b>	<b>Bezugsquelle</b>
BCA-Assay	Pierce, Rockford, IL USA
Acrylamid	Applichem, Darmstadt
Protein-Molekulargewichtstandard	Broadrange, Biorad, München
Enhanced Chemolumineszenz-Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
M-MLV-Reverse Transkriptase	Abgene, UK
β-Mercapto-Ethanol	Applichem, Darmstadt
Random Hexamer Primer	Roche Diagnostics, Mannheim
dNTP	Invitrogen, Karlsruhe
Ribolock RNase-Inhibitor	Fermentas, Leon-Rot
Agarose GTQ	Roth, Karlsruhe

Perfectprep Gel Cleanup Kit	Eppendorf, Hamburg
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Chemisch kompetente E.coli Bakterien	TOP 10 One Shot Cells, Invitrogen, Karlsruhe
SP6 RNA-Polymerase	Fermentas, Leon-Rot
T7 RNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
NOT1 Restriktionsenzym	New England Biolabs, Ipswich, MA
KPN1 Restriktionsenzym	New England Biolabs, Ipswich, MA
PlasmidMini Kit	Qiagen, Hilden
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Applichem, Darmstadt
Proteinase K	Roche, Mannheim
Triethanolamin	Applichem, Darmstadt
Dig Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Blocking Reagenz	Roche Diagnostics, Mannheim
RNA Größenmarker	Invitrogen, Karlsruhe
QIAmp-DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
Platinum Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
pBR322 DNA Marker	Fermentas, Leon
Gene Ruler DNA Ladder Mix	Fermentas, Leon
PCR-Puffer	Roche Diagnostics, Mannheim

### 2.5.3. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Plastik- und Verbrauchsmaterialien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Sarstedt (Nürnbrecht) oder Greiner (Frickenhausen) bezogen. Im Folgenden sind weitere verwendete Geräte und Materialien mit dem jeweiligen Hersteller in der Reihenfolge des Erscheinens im Methodenteil aufgelistet.

---

<b>Gerät / Material</b>	<b>Hersteller</b>
Schlittenmikrotom	Leica RM 2135 Microtome
Einmal-Stahlklingen	Feather Microtome blade R35
Objektträger	Superfrost Plus, Menzel
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Potter-Homogenisator	B.Braun, Melsungen
ELISA-Reader	Digiscan, Asys Hitech, Österreich
PCR-Maschine	Biometra Thermocycler, Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammern	Biorad, München
Stromgeber	Bio Rad Power Pac 300
Polyvinyliden-Difluorid (PVDF)-Membran	Millipore, Schwalbach
Biomax X-Ray Filme	Kodak, Cedex, Frankreich
Kühlzentrifuge	Fresco 21, Heraeus, Hanau
Spektralphotometer	V-530 UV/VIS Spectrophotometer, Jasco, Großumstadt
UV-Tisch	UV-Transilluminator, Biotec Fischer, Reiskirchen
UV-Kamera	Polaroid, Dreieich-Sprendlingen
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg
Schüttelinkubator	GFL 3033, Hilab
Standzentrifuge	Rotanta, Hettich, Tuttlingen
Thermomixer	Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg
Biodyne Nylonmembran	Biodyne 0,45 µm, Pall Corporation
Filterpapier 3MM	Whatman, Dassel
Durchlicht-Mikroskop	DMRB, Leica, Wetzlar
Kamera	DFC 480, Leica, Wetzlar
Konfokales Laserscanning-Mikroskop	LSM-510 Meta, Zeiss, Oberkochen

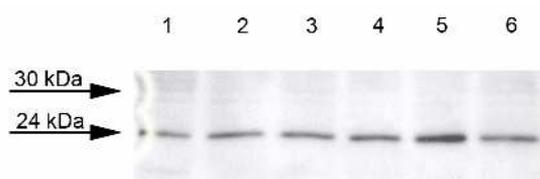


## 3 Ergebnisse

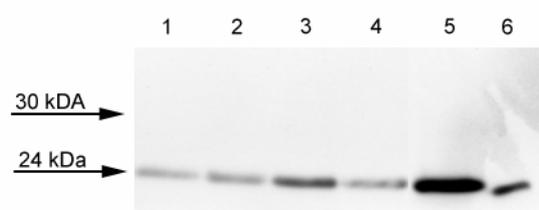
### 3.1 Lokalisation von IL-18 in der gesunden menschlichen Niere

#### 3.1.1 Nachweis von IL-18 Protein mit Western Blot

Mittels Western Blot wurde geprüft, ob in gesundem menschlichem Nierengewebe IL-18 Protein nachzuweisen ist. Dazu wurde aus gesundem Gewebe von vier verschiedenen Tumornephrektomien Proteinlysate gewonnen. Da ein Vorliegen von IL-18 in Transplantatnieren mit Abstoßungsreaktionen in der Literatur bereits



**Abbildung 3.1.1:** Western Blot auf IL-18 mit einem polyklonalen IL-18 Antikörper (R&D Biosystems). IL-18 ist in gesunder menschlicher Niere (1-4) im Western Blot zu detektieren. In Nierengewebe einer explantierten Transplantatniere, die einer starken Abstoßungsreaktion unterlegen war, ist ebenfalls IL-18 Protein nachweisbar (5). Die Positivkontrolle zeigt IL-18 aus Dünndarmgewebe (6).



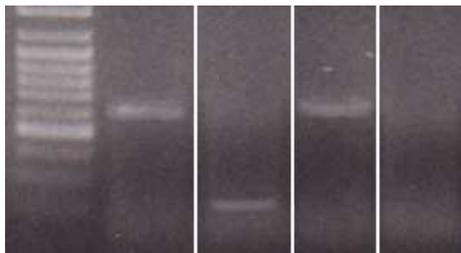
**Abbildung 3.1.2:** Auch der monoklonale Antikörper gegen IL-18 (Immunotools) detektiert das 24 kDa große IL-18. 1-4: gesunde menschliche Niere, 5: explantierte Transplantatniere, die einer starken Abstoßungsreaktion unterlegen war, 6: Dünndarmgewebe als Positivkontrolle

beschrieben wurde [Striz, I. et al. 2005], wurde aus dem Gewebe einer aufgrund einer nicht kontrollierbaren Abstoßungsreaktion explantierten Transplantatniere ebenfalls Proteinlysate gewonnen und dieses als Positivkontrolle verwendet. Nach Vermessen des Proteingehaltes wurden jeweils 40 µg Protein auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Da bekannt ist, dass Epithelzellen des Dünndarmes IL-18 exprimieren [Boraschi, D. et al. 2006], wurde als weitere Positivkontrolle 40 µg Protein aus Dünndarmlysaten aufgetragen. Das Proteinlysate

aus dem menschlichen Dünndarm wurde freundlicherweise von PD Dr. Heiko Mühl aus dem Pharmazentrum der J.W.Goethe-Universität Frankfurt zur Verfügung gestellt. Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE und Durchführung des Western Blot konnte in allen Proben eine 24 kDa große Bande detektiert werden (Abbildung 3.1.1). Das 24 kDa Protein entspricht dem inaktiven IL-18. Diese Ergebnisse zeigen, dass in gesundem menschlichem Nierengewebe IL-18 Protein vorliegt. Das Ergebnis wurde mit 2 verschiedenen Antikörpern gegen IL-18 erhalten. Dies waren der polyklonale Antikörper der Firma R&D Biosystems (Abbildung 3.1.1) und der monoklonale Antikörper der Firma Immunotools (Abbildung 3.1.2).

### 3.1.2 Nachweis der mRNA Expression von IL-18, P<sub>2X7</sub> und Caspase-1 in der gesunden Niere mittels RT-PCR

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob IL-18 mRNA in gesundem menschlichem Nierengewebe nachzuweisen ist. Außerdem sollte geklärt werden ob Komponenten, die für die Aktivierung des IL-18 notwendig sind, ebenfalls in diesem Gewebe exprimiert werden. Dies sollte einen Hinweis geben, ob die Bildung von aktivem IL-18 in diesem Gewebe möglich ist. Da der von



**Abbildung 3.1.2.1:** Marker (Gene Ruler); IL-18 (598 bp); Caspase-1 (202 bp); P<sub>2X7</sub> (604 bp), Negativkontrolle

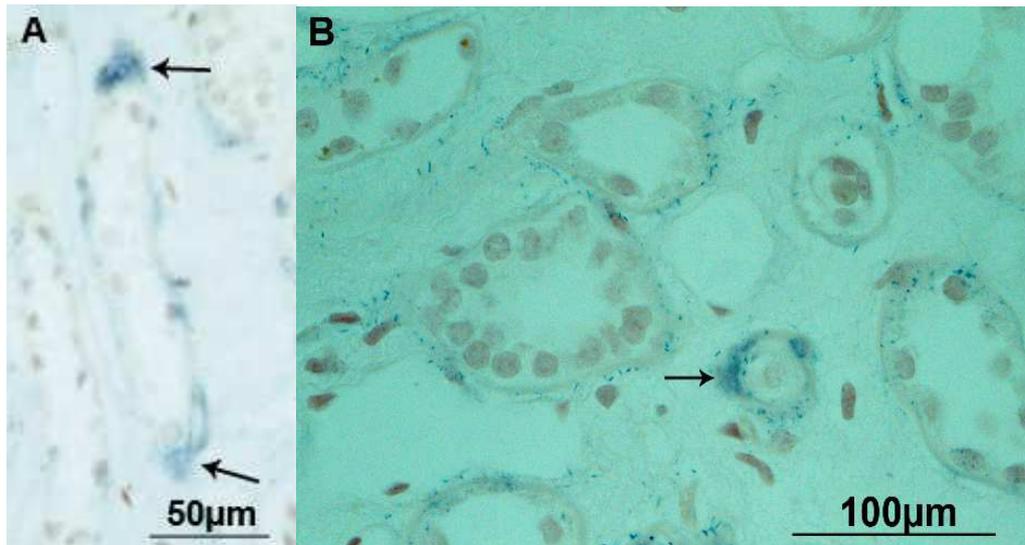
extrazellulärem ATP abhängige purinerge Rezeptor P<sub>2X7</sub> und die intrazelluläre Caspase-1 zur Aktivierung von IL-18 erforderlich sind, sollte ein Vorliegen von mRNA dieser beiden Komponenten überprüft werden. Dazu wurde

aus gesunden Teilen von Tumornephrektomien RNA isoliert. In gesundem humanem Nierengewebe konnten mit den entsprechenden spezifischen Primerpaaren PCR Produkte der erwarteten Größe amplifiziert werden. Dadurch wurde der Hinweis erhalten, dass mRNA von IL-18, Caspase-1 und P<sub>2X7</sub> in diesem Gewebe exprimiert wird (Abb. 3.1.2.1). Bei der Negativkontrolle wurde kein Enzym zur Reverse Transkriptase Reaktion hinzugegeben. Zur Bestätigung wurden die PCR-Produkte aus dem Gel

ausgeschnitten, isoliert und anschließend zum Sequenzieren an die Firma GATC (Konstanz) geschickt. Die amplifizierten Produkte entsprachen zu 100% den publizierten Sequenzen. Zusammen mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.1.5.4, in dem der Nachweis der jeweiligen Proteine durch Immunhistochemische Färbungen beschrieben ist, weist der Nachweis der mRNA-Expression von IL-18, Caspase-1 und P<sub>2X7</sub> darauf hin, dass diese Proteine in der Niere exprimiert werden. Das gleichzeitige Vorhandensein der für die Aktivierung von IL-18 notwendigen Komponenten Caspase-1 und P<sub>2X7</sub> lässt darauf schließen, dass IL-18 in der Niere eine lokale Funktion haben kann.

### 3.1.3 Nachweis der IL-18 Expression mit *in situ*-Hybridisierung

Da die im Nierengewebe nachgewiesene mRNA auch von infiltrierenden Leukozyten stammen könnte, sollte durch *in situ*-Hybridisierung überprüft werden, ob die aus den RT-PCR Ergebnissen abgeleitete Vermutung, dass Zellen des Nierengewebes zur Bildung von IL-18 befähigt sind, richtig ist. Mittels *in situ*-Hybridisierung kann nachgeprüft werden, ob bestimmte Abschnitte im gesundem menschlichem Nierengewebe zur IL-18 mRNA Expression befähigt sind. Die *in situ*-Hybridisierung wurde an gesundem Nierengewebe durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass vereinzelte Zellen durch die T3-Antisense Sonde deutlich und spezifisch gefärbt waren (Abbildung 3.1.3.1). Diese Färbungen grenzten sich zum Teil scharf zu den benachbarten Zellen ab. Die gefärbten Zelltypen konnten morphologisch in Zellen von Abschnitten des Tubulus- und Sammelrohrsystems eingeordnet werden. Die mit der T7-Sense Sonde als Negativkontrolle behandelten Schnitte zeigten keine Färbungen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass tatsächlich Zellen des Tubulussystems der humanen Niere IL-18 mRNA bilden.



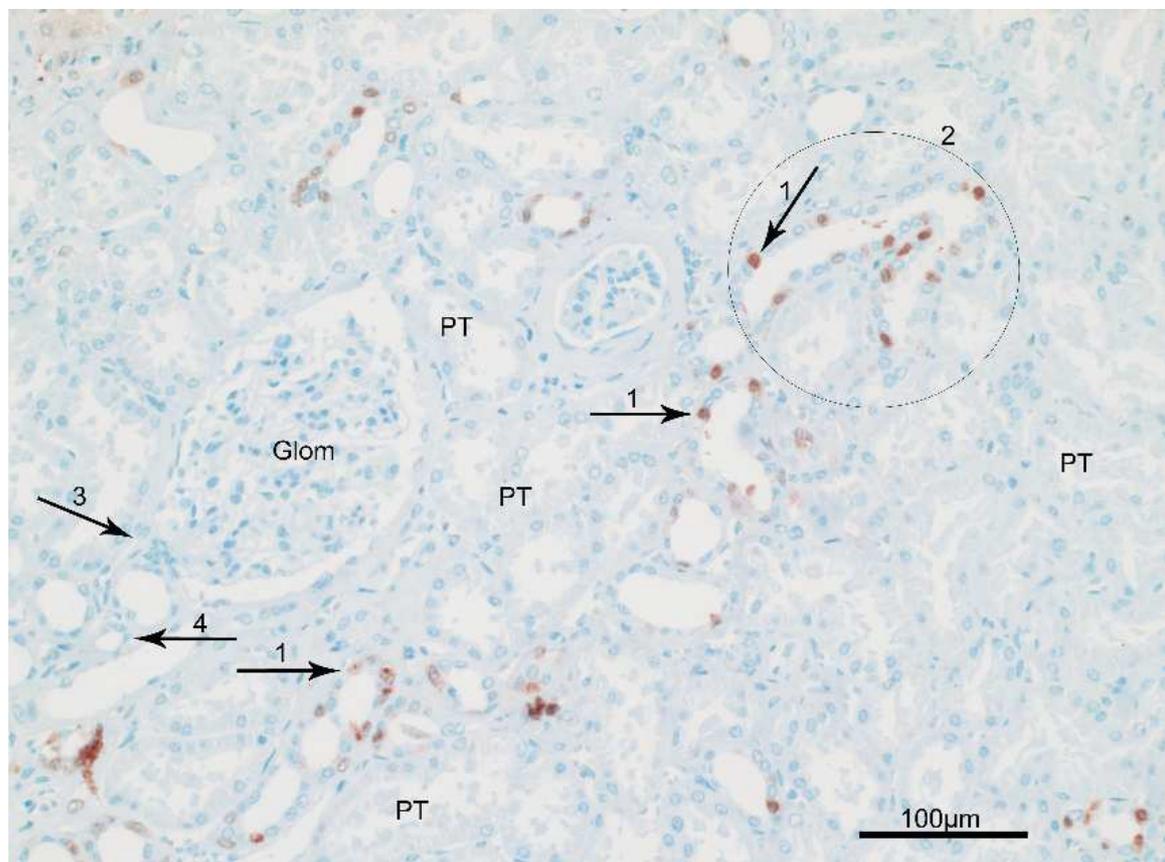
**Abbildung 3.1.3.1:** *In situ*-Hybridisierung an gesundem Nierengewebe. IL-18 mRNA ist in einzelnen Sammelrohrzellen der Nierenrinde (A) und des Nierenmarkes (B) detektierbar (Pfeile).

### 3.1.4 Lokalisation des IL-18 in der menschlichen Niere mit Peroxidase-Färbungen

Um Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion von IL-18 in der Niere ziehen zu können, wurde im Folgenden untersucht in welchen Zellstrukturen der gesunden menschlichen Niere IL-18 Protein nachzuweisen ist. Dazu wurden Peroxidase-Färbungen an gesundem Nierengewebe durchgeführt. Es wurden Gewebeschnitte aller Regionen der Niere (Nierenrinde, Markstrahl, äußerer und innerer Markstreifen, Markinnenzone) systematisch ausgewertet. Dabei ließ sich feststellen, dass die Färbung zum einen auf das Zytoplasma einzeln abgrenzbarer Zellen beschränkt war. Zum anderen waren die Färbungen auf distinkte Regionen der Niere begrenzt. Durch genauere morphologische Begutachtung der gefärbten Schnitte ließen sich die Bereiche der Nieren definieren, in denen IL-18 nachweisbar war. In der Nierenrinde (Abbildung 3.1.4.1) waren bestimmte Zellen des distalen Tubulus, des Verbindungstubulus sowie des Sammelrohres gefärbt. In Markstrahlen (3.1.4.2) und in der Außenzone des Nierenmarkes (3.1.4.3) waren ebenfalls distinkte Zellen der Sammelrohrabschnitte gefärbt. Die Anzahl der gefärbten Sammelrohrabschnitte nahm vom Außenstreifen des Marks in Richtung Innenstreifen etwas zu (3.1.4.4). Die Anzahl positiver Zellen in den Sammelrohren

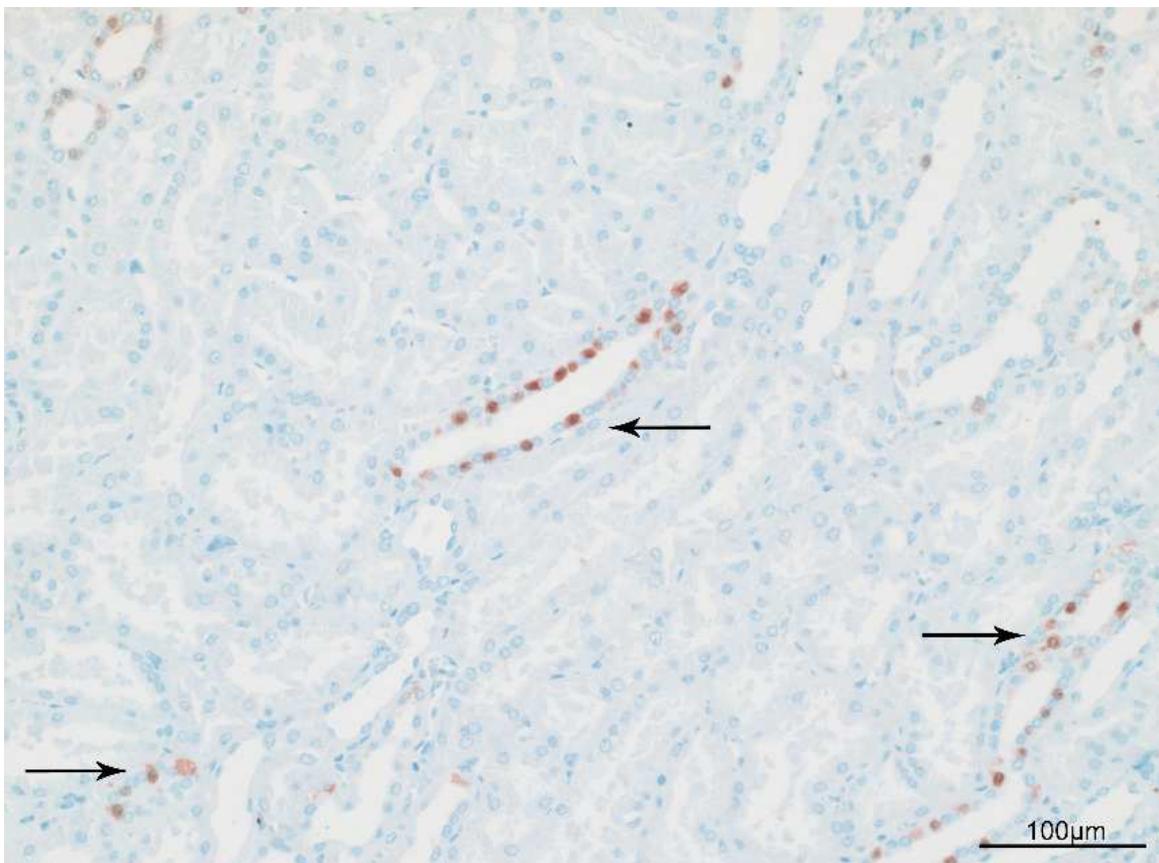
nahm dagegen in der Mark-Innenzone in Richtung Papille wieder ab. Im innersten Bereich der Innenzone waren nur vereinzelte Sammelrohrabschnitte IL-18 positiv gefärbt (3.1.4.5). Die große Anzahl an IL-18 positiven Zellen im Übergangsbereich von Außenstreifen zu Innenstreifen war auffällig. In diesem Bereich liegen intermediäre Tubuli sowie dicke aufsteigende Äste der Henle'schen Schleifen (TAL) und Sammelrohrabschnitte vor, hinweisend, dass IL-18 verstärkt in einem dieser Abschnitte exprimiert wird.

Es waren keine weiteren Zellstrukturen des Nephrons IL-18 positiv gefärbt, d.h. Blutgefäße, Glomeruli, und proximale Tubuli waren IL-18 negativ.

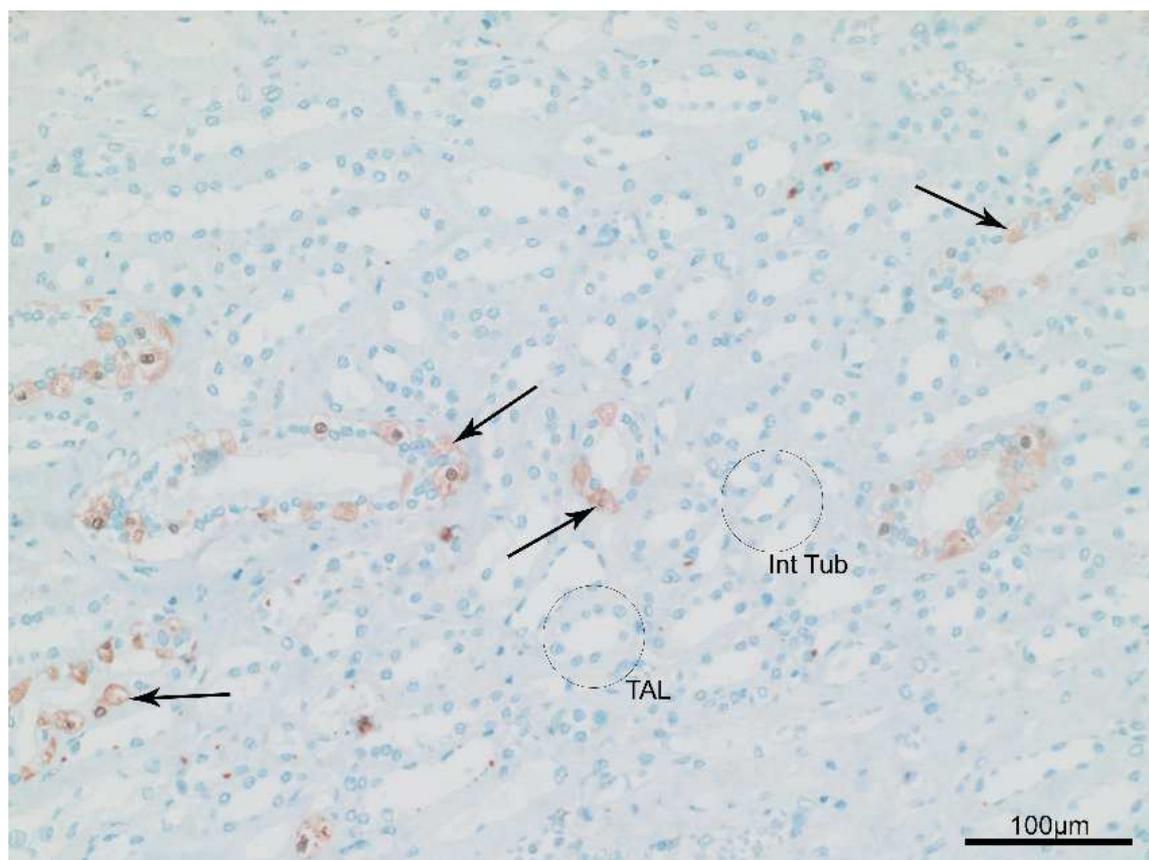


**Abbildung 3.1.4.1:** Übersicht über einen Bereich der Nierenrinde. Immunhistochemische Färbung mit einem monoklonalen IL-18 Antikörper (rot). Dieser Bereich ist durch die Anwesenheit von Glomeruli (Glom) zu identifizieren. Es liegen Proximale Tubuli (PT) und distale Tubuluszellen sowie Sammelrohrabschnitte vor. Es sind exemplarisch einige proximale Tubuli markiert (PT). PT sind an der unscharfen Abgrenzung in Richtung Lumen aufgrund ihres Bürstensaumes zu erkennen. Die Epithelzellen der PT's sind höher, der Durchmesser von PT's ist größer im Vergleich zu distal tubulären und Sammelrohrabschnitten (50-60 µm gegenüber 25-45 µm). Sammelrohrzellen haben im Bereich der Nierenrinde eine kubische Zellstruktur, die den Zellen des distalen Tubulus und

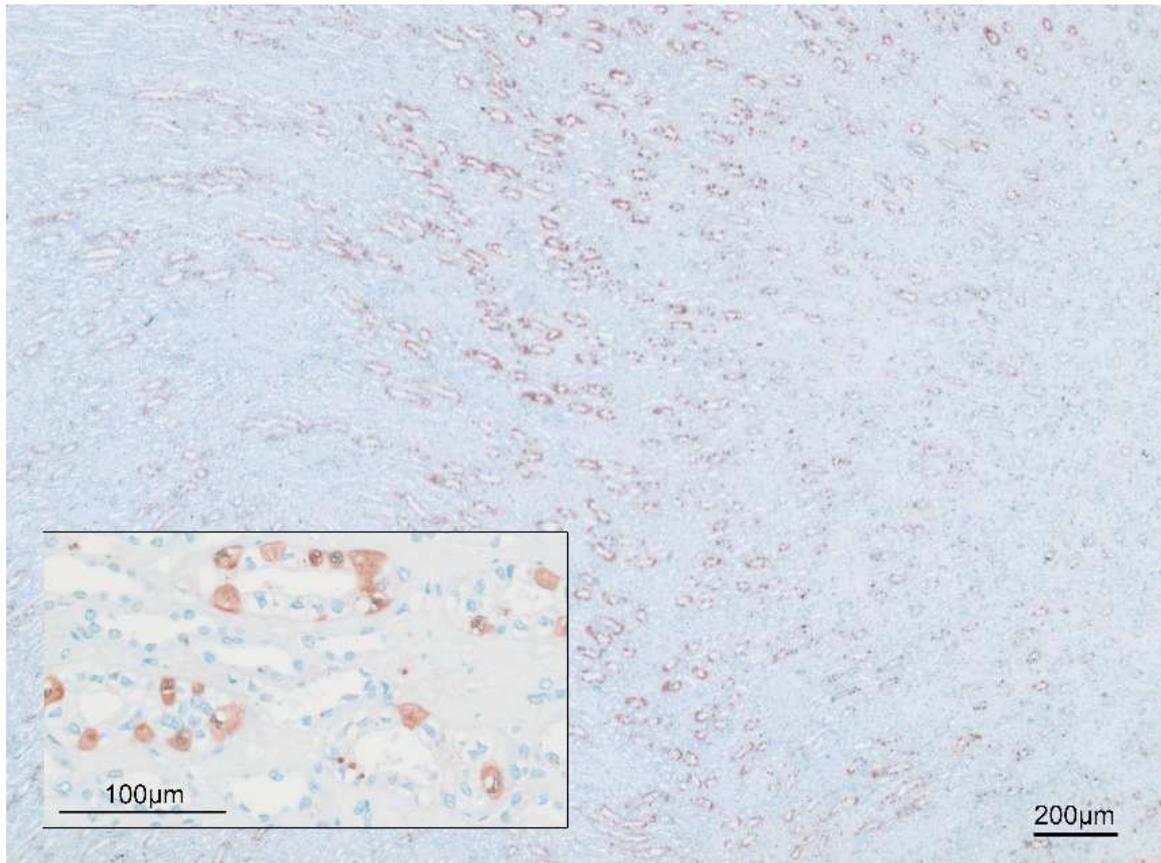
Verbindungstubulus ähnelt. Eine morphologische Unterscheidung dieser verschiedenen Abschnitte ist hier schwierig. Der Übergang des Verbindungstubulus in das Sammelrohr ist durch die typische Arkadenbildung gut zu erkennen (kreisförmige Markierung 2). Die roten Signale in den Zellen zeigen eine IL-18 Färbung an. Die Färbung ist ausschließlich auf das Zytoplasma einzelner Zellen beschränkt. Diese Zellen befinden sich in Abschnitten des distalen Tubulus (DCT/CNT) bzw. des Sammelrohres (1). Im Glomerulum und proximalem Tubulus ist keine Färbung zu erkennen. Der Gefäßpol eines Glomerulum (3) und eine Blutkapillare (4) sind IL-18 negativ.



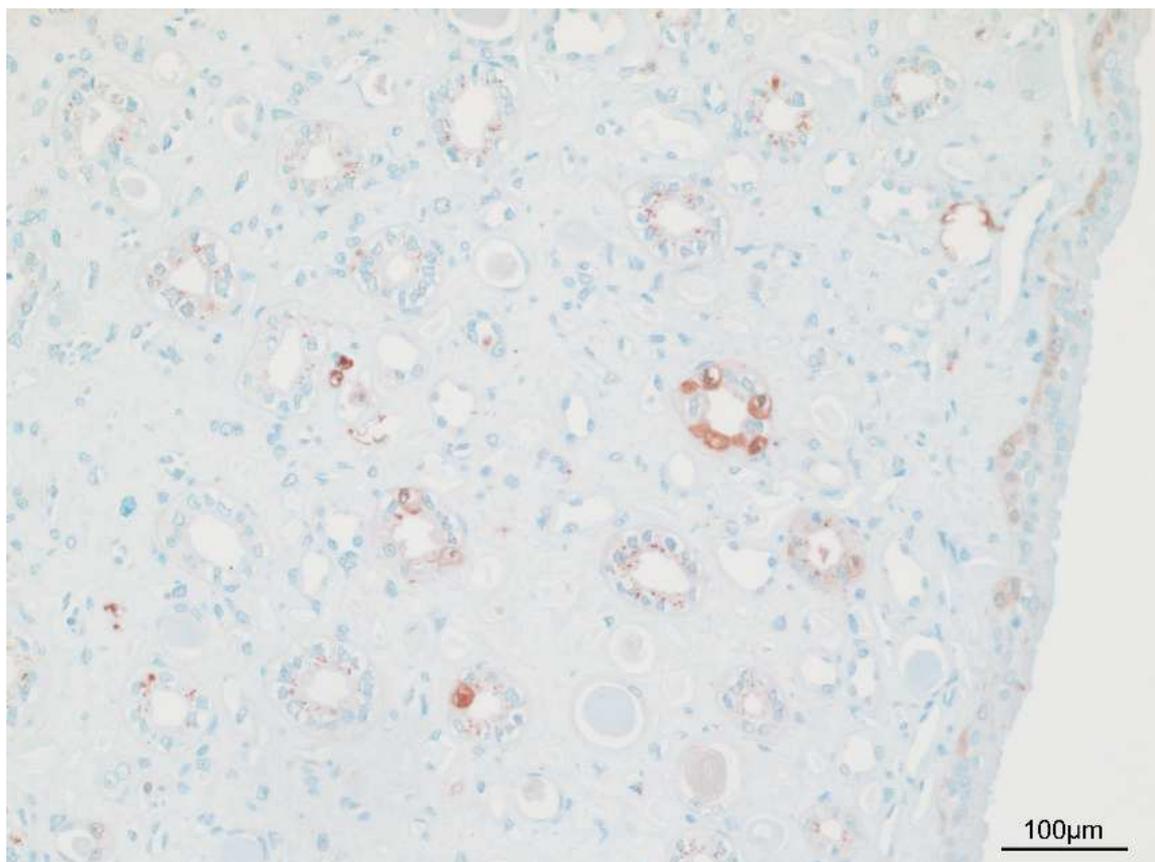
**Abbildung 3.1.4.2:** Ausschnitt aus einem Markstrahl in der Nierenrinde. Immunhistochemische Färbung mit einem monoklonalen IL-18 Antikörper (rot). Die Zuordnung zu diesem Bereich der Niere ergibt sich aus dem gleichzeitigen Vorliegen von proximalen Tubuli (pars recta) und geraden dicken aufsteigenden Teilen der Henle'schen Schleife (TAL) sowie Sammelrohren. In dieser Aufnahme sind keine Glomeruli zu sehen, deshalb kann es sich nur um Bereiche des Nierenmarkes oder des Markstrahles handeln. PT's liegen nur im Bereich der Nierenrinde und im äußeren Streifen der Außenzone des Nierenmarkes vor. Das Vorliegen von stark gewundenen Tubuli (Pars convolutae) deutet darauf hin, dass es sich bei dieser Aufnahme um einen Ausschnitt aus dem Bereich der Nierenrinde handelt, da sich im Mark nur gestreckte Tubuli befinden. Die Pfeile markieren IL-18 Färbungen in distalen Tubuli / Sammelrohrabschnitten.



**Abbildung 3.1.4.3:** Innenstreifen der Außenzone des Nierenmarkes. Immunhistochemische Färbung mit einem monoklonalen IL-18 Antikörper (rot). Dieser Bereich ist durch die Präsenz von vielen TAL's und Sammelrohren charakterisiert. Die Zellen der Sammelrohre weisen von Nierenrinde in Richtung Papille eine Zunahme der Zellhöhe auf, die Zellform ändert sich von kubisch (Nierenmark) in Richtung hochprismatisch (inneres Mark) Die enge Besiedelung mit Nierenkanälchen und die Form der Epithelzellen von Sammelrohrabschnitten spricht für die Lokalisation dieses Abschnittes im Innenstreifen (vgl. Abbildung 3.1.4.5). Deutlich zu erkennen sind die intermediären Tubuli (dünne Henle'schen Schleifen) durch das platte Tubulusepithel und durch die linsenförmigen Vorwölbungen, die durch die dunklen Zellkerne verursacht sind (beispielhaft mit „Int Tub“ kreisförmig markiert). Ein TAL-Profil ist exemplarisch mit „TAL“ kreisförmig markiert. IL-18 positive Färbungen in Sammelrohr entsprechenden Profilen sind durch Pfeile markiert.



**Abbildung 3.1.4.4:** Übersicht des Überganges der Markaußenzone zu Markinnenzone mit einer Detailaufnahme aus dem Übergangsbereich. Immunhistochemische Färbung mit einem monoklonalen IL-18 Antikörper (rot). Auf der linken Seite der Übersicht befindet sich die Außenzone mit TAL's (dicke aufsteigende Henle'sche Schleife), dünnen Henle'schen Schleifen und Sammelrohrabschnitten. Auf der rechten Hälfte der Aufnahme befinden sich intermediäre Tubuli und Sammelrohrabschnitte. Die Höhe der Epithelzellen von Sammelrohrabschnitten nimmt im Verlauf von Außenzone in Richtung Papille zu. Einzelne Zellen in Sammelrohrabschnitten sind IL-18 positiv gefärbt, wobei am Übergangsbereich relativ viele Zellen IL-18 positiv gefärbt sind und mehr Zellen IL-18 positiv sind als in der Außenzone. Die Anzahl an IL-18 positiv gefärbten Zellen nimmt in Richtung Papille deutlich ab.



**Abbildung 3.1.4.5:** Ein Ausschnitt des inneren Marks (Papillarepithel) mit dem das Mark in Richtung Nierenbecken abgrenzenden Papillarepithel. Immunhistochemische Färbung mit einem monoklonalen IL-18 Antikörper (rot). Für diesen Bereich des Nierenmarkes typisch sind die prismaförmige Form der Epithelzellen von Sammelrohrabschnitten. Zellen von wenigen, vereinzelt Sammelrohrabschnitten sind IL-18 positiv gefärbt.

### **3.1.5 Zuordnung der Lokalisation von IL-18 zu spezifischen Tubulusabschnitten mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen**

Mit Hilfe von Doppelfärbungen wurde die genaue Lokalisation des IL-18 entlang des Tubulussystems bestimmt und die Zelltypen identifiziert, die IL-18 in gesundem menschlichem Nierengewebe enthalten. Bei diesen Doppelfärbungen wurden gesunde Nierengewebeschnitte gleichzeitig mit Maus-Antikörpern gegen humanes IL-18 und mit Kaninchen-Antikörpern gegen unterschiedliche humane Proteine, deren Lokalisation im menschlichen Nierengewebe bekannt ist, doppelgefärbt. Da die zuvor erhaltenen Ergebnisse eine Lokalisation des IL-18 in

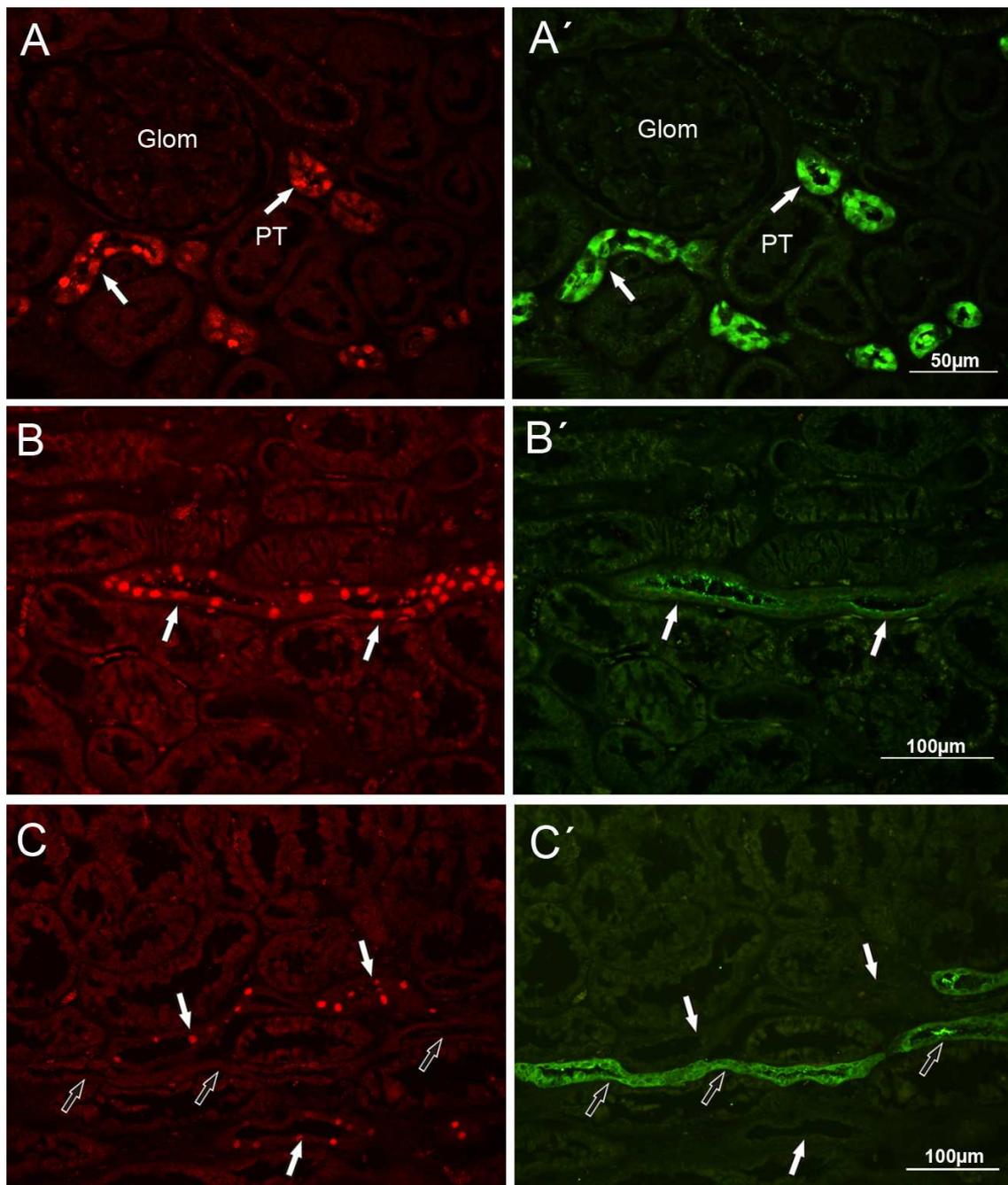
Bereichen des distalen Tubulus und des Sammelrohrsystems beschreiben, wurden Proteine ausgewählt, die für verschiedene Zelltypen dieser Tubulusabschnitte spezifisch sind. Als Marker für das distale Konvolut, den Verbindungstubulus und den proximalen Teil des Sammelrohres diente Calbindin-D28k (CaBP). Als Marker für die Hauptzellen des Sammelrohres diente Aquaporin-2 (AQP2). Die V-H<sup>+</sup>ATPase diente als Marker für die Schaltzellen, als Marker für den dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife und den frühen distalen Tubulus diente Tamm-Horsfall Protein (THP). Die Gewebeschnitte wurden dann mit unterschiedlichen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern gegen die verschiedenen Spezies behandelt, sodass die Proteine bei entsprechenden Anregungswellenlängen rot (IL-18) oder grün (CaBP, AQP2, V-H<sup>+</sup>ATPase, THF) erschienen. Durch Auswertung, ob die farbigen Signale sich überlagerten, in benachbarten Zellen erschienen, oder in getrennten Bereichen vorlagen, konnten Rückschlüsse auf die Region des Nierengewebes und den spezifischen Zelltyp gezogen werden, in dem IL-18 vorlag.

#### **3.1.5.1 IL-18 wird in Bereichen des distalen Konvolutes, des Verbindungstubulus und im Sammelrohr exprimiert**

IL-18 konnte in Tubulusabschnitten nachgewiesen werden, die CaBP positiv waren und lag teilweise in den gleichen Abschnitten wie AQP2 vor. Es war jedoch nicht in den Segmenten zu detektieren, in denen eine THP-positive Färbung vorlag (Abbildung 3.1.5.1). Diese Verteilung zeigt, dass distales Konvolut, Verbindungstubulus und Sammelrohr IL-18 positiv sind, nicht jedoch der dicke aufsteigende Ast der Henle'schen Schleife. Jedoch waren nicht alle Abschnitte, die positiv für AQP2 waren auch positiv für IL-18. Diese Beobachtung wies darauf hin, dass IL-18 nicht über den ganzen Bereich der AQP2-positiven Tubulusabschnitte vorliegt. Deshalb wurde eine semiquantitative Auswertung durchgeführt. An 96 Nierengewebeschnitten wurden wenigstens 1235 tubuläre Querschnitte pro Zellmarker CaBP, AQP2 oder THP doppelgefärbt mit IL-18 ausgezählt und auf gemeinsames Färbesignal ausgewertet. Das Ergebnis zeigte, dass 96% ± 4% der IL-18 positiven Tubulusquerschnitte ebenfalls CaBP positiv gefärbt waren, 76% ± 22% der AQP2 positiven Querschnitte waren ebenfalls IL-18

positiv. IL-18 und THP lagen in getrennten Bereichen vor und zeigten keine Überlappung.

Die Doppelfärbungen zeigten, dass IL-18 zwar in den gleichen Tubulusquerschnitten wie CaBP und AQP2 lokalisiert ist, dass IL-18 jedoch in genau den Zellen vorzuliegen scheint, in denen sich diese Proteine nicht anfärben. Sowohl bei den Doppelfärbungen mit CaBP, als auch bei den Doppelfärbungen mit AQP2 war keine Kongruenz zu beobachten, sondern es waren unterschiedliche Zellen gefärbt.



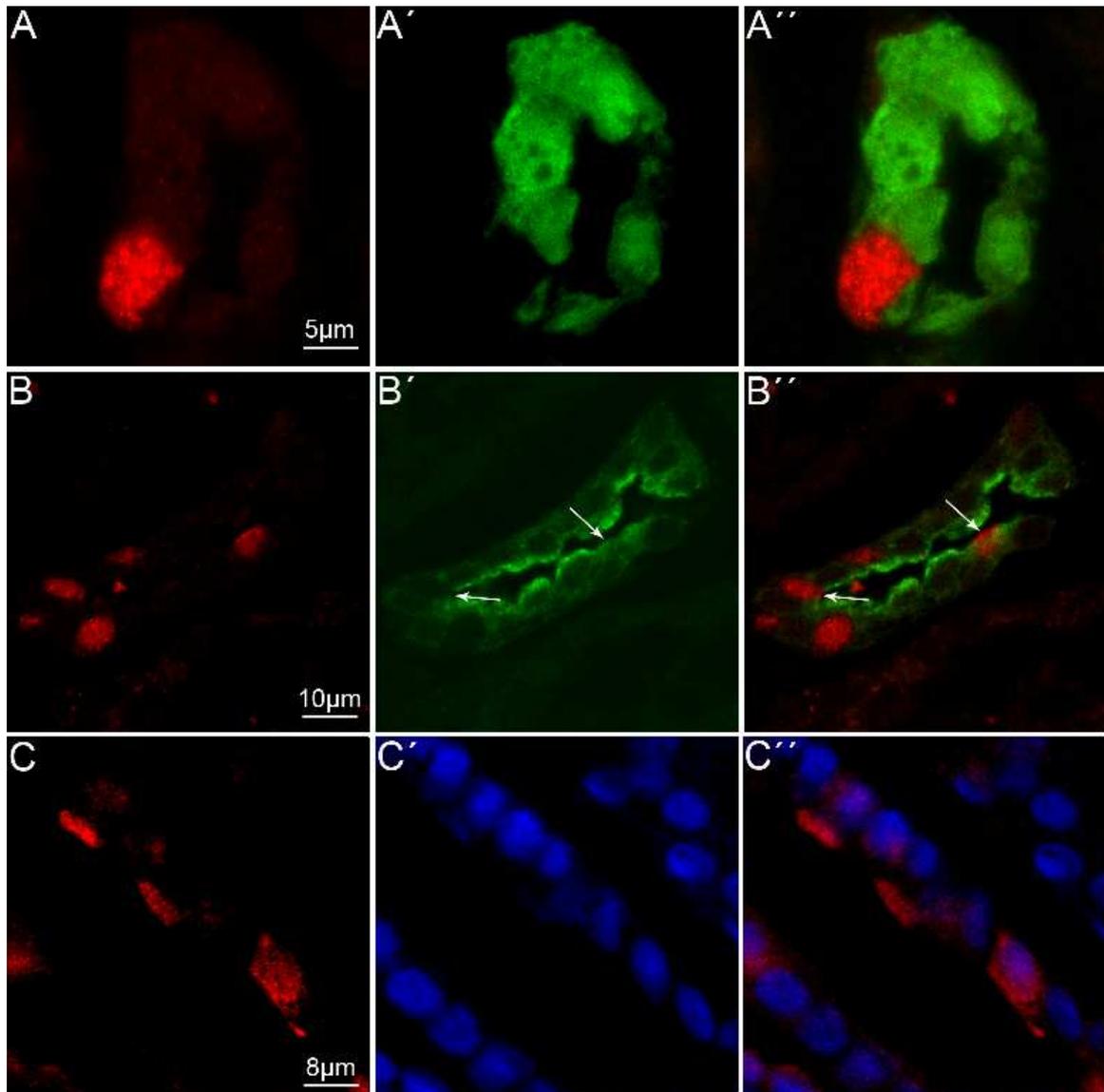
**Abbildung 3.1.5.1:** Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen von IL-18 (A,B,C, rote Fluoreszenz) zusammen mit CaBP (A'), AQP2 (B') und THP (C') jeweils in grüner Fluoreszenz. **A, A'**: IL-18 und CaBP sind in denselben Tubulusabschnitten (distales Konvolut, Verbindungstubulus und proximaler Bereich des Sammelrohr) der Nierenrinde exprimiert. Glomeruli und proximaler Tubulus weisen keine Färbung auf. **B, B'**: IL-18 ist im Markstrahl in Sammelrohrabschnitten lokalisiert, die ebenfalls AQP2 exprimieren. **C, C'**: Im Markstrahl ist keine Kolokalisation von IL-18 mit THP (schwarze Pfeile) im dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife nachzuweisen. Die IL-18 Expression (weiße Pfeile) ist auf die Sammelrohrabschnitte beschränkt.

### **3.1.5.2 IL-18 liegt im Zytoplasma von bestimmten Zellen in Abschnitten des distalen Tubulus und des Sammelrohres vor**

Um den genauen Zelltyp zu bestimmen in dem IL-18 lokalisiert ist, wurde Konfokale Laserscanning Mikroskopie an den Doppelfärbungen durchgeführt.

Die Ergebnisse der konfokalen Laserscanning Mikroskopie sind in Abbildung 3.1.5.2 dargestellt. Tubuli und Sammelrohre bestehen aus Haupt- und Schaltzellen. Das Färbesignal für IL-18 und für CaBP war in direkt benachbarten Zellen zu finden und war scharf voneinander getrennt. Es ist bekannt, dass CaBP in den Hauptzellen exprimiert ist, AQP2 liegt apikal in den Epithelzellen des Sammelrohres vor [Biner, H. L. et al. 2002]. Die Signale für AQP2 und IL-18 waren ebenfalls scharf voneinander getrennt. Schaltzellen besitzen weder CaBP noch AQP2. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass die Schaltzellen IL-18 exprimieren.

Eine nukleäre Lokalisation des IL-18, welche durch die normalen Immunfluoreszenzbilder suggeriert wird, konnte mit konfokaler Laserscanning Mikroskopie ausgeschlossen werden. IL-18 liegt, wie auch viele andere Zytokine, diffus zytoplasmatisch vor und ist nicht mit den durch TO-PRO-3 angefärbten Zellkernen kongruent (Abbildung 3.1.5.2 C').

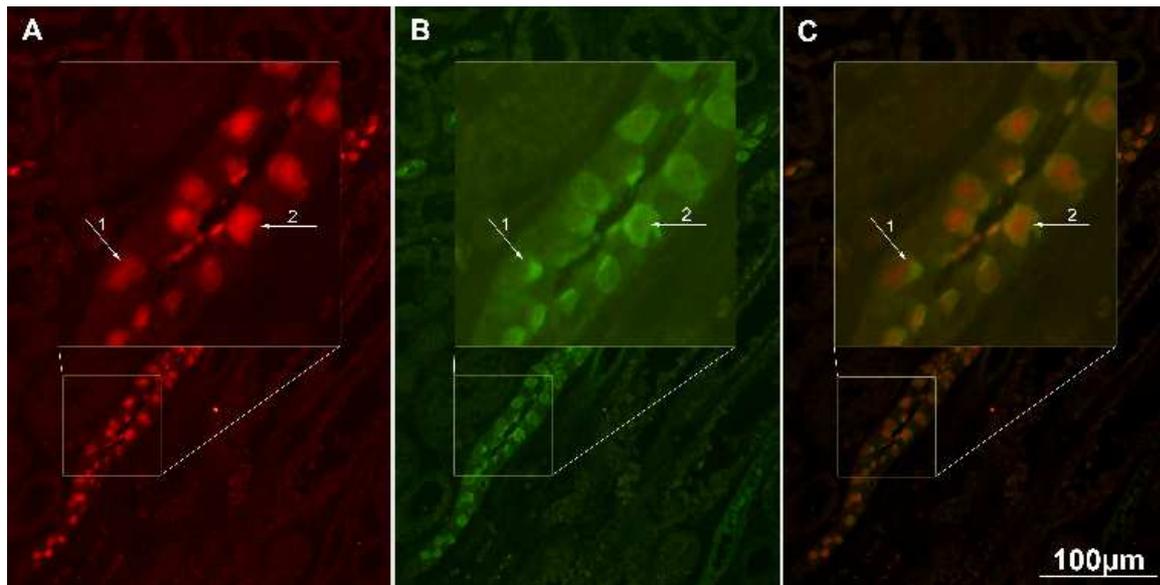


**Abbildung 3.1.5.2:** Detektion der IL-18 Expression in Schaltzellen durch Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen. Detaillierte Aufnahmen mit konfokaler Laserscanning Mikroskopie. **A, A', A''**: Doppelfärbung eines Verbindungstubulusquerschnittes. Die IL-18 positive Zelle (A) weist keine CaBP Färbung (A') auf. Die IL-18 Färbung ist auf das Zytoplasma der Schaltzelle begrenzt und nicht in den CaBP positiven segmentspezifischen Zellen nachzuweisen, die überlagerte Darstellung (A'') zeigt keine Vermischung der Farben. **B, B', B''**: Das Zytoplasma einzelner Sammelrohrzellen der Nierenrinde sind IL-18 positiv gefärbt (B'). Die Sammelrohrzellen sind durch die apikale AQP2 Färbung identifiziert (B'), welche durch eine positive IL-18 Färbung unterbrochen wird (Pfeile in B' und B''). AQP2 positive Zellen exprimieren kein IL-18, in der überlagerten Darstellung sind keine Überschneidungen der Färbemuster zu erkennen (B''). **C, C', C''**: In vereinzelter Sammelrohrzellen ist eine IL-18 Expression nachgewiesen (C, C''), die nicht in den mit TO-PRO-3 angefärbten Kernen (C') vorliegt. Die überlagerte Darstellung (C'') zeigt eine Trennung der IL-18 Färbung von der Kernfärbung.

### 3.1.5.3 IL-18 ist in Schaltzellen lokalisiert

Um die Annahme zu bestätigen, dass IL-18 in den Schaltzellen exprimiert wird, wurde die Kolo­kalisierung mit der für Schaltzellen spezifischen V-H<sup>+</sup> ATPase geprüft. Dazu wurden Doppelfärbungen mit Anti IL-18 Antikörpern und Anti V-H<sup>+</sup> ATPase Antikörpern durchgeführt. V-H<sup>+</sup> ATPase ist ein Protonentransporter, der an der Regulation des Säure-Basen-Gleichgewichtes beteiligt ist und in den Schaltzellen des distalen Konvoluts, des Verbindungstubulus und des Sammelrohres exprimiert wird. Es gibt drei verschiedene Subtypen der Schaltzellen: „A-Typ“, „B-Typ“ und „nicht-A, nicht-B-Typ“, eingeteilt nach dem subzellulären Expressionsmuster des Anionentauscherproteins AE1 und der V-H<sup>+</sup> ATPase. Nicht-A, nicht-B-Typ Schaltzellen und A-Typ-Schaltzellen exprimieren die V-H<sup>+</sup> ATPase auf der Zellmembran apikal, d.h. sie ist in Richtung Lumen der Tubuli/Sammelrohre gerichtet. Typ-B Schaltzellen exprimieren die V-H<sup>+</sup> ATPase basolateral, in Richtung Interstitium [Wall, S. M. 2005].

Die Doppelfärbungen zeigten, dass IL-18 mit V-H<sup>+</sup> ATPase kolokalisiert ist (Abbildung 3.1.5.3). IL-18 war in denselben Zellen lokalisiert wie die V-H<sup>+</sup> ATPase. Dabei spielte es keine Rolle, ob diese Zellen die V-H<sup>+</sup> ATPase apikal oder basolateral exprimierten. Dies bedeutet, dass IL-18 in Schaltzellen des B-Typ vorliegt und in mindestens einem Typ der „A-Typ“ oder „nicht-A, nicht-B-Typ“-Schaltzellen vorliegt. Da sich jedoch die Lokalisation der IL-18 Färbungen mit den V-H<sup>+</sup> ATPase Färbungen deckten und es keine quantitativ erfassbaren Mengen an V-H<sup>+</sup> ATPase positiven aber IL-18 negativen Zellen gab, ist davon auszugehen, dass IL-18 in allen 3 Subtypen der Schaltzellen vorliegt.

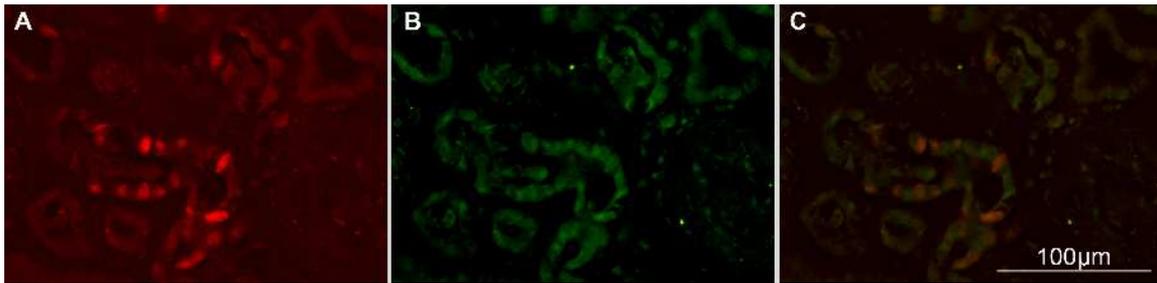


**Abbildung 3.1.5.3:** Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von IL-18 (A, C, rot) und V-H<sup>+</sup> ATPase (B, C, grün) in einem Sammelrohrabschnitt des Markstrahls. IL-18 ist in denselben Zellen wie die V-H<sup>+</sup> ATPase lokalisiert, die diese als Schaltzellen identifiziert. Die überlagerte Darstellung (C) zeigt IL-18 in Schaltzellen mit apikaler V-H<sup>+</sup> ATPase Expression (1) und in Schaltzellen mit basolateraler V-H<sup>+</sup> ATPase Expression (2). Die Kolokalisation von IL-18 und V-H<sup>+</sup> ATPase im selben Kompartiment führt zur orange erscheinenden Mischfarbe (2) in C.

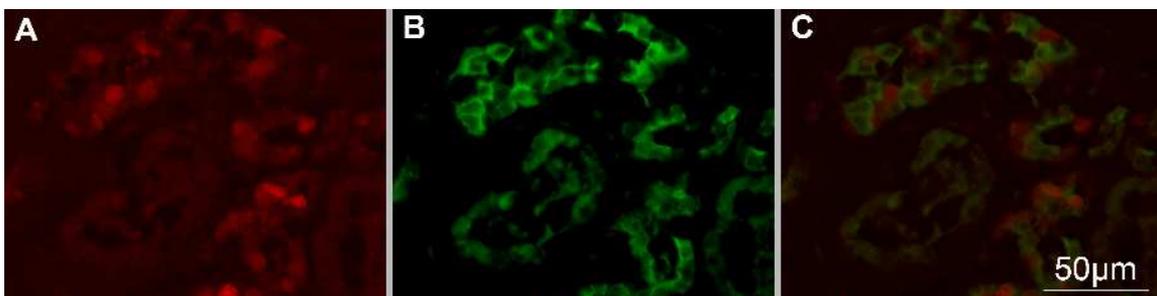
#### 3.1.5.4 IL-18 ist mit den für seine Aktivierung notwendigen Komponenten Caspase-1 und P<sub>2X7</sub> kolokalisiert

Zur Aktivierung und Freisetzung von IL-18 sind weitere Komponenten notwendig. Es sollte geprüft werden, ob der purinerge Rezeptor P<sub>2X7</sub>, der ATP-abhängig zur Initiierung einer IL-18 Aktivierung essentiell ist, und Caspase-1, welche die inaktive, 24 kDa große Vorläuferform des IL-18 schneidet und in die aktive 18 kDa große Form überführt, in denselben Bereichen wie IL-18 in der menschlichen gesunden Niere lokalisiert sind. Dazu wurden Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen auf IL-18 und P<sub>2X7</sub> bzw. Caspase-1 an gesunden menschlichen Nierengewebeschnitten durchgeführt.

Die Doppelfärbungen zeigten, dass P<sub>2X7</sub> und Caspase-1 mit IL-18 kolokalisiert vorlagen. Damit konnte gezeigt werden, dass eine Funktionalität von IL-18 in diesen Gewebeabschnitten gegeben sein kann. P<sub>2X7</sub> und Caspase-1 war auch in anderen, IL-18 negativen Gewebeabschnitten zu detektieren.



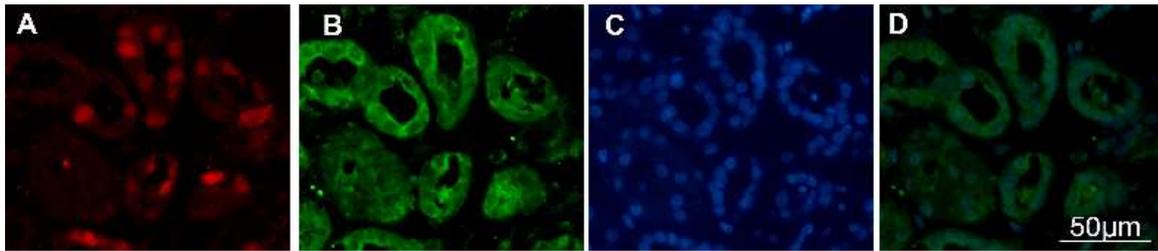
**Abbildung 3.1.5.4:** Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von IL-18 (A, C, rot) mit P<sub>2X7</sub> (B, C, grün). P<sub>2X7</sub> ist in allen IL-18 positiven Tubulusabschnitten exprimiert. Die P<sub>2X7</sub> Färbung ist nicht auf die IL-18 positiven Tubulusabschnitte beschränkt.



**Abbildung 3.1.5.5:** Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von IL18 (A, C, rot) mit Caspase-1 (B, C, grün). Die IL-18 positiven Tubuluszellen sind ebenfalls Caspase-1 positiv. Die Caspase-1 Expression ist nicht auf die IL-18 positiven Zellen beschränkt.

### 3.1.5.5 IL-18 wird konstitutiv im Nierengewebe exprimiert

Abschließend sollte überprüft werden, ob die Tubulusabschnitte von gesundem Nierenparenchym, die IL-18 exprimierten, möglicherweise akut entzündet waren. Dazu wurden Doppelfärbungen an Gewebeschnitten dieser Bereiche mit Antikörpern gegen IL-18 und gegen die aktive Untereinheit p65 des nuclear factor-κB (Nf-κB) durchgeführt. Nf-κB ist ein Transkriptionsfaktor, dessen Aktivierung am Anfang der proinflammatorischen Kaskade steht und somit ein guter Indikator für das Vorliegen entzündlicher Vorgänge ist. Die Färbungen zeigten, dass die Tubulusbereiche, die IL-18 exprimierten zwar auch positiv für Nf-κB waren, sich diese Färbung allerdings auf das Zytoplasma beschränkte (Abbildung 6). Da die Untereinheit p65 nach Aktivierung als Transkriptionsfaktor in den Zellkern wandert, konnte festgestellt werden, dass Nf-κB nicht aktiviert war und die Tubulusbereiche sich somit in keinem entzündlichen Zustand befanden.



**Abbildung 3.1.5.6:** Immufluoreszenz-Doppelfärbung von IL-18 (A, rot) mit Nf-κB (B, D, grün). IL-18 positive Tubulusabschnitte sind ebenfalls positiv für Nf-κB. Nf-κB liegt im Zytoplasma vor, der Zellkern ist ausgespart (B). Mit DAPI gefärbte Zellkerne (blau) sind in C und D zu sehen. Die Überlagerte Darstellung (D) zeigt, dass Nf-κB nicht im Zellkern vorliegt.

## 3.2 Polymorphismenuntersuchungen

Im zweiten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen genetischen Variationen im IL-18 Promotor und dem Verlauf von Nierentransplantationen gibt. Dazu sollte im Rahmen einer retrospektiven Studie überprüft werden, in wieweit es Unterschiede bei dem Auftreten einer verzögerten Nierenfunktion nach Nierentransplantation (DGF) gab, oder es unterschiedlich häufig zu akuten Abstoßungsreaktionen kam.

### 3.2.1 Beschreibung der Gruppe und klinischer Parameter

Der überwiegende Teil der Patienten (n=133; 90,5%) erhielt ein Organ hirntoter Organspender, Nieren von Lebendspendern erhielten 14 Patienten (9,5%). Das Alter der Spender betrug 13 bis 83 Jahre, das mittlere Alter  $53 \pm 14,5$  Jahre (Median: 53 Jahre), die KIZ 0-34 Std (mittlere KIZ:  $12,4 \pm 6,1$  Std; Median 12 Std), die WIZ 1,25 bis 185 min (mittlere WIZ:  $45,8 \pm 22,0$  min; Median 40 min). Im HLA System zeigten sich Gesamtzahlen an Mismatches von 0-6 (Median 3). Bei den einzelnen HLA- A, B und Dr betragen die Mediane der Mismatche jeweils 1, es kamen jeweils Mismatche von 0-2 vor. Eine vollständige Übereinstimmung der HLA-Antigene beim Spender und Empfänger (Fullhouse-Niere) zeigte sich in 18 Fällen. Leukozytenantikörper wurden in 20 (13,6%) der Fälle nachgewiesen. 27 Patienten (18,4%) galten als Risikopatienten für eine CMV-Infektion (Spender CMV IgG positiv, Empfänger CMV IgG negativ). Einen verzögerten

Funktionsbeginn (DGF) zeigten 56 Patienten (38,1%), ein sofortiger Funktionsbeginn wurde bei 91 Patienten (61,9%) beobachtet. Bioptisch gesicherte Abstoßungsreaktionen traten in 48 Fällen (32,7%) 3 bis 330 Tage (Median 26 Tage) nach Nierentransplantation auf. Die Inzidenz einer Abstoßungsreaktion war nicht gekoppelt an das Auftreten einer DGF,  $p=0,717$ . Das Serumkreatinin der Empfänger lag 4 Wochen nach Transplantation bei 0,65 bis 8,9 mg/dl (mittleres Krea:  $2,06 \pm 1,14$  mg/dl, Median: 1,77 mg/dl).

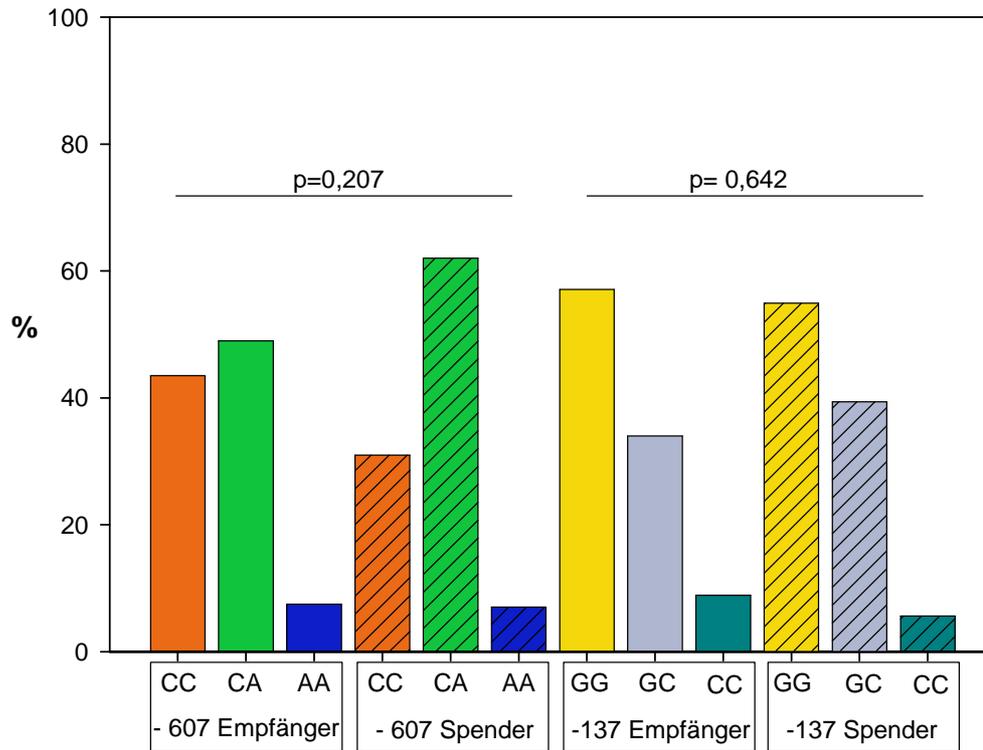
### 3.2.2 Verteilung der IL-18 Promotorgenpolymorphismen in den verschiedenen Gruppen

Die Verteilung der SNP -607C/A und -137G/C in den Gruppen der Empfänger und der Spender sowie in der Kontrollgruppe ist in der folgenden Tabelle aufgezeigt.

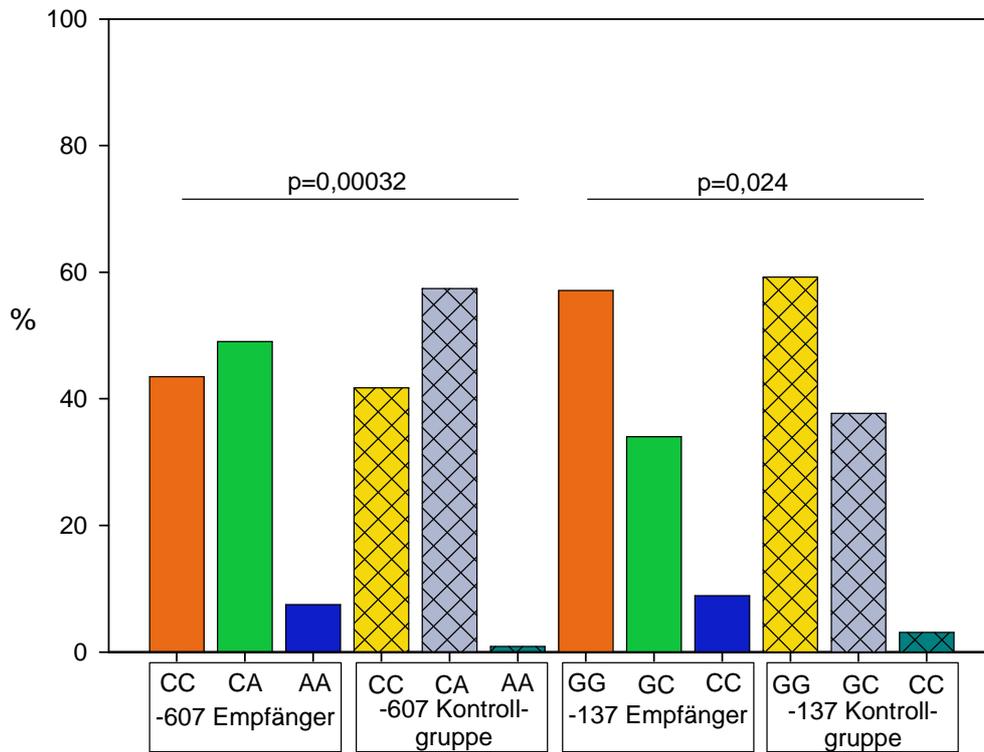
<i>Genotyp</i>	<i>Empfänger n=147 (%)</i>	<i>Spender n=70 (%)</i>	<i>Kontrollgruppe n=326 (%)</i>
<i>-607</i>			
CC	64 (43,5)	22 (31,4)	136 (41,7)
CA	72 (49,0)	43 (61,4)	187 (57,4)
AA	11 (7,5)	5 (7,2)	3 (0,9)
<i>-137</i>			
GG	84 (57,2)	39 (55,7)	193 (59,2)
GC	50 (34,0)	27 (38,6)	123 (37,7)
CC	13 (8,8)	4 (5,7)	10 (3,1)

**Tabelle 3.2.2.1:** Häufigkeiten der einzelnen Genotypen der SNP's -607C/A und -137 G/C in den Gruppen der Empfänger und Spender und der Kontrollgruppe

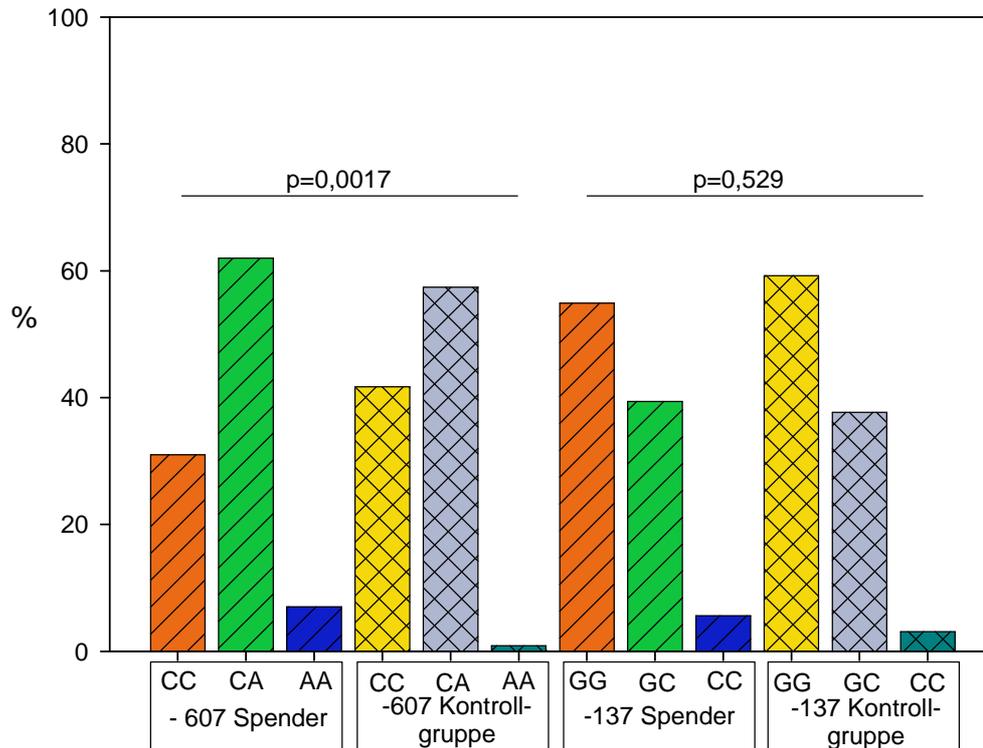
Die Häufigkeiten der Genotypen unterschieden sich teilweise signifikant zwischen den verschiedenen Gruppen. Die Unterschiede sind in den nachfolgenden Grafiken dargestellt.



**Abbildung 3.2.2.2:** Die Gruppen der Empfänger und der Spender unterscheiden sich nicht signifikant in Bezug auf die Verteilung der verschiedenen Genotypen der IL-18 SNP's -607C/A ( $p=0,207$ ) und -137G/C ( $p=0,642$ ).



**Abbildung 3.2.2.3:** Die Verteilungen der einzelnen Genotypen der IL-18 Promotor SNP's -607C/A und -137G/C unterscheiden sich signifikant zwischen den Gruppen der Empfänger und der Kontrollgruppe (-607C/A  $p=0,00032$ ; -137G/C  $p=0,024$ ).



**Abbildung 3.2.2.4:** Die Gruppen der Spender unterschieden sich von der Kontrollgruppe statistisch signifikant in Bezug auf die Verteilung der einzelnen Genotypen des IL-18 Promotor SNP -607C/A ( $p=0,0017$ ) und unterschieden sich nicht signifikant in der Verteilung des SNP -137G/C ( $p=0,529$ ).

### 3.2.3 Hardy Weinberg Equilibrium

Die Empfängergruppe lag mit beiden SNP's im Hardy Weinberg Equilibrium (HWE) (SNP -607C/A  $p=0,312$ ; SNP -137G/C  $p=0,393$ ). Die Spendergruppe wich bezüglich des SNP -607C/A leicht vom HWE ab ( $p=0,038$ ), im Falle des SNP -137G/C lag die Spendergruppe im HWE ( $p=0,972$ ). Die Kontrollgruppe wich ebenfalls im Falle des SNP -607C/A vom HWE ab ( $p<0,001$ ) und lag im HWE bei SNP -137G/C ( $p=0,185$ ).

### 3.2.4 IL-18 Promotergenpolymorphismen und das Auftreten einer verzögerten Nierentransplantatfunktion

Es sollte nun untersucht werden, ob die SNP's -607C/A und -137G/C einen Einfluss auf die Entwicklung eines verzögerten Nierenfunktionsbeginns nach Nierentransplantation hatten. Die Patienten wurden in Gruppen mit sofortigem Funktionsbeginn und mit verzögertem Funktionsbeginn (DGF) des Transplantates eingeteilt.

Die Kriterien zur Einteilung in die Gruppe mit DGF waren: Anurie (weniger als 500 ml Urin-Ausscheidung in 24 Std.), Anstieg des Serumkreatinis um mehr als 30 Prozent des Basiswertes und die wiederholte Notwendigkeit zur Hämodialyse innerhalb der ersten 5 Tage nach Transplantation.

Nun wurden die transplantationsbezogenen klinischen Daten der Gruppen der Patienten mit sofortigem Funktionsbeginn und der Patienten mit DGF miteinander verglichen (Tabelle 3.2.4.1). Typische, den Verlauf einer Transplantation beeinflussende Faktoren (bezogen auf die Primärfunktion und das Kurz- und Langzeittransplantatüberleben), wie Anzahl der Mismatches, PRA, Spender-Alter sowie Lebendspender oder postmortaler Nierenspender waren zwischen den Gruppen nicht signifikant unterschiedlich verteilt. Ebenso unterschieden sich die beiden Gruppen nicht in Bezug auf die Anzahl von CMV-Hochrisikopatienten (Spender CMV positiv, Empfänger CMV negativ). Unterschiede gab es zwischen den Gruppen hinsichtlich unterschiedlich langer Ischämiezeiten, die bekanntermaßen äußerst relevant für das Auftreten von DGF sind. Die kalte und warme Ischämiezeit war jeweils in der Gruppe der Patienten die eine DGF erlitten signifikant erhöht ( $p=0,015$  bzw.  $p=0,028$ ).

Den Transplantationsverlauf nicht beeinflussende Faktoren wie Empfängeralter und -Geschlecht, waren zwischen den Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Zwischen den beiden Gruppen hochsignifikant unterschiedlich war das Serumkreatinin nach 4 Wochen. Dieser Wert lässt eine Aussage über die Qualität der Nierenfunktion zu. Diese war nach 4 Wochen bei den Patienten deutlich besser, die einen sofortigen Funktionsbeginn nach Nierentransplantation hatten. Der signifikant unterschiedliche Kreatininwert spiegelt die Konsequenz der verzögerten Nierenfunktion wider.

Variabel	Keine DGF n=91 (%)	DGF n=56 (%)	Signifikanz (p)
Alter (Mw ± Stabw)	50,2 ± 13,0	51,7 ± 12,8	0,515 <sup>b</sup>
Geschlecht			
Weiblich	35 (38,5)	18 (32,1)	0,483 <sup>a</sup>
Männlich	56 (61,5)	38 (67,9)	
Mismatche (Mw ± Stabw)			
MMA	0,9 ± 0,7	0,8 ± 0,7	0,889 <sup>a</sup>
MMB	1,1 ± 0,7	1,0 ± 0,7	0,353 <sup>a</sup>
MMDr	1,1 ± 0,8	0,9 ± 0,7	0,332 <sup>a</sup>
PRA			
Ja	10 (11,0)	10 (17,9)	0,322 <sup>a</sup>
Nein	81 (89,0)	46 (82,1)	
CMV Hochrisiko			
Ja	16 (17,6)	11 (19,6)	0,827 <sup>a</sup>
Nein	75 (82,4)	45 (80,4)	
KIZ [hours] (Mw ± Stabw)	11,5 ± 6,2	14,0 ± 5,8	0,015 <sup>b</sup>
WIZ [min] (Mw ± Stabw)	41,7 ± 15,4	50,6 ± 26,0	0,028 <sup>b</sup>
Spenderalter (Mw ± Stabw)	51,5 ± 15,2	55,4 ± 13,1	0,169 <sup>b</sup>
Lebend-/Leichenspender			
Lebend	12 (13,2)	2 (3,6)	0,08 <sup>a</sup>
Leiche	79 (86,8)	54 (96,4)	
Serumkreatin n. 4 Wochen, [mg/dl] (Mw ± Stabw)	1,71 ± 0,68	2,63 ± 1,45	<0,0001 <sup>b</sup>

PRA= Pannel reactive antibodies (HLA Antikörper); CMV= Cytomegalovirus; KIZ=Kalte Ischämiezeit; WIZ=Warme Ischämiezeit  
<sup>a</sup> Fisher´s Exakt Test, <sup>b</sup> Mann Whitney U-Test

**Tabelle 3.2.4.1:** Charakteristika der Studiengruppe und transplantationsbezogene Daten und deren Verteilung in den Gruppen mit bzw. ohne DGF.

Die Verteilungen der Allele des IL-18 Promoter SNP -137G/C der Empfänger unterschied sich signifikant zwischen den Gruppen der Patienten mit sofortigem bzw. verzögertem Funktionsbeginn. Das Allel -137C der Empfänger war assoziiert mit einem erhöhten Risiko eine DGF zu entwickeln (OR 1,946; 95% KI 1,146-3,306; p=0,019). Die Verteilungen der Genotypen des -137G/C SNP zwischen den Gruppen unterschied sich ebenfalls signifikant. Der Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest zeigte einen signifikanten Unterschied in den Häufigkeiten der Genotypen -137GG und -137CC zwischen den Gruppen mit sofortiger Nierenfunktion und DGF. Die Betrachtung der Odds Ratio (OR) und des Konfidenzintervalls (KI) ergab, dass das Risiko einer DGF zu unterliegen bei den Patienten, die den Genotyp -137CC trugen, signifikant erhöht war (OR 4,165; 95%

---

KI 1,217-1,425;  $p=0,035$ ). Die Häufigkeiten der Genotypen und Allele des IL-18 Promotor SNP -607C/A zeigten bei den Empfängern keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung zwischen den Gruppen mit sofortigem und verzögertem Funktionsbeginn.

Die Häufigkeiten der Allele und Genotypen der Spender waren zwischen den Gruppen mit verzögerter Nierenfunktion und DGF nicht signifikant unterschiedlich. Allerdings zeichnete sich ein Trend in den Verteilungen ab, der eine ähnliche Verteilung der Genotypen und Allele zwischen den Gruppen wie bei den Empfängern andeutete.

SNP Empfänger	Keine DGF n=91 (%)	DGF n=56 (%)	p-Wert	Odds Ratio (95% KI)
<i>IL-18 -607 C/A</i>				
<i>Genotypen</i>				
CC	45 (49,4)	19 (34,0)	0,183 <sup>b</sup>	0,525 (0,264 – 1,044)
CA	40 (44,0)	32 (57,1)		1,700 (0,868 – 3,329)
AA	6 (6,6)	5 (8,9)		1,389 (0,403 – 4,782)
<i>Allele</i>				
C	130 (71,4)	70 (62,5)	0,123 <sup>a</sup>	0,667 (0,405 – 1,099)
A	52 (28,6)	42 (37,5)		
<i>IL-18 -137 G/C</i>				
<i>Genotypen</i>				
GG	57 (62,6)	27 (48,2)	0,035 <sup>b</sup>	0,555 (0,283 – 1,090)
GC	30 (33,0)	20 (35,7)		1,130 (0,561 – 2,274)
CC	4 (4,4)	9 (16,1)		4,165 (1,217 – 14,25)
<i>Allele</i>				
C	38 (20,9)	38 (33,9)	0,019 <sup>a</sup>	1,946 (1,146 – 3,306)
G	144 (79,1)	74 (66,1)		
SNP Spender	Keine DGF n=44 (%)	DGF n=26 (%)	p-Wert	Odds Ratio (95% KI)
<i>IL-18 -607 C/A</i>				
<i>Genotypen</i>				
CC	16 (36,4)	6 (23,1)	0,353 <sup>b</sup>	0,525 (0,175 – 1,576)
CA	26 (59,1)	17 (65,4)		1,308 (0,475 – 3,602)
AA	2 (4,5)	3 (11,5)		2,740 (0,447 – 16,773)
<i>Allele</i>				
C	58 (65,9)	29 (55,8)	0,280 <sup>a</sup>	0,652 (0,323 – 1,318)
A	30 (31,8)	23 (44,2)		
<i>IL-18 -137 G/C</i>				
<i>Genotype</i>				
GG	28 (63,6)	11 (42,3)	0,265 <sup>b</sup>	0,419 (0,167 – 1,190)
GC	14 (34,1)	13 (50,0)		2,143 (0,791 – 5,804)
CC	2 (4,5)	2 (7,7)		1,750 (0,233 – 13,136)
<i>Allele</i>				
C	18 (20,5)	17 (32,7)	0,157 <sup>a</sup>	1,889 (0,889 - 4,097)
G	70 (79,5)	35 (67,3)		

<sup>a</sup> Fisher's Exakt Test, <sup>b</sup>  $\chi^2$ -Test

**Tabelle 3.2.4.2:** Verteilungen der Genotyp- und Allelhäufigkeiten der IL-18 SNP's -607C/A und -137G/C bei Nierentransplantat-Empfängern und –Spendern. Als Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest wurde der Bonferroni-Test verwendet.

Da sich beide SNP's auf die Promotoraktivität ausüben, besteht die Möglichkeit, dass sich bestimmte Kombinationen der Genotypen besonders stark auf die Expression des IL-18 auswirken und so die Entstehung einer DGF begünstigen. Um einen möglichen gekoppelten Effekt der SNP's -607C/A und -137G/C in Bezug auf die Auswirkung einer DGF aufzudecken, wurden die Verteilungen der kombinierten Genotypen in den Gruppen mit sofortigem und verzögerten Funktionsbeginn untersucht.

Die Betrachtung der kombinierten Genotypen (-607C/A und -137G/C) zeigte, dass Empfänger, welche die Kombination der Genotypen -607CA und -137CC trugen, ein signifikant erhöhtes Risiko hatten, einer DGF zu unterliegen (OR 6,357; 95% KI 1,271-31,793; p=0,027). Alle anderen Unterschiede in den Verteilungen waren statistisch nicht signifikant.

<i>Kombinierte Genotypen der Empfänger n=147</i>	<i>Keine DGF n=91 (%)</i>	<i>DGF n=56 (%)</i>	<i>p-Wert (Fisher's Exakt Test)</i>	<i>Odds Ratio (95%KI)</i>
-607CC/-137GG	45 (49,5)	19 (33,9)	0,087	0,525 (0,264 – 1,046)
-607AC/-137GG	12 (13,2)	8 (14,3)	1,000	1,097 (0,419 - 2,877)
-607AC/-137CG	26 (28,6)	17 (30,4)	0,853	1,090 (0,526 – 2,259)
-607AA/-137CG	4 (4,4)	3 (5,4)	1,000	1,231 (0,265 – 5,716)
<b>-607AC/-137CC</b>	<b>2 (2,2)</b>	<b>7 (12,5)</b>	<b>0,027</b>	<b>6,357 (1,271 - 31,793)</b>
-607AA/-137CC	2 (2,2)	2 (3,6)	0,636	1,648 (0,226 – 12,044)

<i>Kombinierte Genotypen der Spender n=70</i>	<i>Keine DGF n=44 (%)</i>	<i>DGF n=26 (%)</i>	<i>p-Wert (Fisher's exact test)</i>	<i>Odds Ratio (95%KI)</i>
-607CC/-137GG	12 (27,3)	4 (15,4)	0,252	0,434 (0,125 – 1,508)
-607AC/-137GG	14 (31,8)	5 (19,2)	0,282	0,510 (0,159 - 1,633)
-607AA/-137GG	1 (2,3)	2 (7,7)	0,551	3,583 (0,309 - 41,602)
-607CC/-137CG	3 (6,8)	1 (3,9)	1,000	0,547 (0,054 - 5,547)
-607AC/-137CG	11 (25,0)	11 (42,3)	0,108	2,493 (0,873 – 7,125)
-607AA/-137CG	1 (2,3)	1 (3,9)	1,000	1,720 (0,103 - 28,721)
-607AC/-137CC	2 (4,5)	1 (3,9)	1,000	0,840 (0,072 - 9,744)
-607CC/-137CC	0 (0)	1 (3,9)	0,362	2,801 (0,265 - 0,495)

**Tabelle 3.2.4.3:** Kombinierte Genotypen der Empfänger und Spender im Bezug auf die Entwicklung einer DGF. Das signifikante Ergebnis ist fett markiert.

### 3.2.5 Haplotypenanalyse

In der PCR ist keine Zuordnung zwischen einzelnen Allelen und den zugehörigen Chromosomen (des diploiden Chromosomensatzes) möglich. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass Allele, die in enger Nachbarschaft zueinander liegen, gemeinsam (en Bloc) vererbt werden. Gemeinsam vererbte Allele (Allelkombinationen) werden Haplotyp genannt. Die Wahrscheinlichkeit und die Häufigkeit des Auftretens spezifischer Haplotypen lassen sich statistisch berechnen.

Es wurde eine Haplotypenanalyse durchgeführt, in der die Häufigkeit des Auftretens der verschiedenen möglichen spezifischen Allelkombinationen errechnet wurde. Außerdem wurde eine mögliche Auswirkung der Haplotypen auf die Entstehung einer DGF untersucht. Bei der Analyse der Gesamtgruppe der Empfänger zeigte sich, dass alle vier möglichen Haplotypen in der Gruppe vorkamen. Mit 64,6% am häufigsten trat die Kombination -607C/-137G auf, die den Wildtypformen beider SNP's entspricht. Die Verteilung der Haplotypen zwischen Gruppen mit DGF und sofortigem Funktionsbeginn war signifikant unterschiedlich ( $p=0,03$ ).

Bei den Empfängern war die Wildtypenkombination (-607C/-137G) häufiger in der Gruppe mit sofortigem Funktionsbeginn zu finden (70%) im Vergleich zu der Gruppe mit DGF (56%) und schien einen protektiven Effekt auszuüben. Die Haplotypen -607A/-137C und -607C/-137C erschienen häufiger in den Gruppen mit DGF und zeigten somit einen Trend für vermehrtes Auftreten von DGF. Haplotyp -607A/-137G war bei den Empfängern mit DGF und sofortigem Funktionsbeginn nahezu gleich verteilt.

<i>Haplotyp</i>	<i>Gesamt</i>	<i>keine DGF</i>	<i>DGF</i>	<i>p-Wert</i>
-607A/-137C	0,223	0,19	0,27	0,03
-607C/-137C	0,034	0,014	0,06	
-607A/-137G	0,097	0,093	0,10	
-607C/-137G	0,646	0,70	0,56	

**Tabelle 3.2.5.1:** Die Verteilung der Haplotypen der IL-18 SNP's -607/-137 im Empfänger ist signifikant unterschiedlich zwischen den Gruppen mit bzw. ohne DGF,  $n=147$ .

Die Analyse der Haplotypen der Spender zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit DGF und sofortigem Funktionsbeginn.

<i>Haplotyp</i>	<i>Gesamt</i>	<i>keine DGF</i>	<i>DGF</i>	<i>p-Wert</i>
-607A/-137C	0,116	0,094	0,151	0,13
-607C/-137C	0,134	0,110	0,176	
-607A/-137G	0,263	0,246	0,291	
-607C/-137G	0,487	0,549	0,382	

**Tabelle 3.2.5.2:** Die Verteilung der Haplotypen der IL-18 SNP's -607/-137 im Spender ist nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Gruppen mit, bzw. ohne DGF, n=70

Unterschiedliche Genotypen des IL-18 Promotors beim Empfänger scheinen sich auf die Entstehung einer DGF auszuwirken. Unterschiedliche Genotypen des Spenders scheinen hingegen die Entstehung einer DGF nicht zu beeinflussen.

### **3.2.6 IL-18 Promotorgenpolymorphismen und das Auftreten von Transplantat-Abstoßungsreaktionen**

Im Folgenden sollte die Auswirkung der SNP's -607C/A und -137G/C auf eine mögliche Transplantat-Abstoßungsreaktion untersucht werden. Bei einem klinischen Verdacht auf eine Abstoßungsreaktion (Transplantatnierenversagen, verzögertes Einsetzen der Transplantatfunktion oder Kreatininanstieg nach initial guter Transplantatfunktion) wurde eine Nierenbiopsie entnommen. Die Abstoßungsreaktion wurde bioptisch sowie immunhistologisch durch einen Nierenpathologen (Herr Prof. Dr. H.J. Gröne, deutsches Krebsforschungszentrum (DKfZ) Heidelberg) diagnostiziert. In 48 Fällen wurde eine Transplantat-Abstoßungsreaktion diagnostiziert. Die beiden Patientengruppen (Abstoßer, nicht-Abstoßer) wurden in Bezug auf typische den Verlauf der Transplantation beeinflussende Faktoren verglichen (Tabelle 3.2.6.1). Dabei zeigte sich, dass das Empfängeralter zwischen den Gruppen signifikant unterschiedlich war. In der Gruppe der Abstoßer war das Durchschnittsalter ca. 5 Jahre niedriger ( $p=0,022$ ). Ausserdem war die durchschnittliche warme Ischämiezeit bei den Patienten die eine Abstoßungsreaktion erlitten signifikant niedriger im Vergleich zu der

Patientengruppe ohne Abstoßungsreaktionen ( $p=0,033$ ). Der Serumkreatininwert nach 4 Wochen, als Zeichen für die Qualität der Nierenfunktion, war in der Gruppe der Abstoßerpatienten signifikant schlechter ( $p<0,0001$ ). Alle anderen Daten unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen.

<i>Variable</i>	<i>Keine Abstoßung n=99 (%)</i>	<i>Abstoßung n=48 (%)</i>	<i>p-Wert</i>
Alter (Mw $\pm$ Stabw)	52,4 $\pm$ 13,1	47,5 $\pm$ 11,9	0,022 <sup>b</sup>
Geschlecht			
Weiblich	35 (33,4)	18 (37,5)	0,855 <sup>a</sup>
Männlich	64 (64,6)	30 (62,5)	
Mismatche (Mw $\pm$ Stabw)			
MMA	0,9 $\pm$ 0,7	0,8 $\pm$ 0,6	0,537 <sup>a</sup>
MMB	1,1 $\pm$ 0,7	1,1 $\pm$ 0,7	0,724 <sup>a</sup>
MMDr	1,0 $\pm$ 0,8	1,0 $\pm$ 0,7	0,067 <sup>a</sup>
PRA			
Ja	10 (10,1)	10 (20,8)	0,121 <sup>a</sup>
Nein	89 (89,9)	38 (79,2)	
CMV Hochrisiko			
Ja	17 (17,2)	10 (20,8)	0,652 <sup>a</sup>
Nein	82 (82,8)	38 (79,2)	
KIZ [hours] (Mw $\pm$ Stabw)	12,1 $\pm$ 5,6	13,1 $\pm$ 6,9	0,769 <sup>b</sup>
WIZ [min] (Mw $\pm$ Stabw)	47,7 $\pm$ 21,4	41,6 $\pm$ 22,8	0,033 <sup>b</sup>
Spenderalter (Mw $\pm$ Stabw)	54,0 $\pm$ 14,2	5,9 $\pm$ 15,0	0,220 <sup>b</sup>
Lebend-/Leichenspender			
Lebend	11 (11,1)	3 (6,3)	0,550 <sup>a</sup>
Leiche	88 (88,9)	45 (93,8)	
Serumkreatinin n. 4 Wochen, [mg/dl] (Mw $\pm$ Stabw)	1,83 $\pm$ 0,89	2,55 $\pm$ 1,42	<0,0001 <sup>b</sup>

PRA= Pannel reactive antibodies (HLA Antikörper); CMV= Cytomegalovirus; KIZ=Kalte Ischämiezeit; WIZ= Warme Ischämiezeit  
<sup>a</sup> Fisher's Exakt Test, <sup>b</sup> Mann Whitney U-Test

**Tabelle 3.2.6.1:** Charakteristika der Studiengruppe und transplantationsbezogene Daten und deren Verteilung in den Gruppen mit bzw. ohne Abstoßungsreaktion

Bei den Assoziationsanalysen der Auswirkung der Genotypen und Allele auf das Auftreten einer Abstoßungsreaktion ergaben sich keine statistisch signifikanten Ergebnisse.

<i>SNP Empfänger</i>	<i>Keine Abstoßung n=99 (%)</i>	<i>Abstoßung n=48 (%)</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Odds Ratio</i>	<i>95% KI</i>
<i>IL-18 -607 C/A</i>					
<i>Genotypen</i>					
CC	40 (40,4)	24 (50,0)	0,465 <sup>b</sup>	0,195 (0,100 – 0,379)	
CA	52 (52,5)	20 (41,7)			
AA	7 (7,1)	4 (8,3)			
<i>Allele</i>					
C	132 (66,7)	68 (70,8)	0,507 <sup>a</sup>	1,214 (0,714 – 2,064)	
A	66 (33,3)	28 (29,2)			
<i>IL-18 -137 G/C</i>					
<i>Genotypen</i>					
GG	53 (53,5)	31 (64,6)	0,424 <sup>b</sup>	1,583 (0,777 – 3,224)	
GC	37 (37,4)	13 (27,1)			
CC	9 (9,1)	4 (8,3)			
<i>Allele</i>					
C	55 (27,8)	21 (21,9)	0,321 <sup>a</sup>	0,728 (0,410- 1,294)	
G	143 (72,2)	75 (78,1)			
<i>SNP Spender</i>	<i>Keine Abstoßung n=52 (%)</i>	<i>Abstoßung n=18 (%)</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Odds Ratio</i>	<i>95% KI</i>
<i>IL-18 -607 C/A</i>					
<i>Genotypen</i>					
CC	16 (30,8)	6 (33,3)	0,941 <sup>b</sup>	0,794 (0,262 – 2,404)	
CA	32 (61,5)	11 (61,1)			
AA	4 (7,7)	1(5,6)			
<i>Allele</i>					
C	64 (61,5)	23 (63,9)	0,844 <sup>a</sup>	1,106 (0,502– 2,434)	
A	40 (38,5)	13 (36,1)			
<i>IL-18 -137 G/C</i>					
<i>Genotypen</i>					
GG	27 (51,9)	12 (66,7)	0,334 <sup>b</sup>	1,852 (0,604 – 5,680)	
GC	21 (40,4)	6 (33,3)			
CC	4 (7,7)	0(0,0)			
<i>Allele</i>					
C	29 (27,9)	6 (16,7)	0,264 <sup>a</sup>	0,517 (0,197-1,362)	
G	75 (72,1)	30 (83,3)			

<sup>a</sup> Fisher's exakt Test, <sup>b</sup> X<sup>2</sup> -Test

**Tabelle 3.2.6.2:** Häufigkeiten der Genotypen und der Allele der SNP's -607C/A und -137G/C der Spender und Empfänger und deren Verteilung in den Gruppen der Nierentransplantierten mit, bzw. ohne Abstoßungsreaktion

Es ist zu vermuten, dass sich die verschiedenen Genotypen der IL-18 SNP's des Empfängers und des Spenders nicht auf die Inzidenz einer Abstoßungsreaktion auswirken.

### 3.3 Färbungen der Biopsien

In der gesunden Niere konnte die spezifische Lokalisation von IL-18 in Bereichen des distalen Tubulus und des Sammelrohres definiert werden. In den Assoziationsstudien zeigte sich, dass sich Empfängergenotypen auf den postoperativen Verlauf im Transplantat auswirken können. Über die Überprüfung auf eine mögliche *de novo* Expression von IL-18 in Kompartimenten, die in der gesunden Niere IL-18 negativ sind, sollten Hinweise auf eine Beteiligung von IL-18 an der Entstehung an häufig nach Transplantation auftretenden immunologischen Komplikationen überprüft werden. An Nierenbiopsieproben, die Patienten nach Nierentransplantation entnommen wurden und bei denen die Diagnosen zelluläre oder vaskuläre Abstoßungsreaktion, akute Tubulusnekrose (ATN) und chronische Allograftnephropathie (CAN) gestellt wurden, sollte die Lokalisation von IL-18 überprüft werden.

Dazu wurden Peroxidasefärbungen mit einem monoklonalen Antikörper gegen IL-18 an 72 Biopsien von Transplantatnieren durchgeführt. Unter den Biopsien waren 18 mit der Diagnose zelluläre und 13 mit der Diagnose vaskuläre Abstoßungsreaktion, bei 20 Biopsien lag die Diagnose CAN, bei 16 ATN vor. Die Biopsien wurden mit Färbungen an gesundem Nierengewebe von 5 verschiedenen Nieren verglichen. An den Biopsien wurde die Intensität der zellulären IL-18 Färbungen mit der Färbeintensität in gesunden Nieren verglichen. Dies sollte einen Hinweis darauf geben, ob es im Verlauf der Diagnose möglicherweise zu einer Ausschleusung des IL-18 aus der Zelle und damit zu einer intrazellulären Abnahme des IL-18 kommt.

Während der Durchführung der Färbungen zeigte sich, dass bei den unterschiedlichen Diagnosen unterschiedlich viele infiltrierende Zellen IL-18 positiv gefärbt waren. Es gibt Hinweise darauf, dass ein überwiegender Teil des an Abstoßungsreaktionen beteiligten IL-18 aus Makrophagen stammt. Es folgte eine

semiquantitative Auswertung von IL-18 positiv gefärbten infiltrierenden Zellen. Dazu wurden semiquantitative Auswertungen von Färbungen auf Makrophagen, T-Lymphozyten und B-Lymphozyten an anderen Schnitten der gleichen Biopsien vorgenommen. Anschließend wurde die Anzahl von IL-18 positiv gefärbten infiltrierenden Zellen mit der Anzahl an Makrophagen, T-Lymphozyten und B-Lymphozyten bei den verschiedenen Abstoßungsreaktionen bzw. bei ATN und CAN verglichen.

Desweiteren sollte geprüft werden, ob es bei akuten Abstoßungsreaktionen bzw. bei ATN oder CAN IL-18 positiv gefärbte Bereiche im Nephron gibt, die in der gesunden Niere kein IL-18 enthalten. So sollte ein Hinweis auf eine mögliche *de novo* Expression von IL-18 in der Niere erhalten werden.

Die Gewebeschnitte der Biopsien wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. H.-J. Gröne (Institut für Zelluläre und Molekulare Pathologie DKfZ Heidelberg) zur Verfügung gestellt, durch den auch die vorausgegangene Diagnosestellung erfolgt war.

### 3.3.1 Beurteilung der Färbeintensitäten

Die zytoplasmatische Färbung in den Tubulusabschnitten der gesunden Niere war am stärksten, was vermuten ließ, dass hier die größte Menge an IL-18 gespeichert war. Die Menge an IL-18 in den Tubuluszellen bei ATN war ähnlich hoch. Die Menge an zytoplasmatischem IL-18 war bei zellulärer Abstoßung etwas niedriger als bei ATN und war bei CAN und vaskulärer Abstoßung am niedrigsten. Die Färbeintensitäten von IL-18 nahmen bei zunehmendem Schweregrad der Abstoßungsformen ab. Es läßt sich vermuten, dass es zu einer höheren Ausschleusung des IL-18 kommt, wodurch weniger zytoplasmatisches IL-18 detektierbar ist.

Die Intensitäten wurden mittels Kruskal-Wallis-Test verglichen und unterschieden sich signifikant ( $p=0,003$ ).

<i>Diagnose</i>	<i>Mittelwert der Färbeintensität</i>	<i>Stabw</i>	<i>Median</i>
Gesunde Niere	2,60	0,55	3
ATN	2,33	0,82	3
Chronische Abstoßung	1,55	0,61	1
Vaskuläre Abstoßung	1,58	0,70	1
Zelluläre Abstoßung	2,06	0,73	2

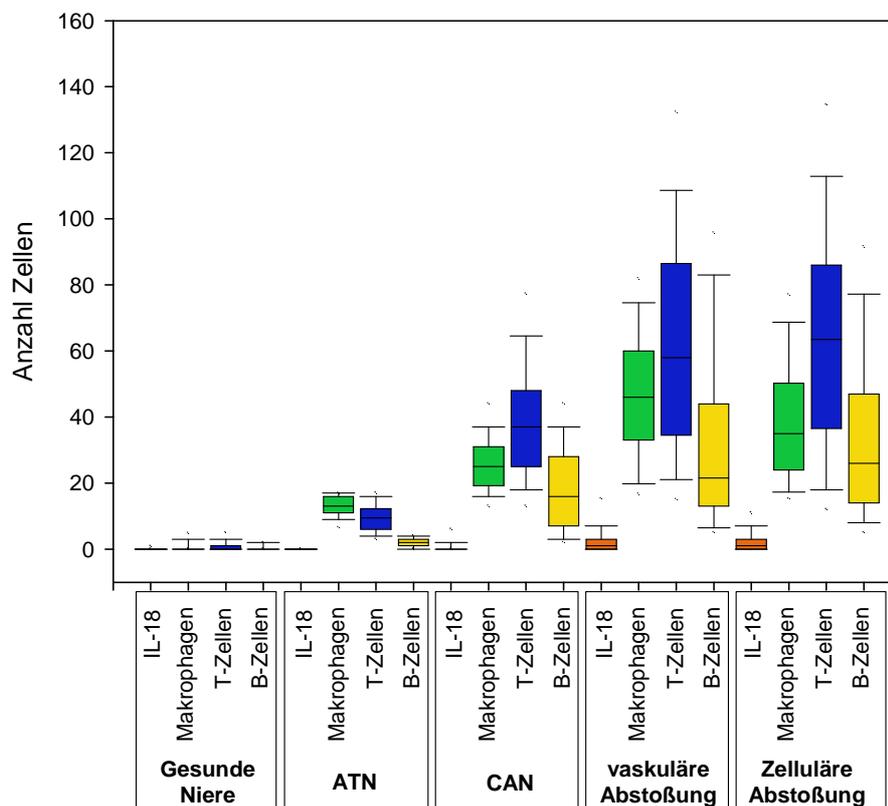
**Tabelle 3.3.1.1:** Die Intensitäten der Zellfärbungen in den Tubulusabschnitten bei den verschiedenen Diagnosen unterscheiden sich signifikant, Die Färbeintensität wurde auf einer Skala von 0-3 eingeteilt.

### 3.3.2 Färbung der infiltrierenden Zellen

In der gesunden Niere fanden sich nur selten vereinzelte infiltrierende Zellen im Interstitium. Der Vergleich der Gesamtanzahl an infiltrierenden Zellen zeigte Unterschiede zwischen den verschiedenen Diagnosen. Die Gesamtanzahl an infiltrierenden Zellen war bei vaskulärer und zellulärer Abstoßung am höchsten, bei chronischer Abstoßung etwas niedriger und bei ATN am geringsten. Das Verhältnis der infiltrierenden Zellen zueinander war bei den verschiedenen Diagnosen ähnlich, bei ATN war das Verhältnis von Makrophagen zu Lymphozyten etwas höher als bei CAN, vaskulärer und zellulärer Abstoßung. Die meisten IL-18 positiv gefärbten infiltrierenden Zellen konnten bei der vaskulären und zellulären Abstoßung ausgemacht werden. Das Verhältnis von IL-18 positiv gefärbten Zellen zu den anderen infiltrierenden Zellen war bei allen Diagnosen ähnlich.

Die Gruppen wurden mittels Kruskal-Wallis-Test verglichen und unterschieden sich signifikant ( $p \leq 0,001$ ). Der Post-Hoc Test zeigte, dass sich die Anzahl an IL-18 positiven Zellen signifikant zwischen gesunder Niere und vaskulärer und zellulärer Abstoßung unterschied. Signifikante Unterschiede gab es ebenso zwischen ATN sowie CAN und den akuten Abstoßungsformen. Die Anzahl an infiltrierenden Makrophagen unterschied sich zwischen allen Diagnosen signifikant. Die Anzahl der T- und B-Lymphozyten unterschied sich signifikant zwischen gesunder Niere

und den Diagnosen CAN, vaskuläre und zelluläre Abstoßung, ebenso unterschieden sich die Anzahl an Lymphozyten zwischen ATN sowie CAN und den akuten Abstoßungen. Die Anzahl an Lymphozyten unterschied sich außerdem signifikant zwischen den Diagnosen ATN und CAN.

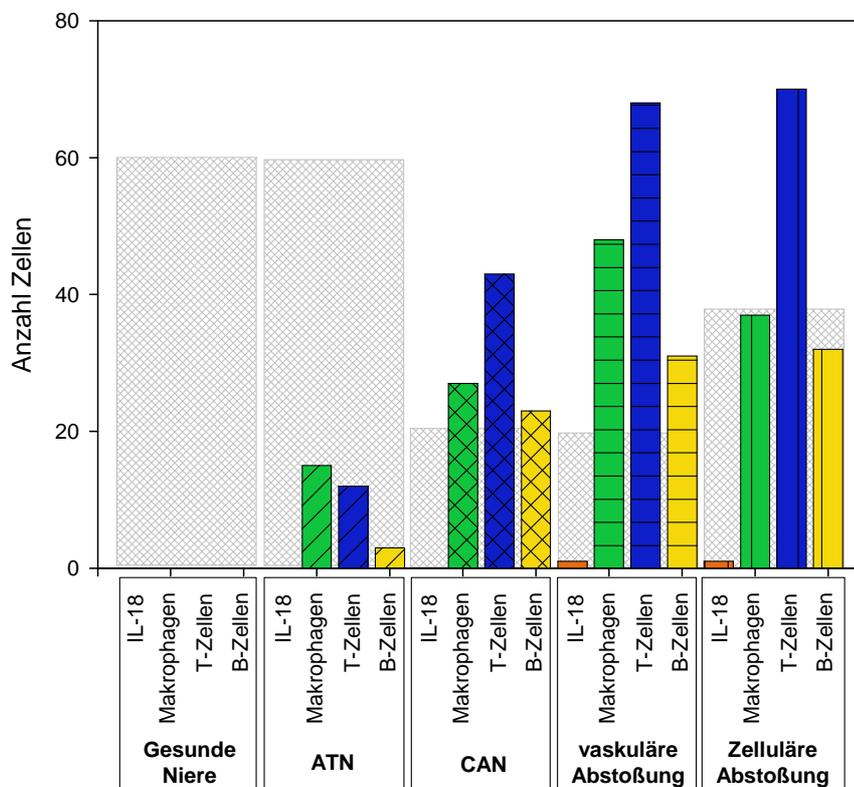


**Abbildung 3.3.2.1:** Die Anzahl der infiltrierenden Zellen unterscheiden sich zwischen den verschiedenen Diagnosen signifikant voneinander ( $p \leq 0,001$ ). Angegeben sind die Mediane der gezählten Zellen pro Gesichtsfeld sowie die 10%, 25%, 75% und 90% Perzentile mit 5% und 95%-Ausreißer-Werten.

### 3.3.3 Gemeinsame Betrachtung der Färbeintensitäten und der infiltrierenden Zellen

Bei dem Vergleich der Ergebnisse der Färbeintensitäten von IL-18 positiv gefärbten Tubuluszellen und der Anzahl der infiltrierenden Zellen fiel auf, dass hier möglicherweise ein Zusammenhang bestehen könnte. Abbildung 3.3.3.1 verdeutlicht, dass in der normalen Niere und in der Niere mit ATN eine hohe intrazelluläre IL-18 Färbung in den tubulären Schaltzellen vorlag und es gleichzeitig

eine relativ niedrige Zahl an infiltrierenden Zellen gab. Bei den Diagnosen zelluläre und vaskuläre Abstoßungsreaktion sowie bei CAN waren die Intensitäten der zytoplasmatischen IL-18 Färbung schwächer, gleichzeitig lagen vergleichsweise mehr infiltrierende Zellen vor. Dies könnte ein Hinweis auf einen bestehenden Zusammenhang zwischen von renalen Zellen freigesetztem IL-18 und der Rekrutierung von infiltrierenden Zellen sein. Durch die Ausschleusung von aktivem IL-18 aus dem Zytoplasma könnte ein Stimulus zur T-Zell Reifung, Makrophagenproliferation und zu einer Akkumulation der Makrophagen im Transplantat erfolgen.

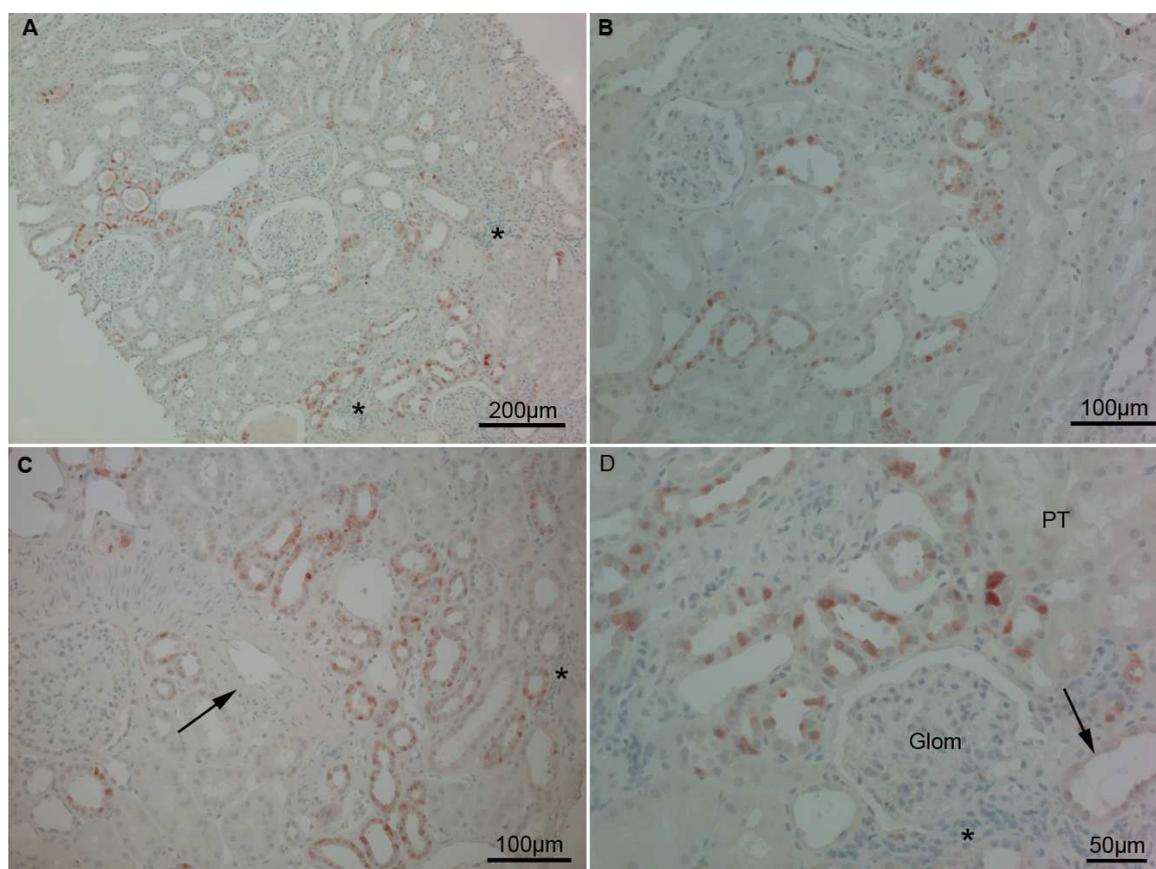


**Abbildung 3.3.3.1:** Gemeinsame Betrachtung der infiltrierenden Zellen und der IL-18 Färbeintensitäten der Tubuluszellen. Es sind jeweils die Mediane dargestellt. Der schraffierte Bereich deutet die Intensität der Färbung der Tubuluszellen an (zugrunde liegen die Mediane. Für gesunde Niere und ATN=3, CAN und vaskuläre Abstoßung=1, für zelluläre Abstoßung=2). Bei einer im Vergleich zur gesunden Niere oder ATN niedrigeren Färbeintensität in den Schaltzellen (zelluläre, vaskuläre Abstoßung und CAN) liegen mehr infiltrierende Zellen vor. Bei zellulärer Abstoßung liegt im Vergleich zu CAN und vaskulärer Abstoßung eine höhere Färbeintensität der tubulären Schaltzellen vor.

### 3.3.4 Morphologische Begutachtung der IL-18 Expression in der Transplantatniere bei Abstoßungsreaktionen und akuter Tubulusnekrose

#### 3.3.4.1 Akute Tubulusnekrose

In den Biopsien mit der Diagnose akute Tubulusnekrose (ATN) entsprach das Färbemuster dem der gesunden Nieren. Das typische Bild der IL-18 positiv gefärbten Schaltzellen des distalen Tubulusbereiches und der Sammelrohre war zu erkennen. Es zeigte sich kein Unterschied in der Intensität der zellulären Färbung im Vergleich zur gesunden Niere. Es waren unterschiedlich starke, meist diffuse Infiltrate im Interstitium zu erkennen, in denen sehr selten und vereinzelt Zellen IL-18 positiv gefärbt waren. Da bei der ATN insgesamt weniger Infiltrate zu beobachten waren, war die Anzahl der IL-18 positiven infiltrierenden Zellen im Vergleich zu akuter und chronischer Abstoßung niedriger. Die Blutgefäße (Abb. 3.3.4.1.1 C), Glomeruli und proximale Tubuluszellen waren nicht IL-18 positiv gefärbt.

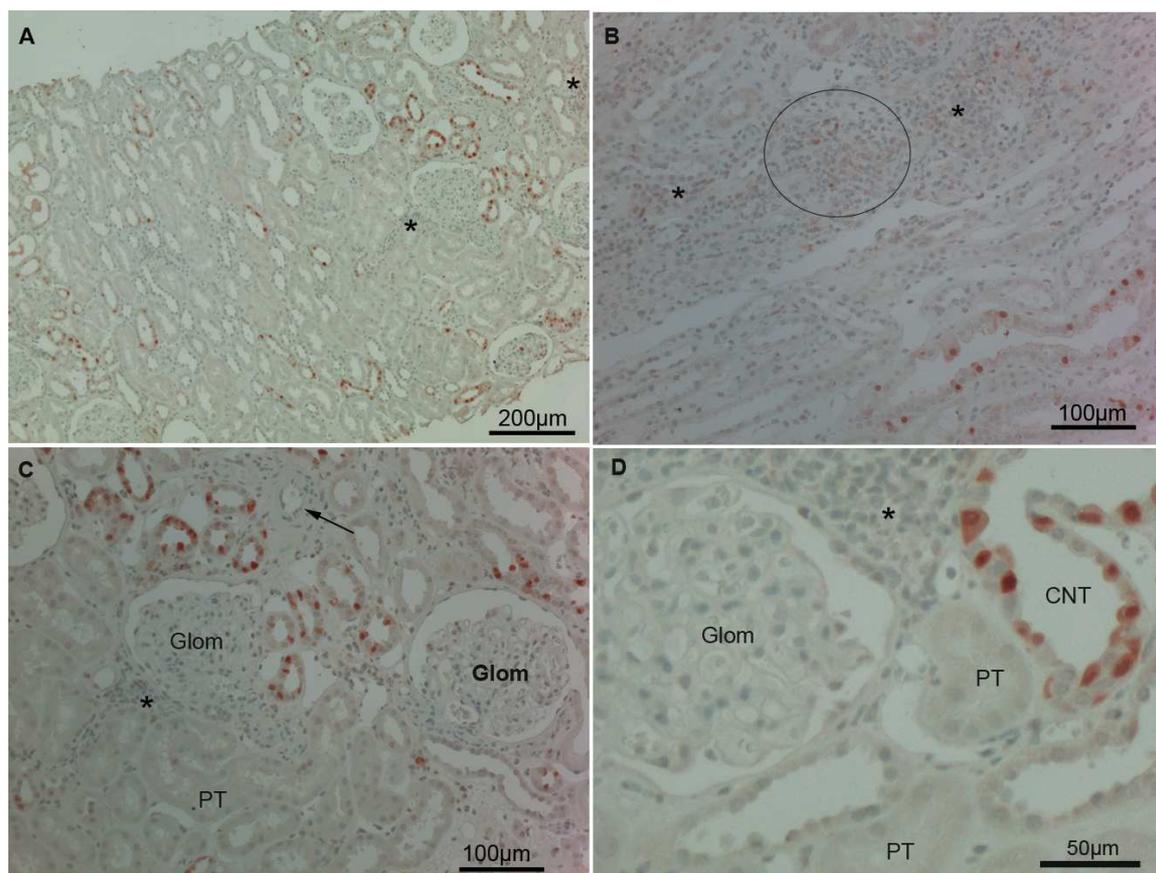


**Abbildung 3.3.4.1.1:** Bild einer ATN, Immunhistochemische Färbung mit einem monoklonalen IL-18 Antikörper (rot). In der Übersicht (A) sowie in B und C ist ein normales IL-18 Färbemuster zu

erkennen. Es sind deutlich einzelne gefärbte Zellen in Bereichen des distalen Konvolutes, des Verbindungstubulus (CNT) und in Sammelrohrabschnitten zu erkennen, was in der Detailaufnahme (D) sichtbar wird. Es sind mäßig ausgebildete, diffuse interstitielle Infiltrate zu erkennen, bei denen kaum gefärbte infiltrierende Zellen vorliegen. Bereiche mit Infiltraten sind exemplarisch durch „\*“ markiert (A,C,D). Proximale Tubuli (PT) und Glomeruli (Glom) (beide exemplarisch in D gekennzeichnet) sowie Blutgefäße (Pfeil in C) sind IL-18 negativ. Es sind die für ATN typischen krankhaft aufgeweitete Tubuli (Pfeil in D) und die geschädigte Morphologie von proximalen Tubuli (PT in D) zu erkennen.

### **3.3.4.2 Zelluläre Abstoßung**

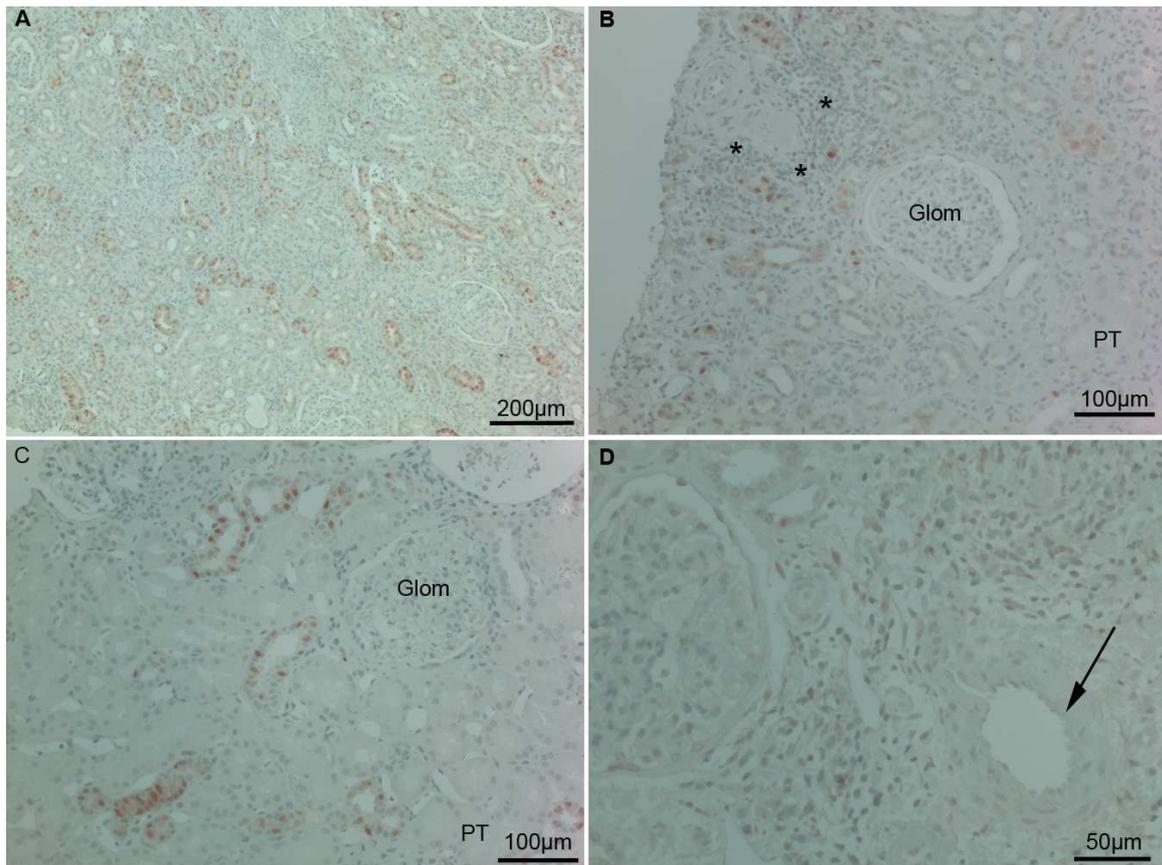
Wie in der gesunden Niere waren bei den Biopsien mit der Diagnose einer zellulären Abstoßung die typischen Zellen in Abschnitten des distalen Tubulus und der Sammelrohre IL-18 positiv gefärbt. Es lagen meist diffuse Infiltrate vor, in denen sich vereinzelt IL-18 positiv gefärbte Zellen zeigten (Abb 3.3.4.2.1 B). Interstitielle Infiltrate waren häufig auf Tubulusbereiche ausgeweitet. Teilweise waren IL-18 positiv gefärbte infiltrierende Zellen nicht von positiv gefärbten Zellen zugrunde gegangener Tubulusabschnitte zu unterscheiden. Es waren insgesamt deutlich mehr infiltrierende Zellen vorhanden als bei ATN und mehr infiltrierende Zellen als bei chronischer Abstoßung vorzufinden. Glomeruli, proximaler Tubulus und Gefäße waren IL-18 negativ.



**Abbildung 3.3.4.2.1: Bild einer zellulären Abstoßung.** Immunhistochemische Färbung mit einem monoklonalen IL-18 Antikörper (rot). IL-18 ist in einzelnen Zellen von Abschnitten des distalen Tubulus und des Sammelrohres positiv gefärbt (A, C). Es liegen meist diffuse interstitielle Infiltrate vor, die vereinzelt IL-18 positive Zellen zeigen („\*“ in A, B, C, D). B, kreisförmige Markierung: Eine Unterscheidung IL-18 positiver infiltrierender Zellen von positiven Zellen zugrundegegangener Tubuli ist schwierig. C,D (hohe Auflösung): Glomeruli (Glom) und Proximale Tubuluszellen (PT) sowie Zellen von Blutgefäßen (C, Pfeil) sind negativ.

### 3.3.4.3 Vaskuläre Abstoßung

Die Färbungen der Biopsien mit vaskulärer Abstoßung zeigten wie bei der gesunden Niere eine IL-18 Färbung in Bereichen der distalen Tubuli und in Abschnitten des Sammelrohres. Es waren diffuse und herdförmige Infiltrate mit vereinzelt IL-18 positiven Zellen zu erkennen. Gefäße waren häufig von herdförmigen Infiltraten umgeben. Zellen der Glomeruli, des proximalen Tubulus und der Gefäße waren IL-18 negativ.

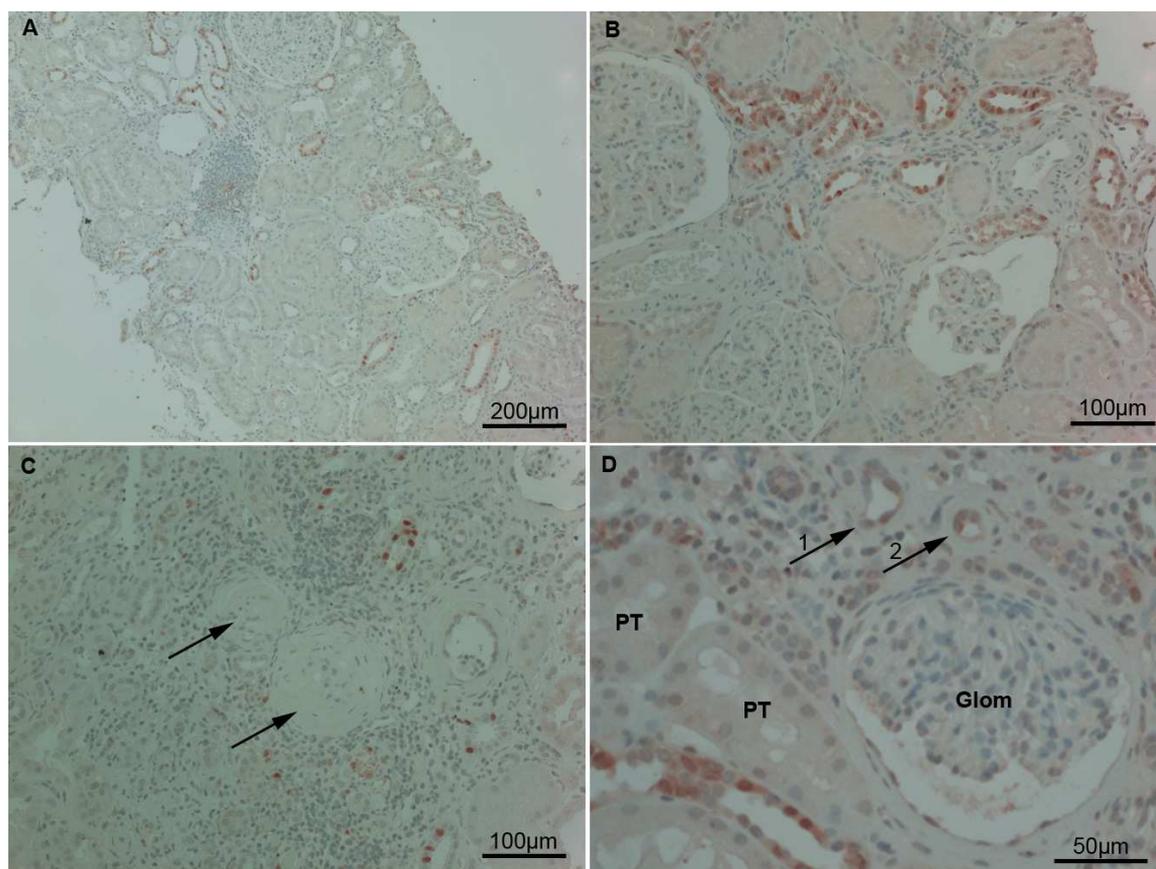


**Abbildung 3.3.4.3.1: Bild einer vaskulären Abstoßung.** Immunhistochemische Färbung mit einem monoklonalen IL-18 Antikörper (rot). Normales, typisches Färbemuster in Zellen der distalen Tubuli (DCT, CNT) und der Sammelrohrabschnitte (A, C). Infiltrate teils diffus im Interstitium (in gesamt A) und herdförmig. B: herdförmige Infiltrate umgeben Blutgefäße („\*“ in B). Glomeruli und proximale Tubuli (C, D(Detailansicht)) sowie Blutgefäße (Pfeil in D) sind negativ.

### 3.3.4.4 Chronische Allograft Neohropathie

In den Biopsien mit der Diagnose „chronische Allograftnephropathie“ (CAN) waren ebenso wie in der gesunden Niere die typischen Bereiche von distalen Tubuli und Sammelrohrabschnitten IL-18 positiv gefärbt. Die Biopsien waren unterschiedlich stark von herdförmigen und diffusen Infiltraten durchsetzt. Obwohl die infiltrierenden Zellen überwiegend IL-18 negativ waren, ließen sich in dichten, herdförmigen Infiltraten häufig IL-18 positive Färbungen erkennen. Es ließ sich hier allerdings nicht eindeutig der Zelltyp zuordnen, da es sich hierbei sowohl um positiv gefärbte Schaltzellen zugrunde gegangener Tubulusabschnitte, als auch um infiltrierende Zellen handeln könnte (s. auch Abb. 3.3.4.4.1 C). Glomeruli und

proximaler Tubulus zeigten keine eindeutig positive Färbung. Im Gegensatz zu den Biopsiefärbungen bei den anderen Diagnosen waren die Intimazellen von kleinen, arteriellen Blutgefäßen (Arteriolen) häufig IL-18 positiv gefärbt (Abb. 3.3.4.4.1 D). Atrophisierte, peritubulär fibrosierte distale Tubuli können bei CAN mit hyperplasierten Arteriolen verwechselt werden. Eine Quantifizierung der Arteriolen mit IL-18 positiv gefärbter Intima ist daher schwierig (Abbildung 3.3.4.4.1 D).



**Abbildung 3.3.4.4.1: Bild einer CAN.** Immunhistochemische Färbung mit einem monoklonalen IL-18 Antikörper (rot). Es zeigt sich ein normales Färbemuster mit typisch gefärbten Zellen von Abschnitten des distalen Tubulus und von Sammelrohren (A, B). Es sind mäßig starke, z.T. herdförmige interstitielle Infiltrate zu erkennen (B, C) mit selten und vereinzelt positiv gefärbten infiltrierenden Zellen. Glomeruli und Proximale Tubuli sind IL-18 negativ. C: Obliterierte und fibrotisch veränderte große Blutgefäße, die IL-18 negativ sind (Pfeile). D (Detailansicht): Pfeil 1 zeigt einen leicht atrophierten distalen Tubulusquerschnitt. Pfeil 2 zeigt ein typischerweise kreisrundes kleineres Blutgefäß mit einer für chronische Abstoßung typischen Intimahyperplasie (Differentialdiagnose zu Schaden verursacht durch toxische Substanzen oder Hypertension) Die Intima ist hier IL-18 positiv gefärbt.



## 4 Diskussion

### 4.1 Lokalisation des IL-18 in der Niere

In verschiedenen Studien wurde eine Beteiligung des IL-18 bei entzündlichen Nierenerkrankungen und dem akuten Nierenversagen gezeigt. Bei Lupus Nephritis [Faust, J. et al. 2002], Anti-neutrophile zytoplasmatische Autoantikörper (ANCA) assoziierter Vaskulitis [Hewins, P. et al. 2006] und akuter Nierentransplantat-Abstoßungsreaktion [de Oliveira, J. G. et al. 2002; Striz, I. et al. 2005] wurde eine erhöhte IL-18 Expression im Nierengewebe beschrieben. Erhöhte IL-18 Werte im Urin konnten bei akuter Tubulusnekrose [Parikh, C. R. et al. 2004] und Minimal-Change Nephropathie [Matsumoto, K. et al. 2001] nachgewiesen werden. Der ursächliche Zusammenhang zwischen lokaler IL-18 Expression und dem Verlauf dieser Erkrankungen konnte bislang noch nicht gefunden werden. In Kontrollbiopsien von menschlichen Transplantatnieren, die keine immunologische Komplikation aufwiesen, wurde eine tubuläre Expression von IL-18 beschrieben, wobei keine genaueren Angaben über die zelluläre Lokalisation gemacht wurden [Striz, I. et al. 2005]. In der vorliegenden Arbeit sollte die genaue Lokalisation des IL-18 in der gesunden menschlichen Niere bestimmt werden. Dies sollte dazu dienen, eine Vorstellung über die physiologische Funktion von IL-18 in der Niere zu erlangen und weiterhin eine Grundlage für die Untersuchung einer möglichen Beteiligung von IL-18 an immunologischen Komplikationen nach Transplantation bilden.

Mittels Western Blot wurde nachgewiesen, dass IL-18 Protein in der gesunden menschlichen Niere vorkommt, durch den Nachweis der mRNA durch RT-PCR sowie *in situ*-Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass einzelne Zellen des Nierengewebes IL-18 exprimieren. Anhand von immunhistochemischen IL-18 Färbungen konnte morphologisch eine IL-18 Expression einzelner Zellen in Bereichen des distalen Tubulus und des Sammelrohres der Nierenrinde, des Nierenmarkes und des Markstrahles zugeordnet werden. Diese zeigten eine außerordentlich starke IL-18 Färbung. Da sich manche tubulären Bereiche durch eine morphologische Begutachtung nicht sicher differenzieren lassen, wurde die

genaue Lokalisation von IL-18 entlang des tubulären Systems durch Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen bestimmt. Dazu wurden Proteine ausgewählt, deren Lokalisation in der menschlichen Niere bekannt ist. Durch Doppelfärbungen spezifisch für diese Proteine und gleichzeitig für IL-18 konnten so Rückschlüsse auf die genaue Lokalisation von IL-18 im Nierengewebe gezogen werden. Calbindin-D28k (CaBP) wird in den segmentspezifischen Zellen des distalen Konvolutes, des Verbindungstubulus und des proximalen Abschnittes des Sammelrohres exprimiert, Aquaporin2 (AQP2) in den Hauptzellen des Sammelrohres [Biner, H. L. et al. 2002]. Eine Lokalisation des IL-18 im distalen Konvolut, im Verbindungstubulus und im Sammelrohr konnte durch nahezu vollständige Kolo­kalisierung mit CaBP gezeigt werden. In einem großen Teil der AQP2 positiven Zellen war ebenfalls IL-18 kolokalisiert, was darauf hinwies, dass IL-18 in einem großen Bereich von Sammelrohrabschnitten vorhanden ist. IL-18 war nicht mit Tamm-Horsfall Protein THP kolokalisiert, was bedeutet, dass IL-18 nicht im dicken aufsteigenden Ast der Henle'schen Schleife vorliegt [Ronco, P. et al. 1988]. Bei der Zuordnung der Lokalisation von IL-18 zu den Abschnitten der Nierenkanälchen fiel in Übersichtsbildern auf, dass es eine zahlenmäßige Häufung von IL-18 positiven Sammelrohr- bzw. Tubulusabschnitten im Übergangsbereich von äußerem zu innerem Markstreifen gab. In diesen Bereichen liegen nur intermediäre und distale Tubulusabschnitte sowie Sammelrohrabschnitte. Die gleichen Tubulus-/Sammelrohrabschnitte liegen im Außenstreifen, zusätzlich liegen dort noch weitere Tubulusabschnitte. Dass im äußeren Markstreifen zahlenmäßig weniger IL-18 positive Zellen zu erkennen sind als im Übergangsbereich zum inneren Markstreifen, ist durch die höhere Anzahl an gleichzeitig vorliegenden proximalen Tubuluszellen zu erklären. Diese sind IL-18 negativ und liegen im Außenstreifen sowie in Richtung Nierenrinde, im inneren Markstreifen sind sie jedoch nicht aufzufinden. Dadurch ist das Verhältnis von positiv zu negativ gefärbten Abschnitten im mikroskopischen Bild des Außenstreifens niedriger als im Übergangsbereich zum Innenstreifen. Die Abnahme der Anzahl an IL-18 positiven Zellen in Richtung Papille lässt sich durch die Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung mit AQP2 als Marker für das Sammelrohr erklären. Die Auswertung ergab, dass IL-18 nicht über das gesamte Sammelrohr exprimiert wird. Durch diese Ergebnisse lässt sich folgern, dass IL-18

verstärkt in proximalen Bereichen des Sammelrohres exprimiert wird, der zahlenmäßige Anteil an IL-18 positiv gefärbten Zellen des Sammelrohres nimmt offensichtlich nach distal, also in Richtung Papille, ab.

Mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie an Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen und Kernfärbungen konnte gezeigt werden, dass IL-18 diffus verteilt im Zytoplasma von Schaltzellen vorliegt. Es gibt drei verschiedene Subtypen der Schaltzellen, die sich in der subzellulären Expression von Anionenaustauschern und der subzellulären Expression der V-H<sup>+</sup>-ATPase unterscheiden. Durch Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen von IL-18 zusammen mit V-H<sup>+</sup>-ATPase konnte gezeigt werden, dass IL-18 in allen drei Subtypen der Schaltzellen, A-Typ, B-Typ und nicht-A, nicht B-Typ lokalisiert ist, da IL-18 in den V-H<sup>+</sup>-ATPase positiven Zellen mit apikaler sowie mit basolateraler Expression kolokalisiert war [Wall, S. M. 2005].

Auf der Suche nach Anhaltspunkten für eine physiologische Funktion des IL-18 in der Niere fällt auf, dass es in Zellen exprimiert wird, die das Nierenparenchym gegen den Harnraum hin abgrenzen. Daher könnte man vermuten, dass IL-18 an der Abwehr von aufsteigenden Harnwegsinfekten beteiligt ist. Da IL-18 im Menschen konstitutiv exprimiert wird und seine Freisetzung auf entsprechende Stimuli hin reguliert wird, ist es innerhalb von Minuten verfügbar [Mühl, H. et al. 2004]. Nach seiner Freisetzung kann IL-18 die Bildung von IL-8 in Zellen des Immunsystems [Puren, A. J. et al. 1998], aber auch in Epithelzellen [Krasna, E. et al. 2005], induzieren. Durch seine chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten [Baggiolini, M. et al. 1989] könnte in tubulären Bereichen freigesetztes IL-8 zur Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in das Gewebe führen. Auf diese Weise könnte IL-18 somit an der Abwehr von pathogenen Mikroorganismen beteiligt sein. Dass bestimmte renale Zellen an der Immunabwehr beteiligt sein können wurde bereits für proximale [Schoop, R. et al. 2004; Wahl, P. et al. 2002] und distale [Baer, P. C. et al. 2000] Tubuluszellen sowie für Mesangiumzellen [Lovett, D. H. et al. 1983] beschrieben. Für Zellen des Sammelrohres und im Speziellen für Schaltzellen existieren hierzu so gut wie keine Daten. Für eine Funktion des IL-18 als schneller und potenter Aktivator der Immunabwehr in diesem Bereich spricht die Expression von Toll-Like Rezeptor-4 (TLR)-4 im distalen Bereich des Nephrons [Samuelsson, P. et al. 2004]. TLR-4

gehören zu der Familie von Toll-Like Rezeptoren (TLR), von denen derzeit 11 Subtypen bekannt sind. TLR's sind Transmembranproteine und sind unter anderem mit der Erkennung von eindringenden Mikroorganismen wichtiger Bestandteil des angeborenen und erworbenen Immunsystems. TLR-4 werden in Leukozyten sowie in einer Vielzahl von Organsystemen exprimiert. Sie reagieren mit Bestandteilen der Zellwände Gram-negativer Bakterien („Lipopolysaccharide“ = LPS), worauf eine schnelle Immunantwort ausgelöst wird. Diese ist durch eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B und die Expression von IL-8 und TNF- $\alpha$  gekennzeichnet [Takeda, K. et al. 2005] und erinnert an die durch IL-18 ausgelöste zelluläre Antwort. Es konnte gezeigt werden, dass eine IL-18 Expression in Monozyten durch die Stimulation mit dem Toll-Like Liganden LPS ausgelöst werden kann [Mehta, V. B. et al. 2001], eine Koppelung der Aktivierung von IL-18 an entzündliche Stimuli, wie eine Reaktion von LPS mit TLR-4, wird diskutiert [Bachmann, M. et al. 2006; Hentze, H. et al. 2003]. Im Falle von aufsteigenden Harnwegsinfekten könnten die Bestandteile der Bakterienzellwände, wie LPS, über die Stimulierung von TLR-4 eine Aktivierung von IL-18 und somit eine Aktivierung der lokalen Abwehr auslösen.

IL-18 wird als 24 kDa große, inaktive Vorläuferform (pro-IL-18) gebildet, die intrazellulär gespeichert wird. Für die Aktivierung des IL-18 ist der purinerge Rezeptor P<sub>2X7</sub> sowie die Caspase-1 essentiell [Mühl, H. et al. 2003]. Der Nachweis von Caspase-1 und P<sub>2X7</sub> in den gleichen Tubulusabschnitten, in denen auch IL-18 exprimiert ist, zeigt, dass die Voraussetzungen für die Freisetzung von IL-18 in diesen Bereichen gegeben sind. IL-18 könnte daher eine aktive Rolle in der Immunabwehr spielen.

Für diese These spricht weiterhin, dass in den IL-18 positiven Bereichen des Nephrons große Mengen an Nf- $\kappa$ B vorlagen. Das Vorliegen von zytoplasmatischem Nf- $\kappa$ B spricht dafür, dass im Falle einer Aktivierung in diesem Gewebe proentzündliche Botenstoffe exprimiert werden können. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B ist unter anderem ein Downstreamprozess der IL-18 Signaltransduktion [Mühl, H. et al. 2004]. Die Färbungen zeigten keine Lokalisation der Untereinheit p65 des Nf- $\kappa$ B im Zellkern. Somit konnte festgestellt werden, dass kein entzündlicher Zustand in diesen Bereichen des Nephrons vorlag und die Lokalisation von IL-18 in diesen Nierenbereichen nicht auf einen entzündlichen

Prozess zurückzuführen ist. Hätte ein entzündlicher Prozess vorgelegen, hätte es durch die Aktivierung von Nf- $\kappa$ B zu einer nukleären Lokalisation von der Untereinheit p65 kommen müssen.

Die Lokalisation des IL-18 in der Niere und die Beschränkung seiner Expression auf die Schaltzellen sind bemerkenswert. Es kann nur spekuliert werden, ob IL-18 eine über die Rolle in der Immunabwehr hinausgehende Funktion in diesen Zellen hat. Da diese Zellen an der Regulation des Säure/Basen-Haushaltes beteiligt sind [Wall, S. M. 2005], wäre es denkbar, dass IL-18 auch hierbei eine Funktion ausübt. Hierzu sind bislang keine Daten veröffentlicht, es wäre jedoch interessant anhand von IL-18 knock out (k.o.) Mäusen Untersuchungen diesbezüglich vorzunehmen. Da die Schaltzellen für eine Exkretion und Aufnahme von Protonen und  $\text{HCO}_3^-$ -Ionen zuständig sind, könnte sich, sofern IL-18 eine funktionelle Rolle hierbei spielt, ein Fehlen von IL-18 in diesen Tieren durch Änderungen des Blut pH-Wertes zeigen. Die Schaltzellen sorgen weiterhin für ein Gleichgewicht von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$ -Ionen. Eine funktionelle Rolle von IL-18 bei diesem Vorgang vorausgesetzt, könnte sich ein Fehlen von IL-18 durch einen im Vergleich zu Wildtypmäusen veränderten Blutdruck zeigen. Es konnte bereits in Tierversuchen gezeigt werden, dass sich ein Fehlen des in den Schaltzellen exprimierten  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Anionentauscherproteins Pendrin unter bestimmten metabolischen Umständen auf den Blut pH-Wert und Blutdruck auswirkte. Pendrin-k.o. Mäuse hatten unter metabolischen Umständen, die eine Pendrinexpression in normalen Tieren induzieren (NaCl arme Kost und Gabe von Aldosteron-Analoga), einen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen höheren Blut pH-Wert sowie ein niedrigeres Blutvolumen und einen niedrigeren Blutdruck. Die fehlende Möglichkeit zur Aufnahme von  $\text{Cl}^-$ , wodurch es normalerweise zu einer Erhöhung des vaskulären Volumens kommt, wurde für die Blutdruckerniedrigung verantwortlich gemacht, die Unfähigkeit zur  $\text{HCO}_3^-$ -Exkretion für den höheren pH-Wert des Blutes [Verlander, J. W. et al. 2003; Wall, S. M. et al. 2004].

Da es Hinweise auf eine mögliche *de novo* Expression von IL-18 in der Niere gibt, ist es denkbar, dass das in der gesunden menschlichen Niere vorliegende IL-18 für eine erste Immunabwehr zur Verfügung steht und es in entzündlichen Stadien zu einer *de novo* Expression von IL-18 in anderen Abschnitten des Nephrons kommt. Striz et al. beobachteten bei immunhistochemischen Färbungen an

Transplantatnieren, die einer Abstoßungsreaktion unterlagen, eine IL-18 Färbung in Zellen des proximalen Tubulus, der Glomeruli und von Blutgefäßen [Striz, I. et al. 2005]. Im Laufe der vorliegenden Arbeit sollte einer *de novo* Expression von IL-18 in Bereichen von Transplantat-Nieren bei verschiedenen immunologischen Komplikationen nach Transplantation nachgegangen werden. Da die zuvor diskutierten Ergebnisse auf eine lokale Funktion von IL-18 in der Niere bei immunologischen Vorgängen schließen lassen, sollte im Folgenden außerdem geprüft werden, ob sich Unterschiede in IL-18 Promotorgenpolymorphismen auf die Entstehung von Komplikationen, wie DGF oder Abstoßungsreaktionen, nach Nierentransplantation auswirken können.

#### **4.2 Einfluss von IL-18 Promotorgenpolymorphismen auf die Entwicklung einer verzögerten Nierentransplantatfunktion**

Die verzögerte Nierentransplantatfunktion, auch „Delayed Graft Function“ (DGF) genannt, ist eine spezielle Form von akutem Nierenversagen (ANV), die in der frühen postoperativen Phase nach Nierentransplantation auftritt. DGF ist durch eine akute Tubulusnekrose (ATN) gekennzeichnet, die durch Ischämie/Reperfusion (I/R)-Schäden verursacht wird und sich in einer eingeschränkten Nierenfunktion äußert. Eine DGF führt zu einer gesteigerten Immunogenität des Transplantats und erhöht somit das Risiko, eine akute Abstoßungsreaktion zu erleiden. Dadurch fördert eine initial erlittene DGF das spätere Entstehen einer chronischen Allograft Nephropathie (CAN) und beeinflusst somit das Transplantat Langzeitüberleben negativ [Perico, N. et al. 2004]. Hinweise darauf, dass IL-18 ursächlich an der Entstehung von DGF beteiligt ist, kommen aus Tierversuchsdaten. In einem ANV-Modell an Caspase-1 k.o. Mäusen wurde gezeigt, dass diese Mäuse, bedingt durch den Mangel an Caspase-1, nicht in der Lage waren aktives IL-1 $\beta$  und IL-18 zu bilden [Melnikov, V. Y. et al. 2001]. In diesem Modell wurde das ANV ausgelöst, indem die Blutgefäße beider Nieren für 22 Minuten abgeklemmt wurden. Der dadurch bedingte ischämische Schaden äußerte sich in einem Anstieg des Serumkreatinins nach 24 Stunden und in einer prominenten Infiltration durch neutrophile Granulozyten. Im Gegensatz zu den

Wildtyp-Mäusen waren bei den Caspase-1 k.o. Mäusen diese I/R-Schäden deutlich geringer ausgeprägt. Ein kausaler Zusammenhang zwischen einer Aktivierung von IL-18 und dem Entstehen der obengenannten Schäden konnte gezeigt werden, da Wildtyp-Mäuse, denen vor Induktion der Ischämie ein IL-18 Antikörper injiziert wurde, eine deutlich bessere Nierenfunktion und eine geringere Infiltration von neutrophilen Granulozyten zeigten. Die Höhe der IL-18 Expression im Transplantatgewebe scheint direkt mit der Dauer der Ischämie vor einer Transplantation zu korrelieren. Dies wurde bei der Messung von verschiedenen Zytokinen im Transplantatgewebe im Verlaufe von Lungentransplantationen an Menschen festgestellt. Es zeigte sich, dass zwar TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-10, IL-12 und IL-18 während der Ischämiephase vor Transplantation stark erhöht waren, jedoch korrelierten einzig die IL-18 Spiegel mit der Dauer der Ischämie [de Perrot, M. et al. 2002]. Eine durch lange Ischämiezeiten größere freigesetzte Menge an IL-18 könnte also das Ausmaß von I/R-Schäden verschlimmern. Interessanterweise werden aufgrund einer genetischen Prädisposition verursachte Unterschiede in der IL-18 Expression diskutiert, den Verlauf von verschiedenen Erkrankungen beeinflussen zu können. So werden die beiden IL-18 Promotor SNP's -607C/A und -137G/C in Zusammenhang gebracht mit der Entstehung oder dem Schweregrad von unter anderem Typ 1 Diabetes [Boraska, V. et al. 2006; Dong, G. P. et al. 2007; Kretowski, A. et al. 2002; Mojtahedi, Z. et al. 2006], Asthma bronchiale [Pawlik, A. et al. 2007], rheumatoider Arthritis [Gracie, J. A. et al. 2005; Pawlik, A. et al. 2006; Sivalingam, S. P. et al. 2003], jugendlicher idiopathischer Arthritis [Sugiura, T. et al. 2006], systemischem Lupus erythematodes [Lin, Y. J. et al. 2007; Xu, Q. et al. 2007], Prostatacarcinom [Liu, Y. et al. 2007], posttraumatischer Sepsis [Stassen, N. A. et al. 2003], Heuschnupfen [Lee, H. M. et al. 2006], GVHD (Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion) [Cardoso, S. M. et al. 2004], chronischer Hepatitis B Virus Infektion [Hirankarn, N. et al. 2007; Zhang, P. A. et al. 2005], Behcet-Krankheit [Jang, W. C. et al. 2005; Lee, Y. J. et al. 2006] und Alzheimer-Krankheit [Bossu, P. et al. 2007]. Generell wird eine krankheitsfördernde Funktion des IL-18 bei Autoimmunerkrankungen sowie bei allergischen Erkrankungen diskutiert. Eine protektive Funktion wird dem IL-18 in Bezug auf Virusinfektionen oder bei der Entstehung von Krebserkrankungen zuerkannt. Dies beruht auf seiner Eigenschaft, die Bildung von IFN- $\gamma$ , das stark

antiviral und antiproliferativ wirkt, in T-Lymphozyten und NK-Zellen zu induzieren. Autoimmunreaktionen zeichnen sich durch eine überschießende Immunantwort gegen Autoantigene aus. Es wird allgemein vermutet, dass die Auslösung solcher Immunantworten meist durch infektiöse, traumatische oder stressreiche Ereignisse getriggert wird, genetische Unterschiede können förderlich sein. Da die verschiedenen Genotypen der IL-18 Promotor SNP's -607C/A und -137G/C mit dem Auftreten von Autoimmunerkrankungen assoziiert sind, stellte sich die Frage, ob sich die unterschiedlichen Genotypen auch auf das Entstehen einer DGF nach Nierentransplantation auswirken könnten. Eine lokale immunologische Funktion des IL-18 in der Niere kann aufgrund der Lokalisation in der gesunden menschlichen Niere vermutet werden. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, dass in renalen Zellen, die in der gesunden Niere kein IL-18 enthalten, im Rahmen von Abstoßungsreaktion IL-18 exprimiert wird [Striz, I. et al. 2005]. Diese Beobachtungen führten zu der Frage, ob Unterschiede in den Genotypen der IL-18 Promotor SNP's -607C/A und -137G/C des Organspenders die Entstehung einer DGF beeinflussen können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daraufhin eine Assoziationsstudie durchgeführt, in der die Genotypen der Empfänger und der Spender mit dem Auftreten von DGF korreliert wurden. In der untersuchten Gruppe zeigte sich, dass das C-Allel und der CC-Genotyp des SNP -137G/C signifikant mit einem erhöhten Risiko eine DGF zu entwickeln assoziiert war. Ein direkter Einfluss des SNP -607C/A auf die Ausbildung einer DGF konnte nicht nachgewiesen werden.

In einer vor kurzem veröffentlichten Studie wurde ein negativer Effekt einer erhöhten IL-18 Expression auf die Entwicklung von DGF postuliert. In dieser Studie von Kolesar et al., bei der ebenfalls ein Einfluss der IL-18 SNP's -607C/A und -137G/C auf die Entstehung von DGF nach allogener Nierentransplantation untersucht wurde, war das C-Allel des SNP -607C/A signifikant mit einem erhöhten Risiko eine DGF zu entwickeln assoziiert [Kolesar, L. et al. 2007]. Ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnten andere Klassifikationen für DGF sein. In der genannten Studie zeigten über 45 % der Empfänger eine DGF, während in unserem Patientenkollektiv nur 38 % betroffen waren. Weitere klinische Daten die einen Eindruck über die Prognose des Transplantationsverlaufes bzw. über das outcome der Patienten vermitteln, wurden von Kolesar et

al. nicht angegeben. Die Kriterien zur Eingruppierung der Patienten in die Gruppen mit DGF bzw. mit sofortigem Funktionsbeginn jedoch schienen in der im Rahmen der hier präsentierten Studie adäquat zu sein, da sich die Serumkreatininwerte 4 Wochen nach Transplantation zwischen der Gruppe mit sofortigem Nierenfunktionsbeginn und der Gruppe mit DGF hoch signifikant unterschieden und in der Gruppe mit sofortigem Funktionsbeginn besser waren. Diese gelten als verlässlicher Marker für das outcome der Transplantatnieren. Ein weiterer Grund für die abweichenden Ergebnisse können auch die unterschiedlichen Patientpopulationen sein. In der Studie von Kolesar et al. wurde keine Aussage über die Ethnizitäten gemacht, während die Empfänger der im Rahmen der von uns untersuchten Studiengruppe alle Kaukasier waren.

Obwohl in der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Gruppe keine direkte Assoziation zwischen dem SNP -607C/A und der Entwicklung von DGF gefunden wurde, zeigte sich ein Einfluss dieses SNP in der Betrachtung der kombinierten Genotypen und in der Haplotypenanalyse. Der kombinierte Genotyp -607CA/-137CC des Empfängers korrelierte signifikant mit dem Auftreten einer DGF. Dieser kombinierte Genotyp ist repräsentativ für eine Verschiebung in Richtung A-Allel beim SNP -607, da die Häufigkeit des Auftretens des AA homozygoten Genotyps mit 7% sehr gering ist. Die Prävalenz des -607A- und des -137C-Allels für eine DGF spiegelt sich in der Haplotypenanalyse wider. Diese ergab, dass der rekonstruierte Haplotyp -607A/-137C häufiger in der Gruppe mit DGF vorkam. Der Haplotyp -607C/-137G war der einzige rekonstruierte Haplotyp, der mit einer sofortigen Transplantatfunktion korreliert war. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine hohe IL-18 Expression in Nierentransplantatempfängern mit einem verringerten Risiko eine DGF zu erleiden assoziiert ist, da eine leicht (nicht signifikant) erhöhte IL-18 Expression bei dem Genotypen -607CC/-137GG im Vergleich zu den anderen Genotypen beschrieben wurde [Giedraitis, V. et al. 2001]. Diese Feststellung widerspricht der Hypothese, dass IL-18 einen schädlichen Einfluss auf die Ausbildung von DGF ausübt. Erklären ließen sich diese unerwarteten Ergebnisse durch Desensibilisierungsprozesse während einer Langzeitexposition von hohen IL-18 Serumspiegeln. Über Desensibilisierungsprozesse in der IL-18 Signalkaskade ist zwar bisher sehr wenig bekannt, aber Studien über das eng verwandte IL-1 zeigten, dass eine Antwort auf

intradermal verabreichtes IL-1 in Hasen schwächer ausfiel, wenn schon vorher hohe Dosen IL-1 verabreicht wurden. Die Antwort, gemessen an dem Ausmaß der Infiltration von neutrophilen Granulozyten, fiel vergleichsweise stärker aus, wenn die Hasen vorher nicht mit IL-1 desensibilisiert wurden [Cybulsky, M. I. et al. 1988]. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass Menschen, die aufgrund ihrer genetischen Ausstattung dauerhaft höheren IL-18 Serumspiegeln ausgesetzt sind, möglicherweise weniger stark auf IL-18 Stimuli reagieren. Der dem IL-18 Rezeptor nachgeschaltete Signaltransduktionsweg deckt sich mit dem anderer Rezeptoren der IL-1 Rezeptor/Toll-Like Rezeptor-Superfamilie. Diese Signaltransduktionskaskade beinhaltet die Aktivierung der IL-1 Rezeptor assoziierten Kinase (IRAK) und führt schließlich zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B [Bowie, A. et al. 2000; Dunne, A. et al. 2003]. Es wäre denkbar, dass die durch dauerhaft erhöhte IL-18 Expression ausgelösten Desensibilisierungsprozesse ebenfalls die Immunantwort anderer Zytokine beeinflussen. Mitglieder der IL-1 Familie, die ihr Signal über ähnliche Signaltransduktionswege wie IL-18 vermitteln, könnten so ebenfalls eine verminderte Antwort auf ihren Stimulus erfahren. Diese Hypothese ist jedoch hochspekulativ und bedarf der experimentellen Überprüfung.

Im Gegensatz zu der Hypothese, dass es sich bei dem G-Genotyp des SNP -137G/C um den hochexprimierenden Genotypen handelt, steht die Theorie, dass es durch die Mutation des Wildtypen zu einer erhöhten Expression kommen könnte. Bei Mutationsanalysen wurde festgestellt, dass durch die Änderung des G zum C an SNP -137 eine Bindungsstelle des nukleären Histon 4 Transkriptions Faktor-1 (H4TF-1) zerstört wird, dafür aber eine neue Bindungsstelle für einen unbekanntes Faktor, der im Promotor des Granulozyten-/Makrophagenstimulierenden Faktor (GM-CSF) gefunden wurde, generiert wird [Giedraitis, V. et al. 2001]. In einigen Assoziationsstudien wurde diese Theorie diskutiert und angenommen, dass es durch diese Mutation zur erhöhten IL-18 Expression kommt. Würde man diese Theorie ebenfalls zugrunde legen, würde sich eine Erklärung ergeben, welche für eine direkte schädliche Funktion des IL-18 spräche, da sich in den erhaltenen Ergebnissen eine Assoziation zwischen dem -137CC Genotyp bzw. dem C-Allel und dem Auftreten einer DGF zeigte. Der Einfluss, den die verschiedenen Genotypen der IL-18 SNP's -607C/A und -137G/C auf IL-18 Serumspiegel haben, ist derzeit immer noch unklar und wird kontrovers diskutiert.

Im Rahmen einer Studie mit an systemischem Lupus erythematoses erkrankten Patienten, wurde in unserer Arbeitsgruppe die Auswirkung der verschiedenen Genotypen der IL-18 SNP's -607C/A und -137G/C auf IL-18 Serumspiegel untersucht. Unter möglichst standardisierten Bedingungen wurde bei 67 Patienten Plasma gewonnen und die IL-18 Spiegel gemessen. Es zeigten sich keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den mittleren IL-18 Plasmaspiegeln, wobei die Werte der einzelnen Individuen innerhalb der Gruppen mit relativen Standardabweichungen von bis zu 105 % stark streuten. Die Expression von Zytokinen ist von vielerlei Einflüssen abhängig. Um genaue Hinweise auf die Auswirkungen der Genotypen auf IL-18 Serumspiegel zu erlangen, ist es notwendig groß angelegte Studien durchzuführen, in denen die Serumspiegel über längere Zeit gemessen werden, um intraindividuelle Schwankungen zu berücksichtigen. Einzelwerte sind durch interindividuelle Unterschiede wenig aussagekräftig und schlecht zu vergleichen. Weiterhin wäre es wichtig die Auswirkung des IL-18 Bindeproteins (IL-18BP) auf die Entwicklung von DGF zu untersuchen. Das IL-18BP kommt natürlicherweise im Menschen vor und neutralisiert IL-18. Die Relevanz des IL-18BP wurde kürzlich in einer Studie beschrieben, in der Zusammenhänge von IL-18BP SNP's und IL-18 SNP's mit der Entwicklung der koronaren Herzkrankheit dargestellt wurden [Thompson, S. R. et al. 2007].

Unter der Annahme, dass diese Polymorphismen tatsächlich die Menge des freigesetzten IL-18 beeinflussen, sollte überprüft werden, ob sich aus der Analyse der Spendergenotypen Rückschlüsse auf eine Beteiligung des lokal gebildeten IL-18 an einer Entstehung von DGF ziehen lassen. Hinweise auf die Beteiligung von renal gebildetem IL-18 an der Entstehung oder dem Verlauf einer DGF kommen aus der Beobachtung, dass nierentransplantierte Patienten mit DGF erhöhte IL-18 Spiegel im Urin aufwiesen [Parikh, C. R. et al. 2006]. Der Grund für das Auftreten des IL-18 im Urin blieb allerdings ungeklärt. Es könnte zum einen aus Nierenzellen stammen. Dies wurde angenommen, nachdem gezeigt wurde, dass während eines experimentellen, ischämischen akuten Nierenversagens in Mäusen durch Caspase-1 aktiviertes IL-18 aus den tubulären Zellen freigesetzt wird und eine Infiltration von neutrophilen Granulozyten in das Interstitium vermittelt wird [Melnikov, V. Y. et al. 2001]. Für diese Theorie würden die

beobachteten Trends bei den Spender-Genotypen sprechen, die andeuteten, dass der CC-Genotyp und das C-Allel des SNP -137G/C des Spenders häufiger in der Gruppe mit DGF zu finden war. Obwohl diese Daten nicht signifikant waren, sprechen sie aufgrund der zu den Empfängern ähnlichen Verteilung für eine Beteiligung von lokal exprimiertem IL-18 an DGF. Zum anderen könnte das IL-18 aus zirkulierenden Immunzellen stammen. Das vermehrte Vorkommen im Urin könnte durch eine erhöhte Primärfiltration aus den geschädigten Glomeruli hervorgerufen werden oder auf einer verminderten Resorptionsfähigkeit der geschädigten Tubuluszellen begründet sein oder auch aus geschädigten Sammelrohrzellen freigesetzt werden. Erhöhte IL-18 Urinwerte könnten ebenfalls durch eine vermehrte Freisetzung aus infiltrierenden Empfänger-Makrophagen herrühren. In allen Fällen könnte jedoch erhöhtes IL-18 die Ausbildung eines akuten Nierenversagens begünstigen und der Nachweis im Urin auf einen Nierenschaden hinweisen.

Zusammen mit den gefundenen Assoziationen der Empfängergenotypen mit der Entstehung von DGF weist dieser Befund darauf hin, dass Unterschiede in der lokalen IL-18 Expression eine untergeordnete Rolle bei der Entwicklung einer DGF spielen und sich Unterschiede in der IL-18 Expression des Empfängers stärker auswirken. Allerdings konnten nur von knapp der Hälfte der transplantierten Patienten Blut von den zugehörigen Spendern für die Polymorphismenbestimmung erhalten werden. So ist nicht auszuschließen, dass durch die niedrigere Fallzahl signifikante Assoziationen der Spendergenotypen mit dem Entstehen einer DGF unerkannt geblieben sind.

Im Rahmen einer Qualitätskontrolle wurde das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) berechnet. Das HWE dient als Qualitätsmerkmal für die Auswahl einer Studienpopulation und beschreibt das gleichbleibende Allel/Genotypenverhältnis innerhalb einer Idealpopulation [Hosking, L. et al. 2004]. Abweichungen vom HWE können ein Hinweis auf eine fehlerhafte Typisierung oder eine nicht zufällig ausgewählte Studienpopulation sein, können aber auch durch Selektionsdruck oder Migration, oder das Auftreten von Erkrankungen innerhalb einer Studienpopulation herrühren [Balding, D. J. 2006]. Abweichungen vom HWE im Falle der IL-18 SNP's werden häufig berichtet und große Schwankungen zwischen unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen sind bekannt. Diskutiert werden

hier Selektionsprozesse und Migrationen. Abweichungen vom HWE wurden in der vorliegenden Arbeit in der Spendergruppe und in der Kontrollgruppe erkannt. Da die Empfängergruppe mit beiden SNP's im HWE lag, können Typisierungsfehler ausgeschlossen werden. Die Spendergruppe wich vom HWE im Falle des SNP -607C/A ab, die Kontrollgruppe wich bei beiden SNP's vom HWE ab. Unterschiede lassen sich durch die verschiedenen Populationen erklären. Die Verteilung der Genotypen der SNP's -607C/A und -137G/C der Empfängergruppe unterschied sich signifikant von der Verteilung der Genotypen in der gesunden Kontrollgruppe. Obwohl es sich bei der Kontrollgruppe ausschließlich um Menschen kaukasischer Abstammung handelte, ist nichts über die räumliche Herkunft dieser Menschen bekannt. So können sich bei der Kontrollgruppe Migrationsprozesse bemerkbar machen, die zu der Bildung einer Mischpopulation geführt haben könnten.

Die Verteilungen der Genotypen in der Empfängergruppe unterschieden sich nicht signifikant von denen der Spendergruppe. Möglicherweise bestand in den beiden Gruppen eine ähnliche Selektion. Genotypen, die einen Einfluss auf die Entwicklung bzw. den Verlauf von Nierenerkrankungen haben, könnten eine Auswirkung auf die Entstehung von anderen Erkrankungen haben. Eine Beteiligung von IL-18 an kardiovaskulären Erkrankungen wurde bereits diskutiert [Ohsuzu, F. 2004]. Ein Einfluss der IL-18 SNP's auf die Todesursache von Organ Spendern wäre ebenfalls denkbar.

### **4.3 Einfluss von IL-18 Promotorgenpolymorphismen auf die Entstehung von Transplantat-Abstoßungsreaktionen**

Akute Transplantat-Abstoßungsreaktionen treten in ca. 30% der Fälle in den ersten Tagen bis Monaten nach Transplantation auf. Das Auftreten von akuten Abstoßungsreaktionen hat eine massive Auswirkung auf die Entstehung von chronischen Abstoßungen und der chronischen Allograft Nephropathie. Akute und chronische Abstoßungen sind die Hauptfaktoren, die ein Langzeit-Transplantat-überleben negativ beeinflussen. Schlüsselereignis einer akuten Abstoßungsreaktion ist eine T-Zell Aktivierung. Da IL-18 maßgeblich an der Aktivierung von T-

Zellen und der Steuerung des Gleichgewichtes zwischen Th1- und Th2-Immunantwort beteiligt ist [Nakanishi, K. et al. 2001], wird seine Bedeutung bei akuten Abstoßungsreaktionen diskutiert. Weitere durch IL-18 vermittelte Effekte, die akute Abstoßungsreaktionen beeinflussen können, sind die Steuerung von B-Zell- und Makrophagenaktivität, die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) und die Expression von vaskulären Adhäsionsfaktoren und Wachstumsfaktor GM-CSF [Dinarello, C. A. 2000; McInnes, I. B. et al. 2000], sowie eine MHC Klasse-I und -II Expression über die Induktion von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  [Daemen, M. A. et al. 1999]. Ein Zusammenhang von IL-18 mit akuten Abstoßungsreaktionen konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden. Striz et al. beobachteten signifikant erhöhte IL-18 Serumspiegel bei nierentransplantierten Patienten mit einer akuten Abstoßungsreaktion im Vergleich zu Patienten ohne Abstoßungsreaktion oder mit akuter Tubulusnekrose [Striz, I. et al. 2005]. In Biopsien von Transplantatnieren korrelierte der IL-18 mRNA Gehalt positiv und signifikant mit dem Auftreten von akuten Abstoßungsreaktionen [de Oliveira, J. G. et al. 2002]. Im Rahmen einer Assoziationsstudie wurde überprüft, ob sich unterschiedliche Genotypen der IL-18 SNP's -607C/A und -137G/C auf das Entstehen einer akuten Nierentransplantat-Abstoßungsreaktion beim Menschen auswirken. Es ist wenig über den Zusammenhang zwischen den IL-18 SNP's -607C/A und -137G/C und dem outcome nach Organtransplantation bekannt und eine Auswirkung auf Abstoßungsreaktionen wurde bislang nicht beschrieben. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Assoziationsstudie zeigte keinerlei signifikante Assoziationen zwischen den verschiedenen Genotypen der Empfänger oder Spender und einem Auftreten von akuten Abstoßungsreaktionen.

Die immunologischen Voraussetzungen, die zu einer akuten Abstoßungsreaktion prädisponieren, waren in den Gruppen mit bzw. ohne Abstoßung gleich, da sich beide Gruppen bezüglich Anzahl der Mismatche und Vorhandensein von Anti-Leukozytenantikörpern nicht signifikant voneinander unterschieden. Eine erhöhte Inzidenz zur akuten Abstoßung aufgrund einer vorausgegangenen verzögerten Transplantatfunktion (DGF) lag ebenfalls nicht vor.

In letzter Zeit wird die Relevanz von subklinischen Abstoßungsreaktionen diskutiert. Diese Form der akuten, aber klinisch unauffälligen Abstoßungsreaktion scheint eine Auswirkung auf die Ausbildung chronischer Abstoßungen und damit

eine schlechte Langzeitprognose zu haben [Rush, D. N. et al. 1999]. Diese Formen der Abstoßungsreaktion sind nur durch Kontrollbiopsien zu erfassen. Da jeder invasive Eingriff nur nach sorgfältiger Risiko-Nutzen Abschätzung erfolgt, war es im Rahmen dieser Studie aus ethischen Gründen nicht möglich, Zahlen über das Vorliegen dieser Abstoßungsform zu erlangen. Möglicherweise weichen deshalb die tatsächlichen Zahlen über akute Abstoßungsreaktionen von den gefundenen Zahlen ab.

Die Gruppen mit bzw. ohne Abstoßungsreaktionen unterschieden sich signifikant in der Dauer der Ischämiezeiten, welche die Prävalenz eine Abstoßung zu erleiden maßgeblich beeinflussen. Die kalte Ischämiezeit war in der Gruppe mit Abstoßung im Durchschnitt länger als in der Gruppe ohne Abstoßungsreaktionen. Die warme Ischämiezeit war allerdings in der Gruppe ohne Abstoßungsreaktionen durchschnittlich länger, was untypisch ist, da eine lange warme Ischämiezeit das Auftreten von Abstoßungsreaktionen eher begünstigen sollte. Da es jedoch, wie weiter oben erwähnt, auch andere Faktoren gibt, die das Auftreten einer Abstoßungsreaktion beeinflussen können, besteht die Möglichkeit, dass der Einfluss anderer Faktoren überwogen hat und die Unterschiede in der warmen Ischämiezeit zufällig sind. Möglicherweise spiegelt sich hier jedoch eine Ungenauigkeit wider, die darauf zurückzuführen ist, dass subklinische Abstoßungsreaktionen unerkannt geblieben sind.

Nach Nierentransplantationsexperimenten an Mäusen wurde vermutet, dass die Auslösung von Abstoßungsreaktionen von IL-18 unabhängig ist [Simon, T. et al. 2004]. In dem Experiment erhielten IL-18 k.o. Mäuse sowie Wildtyp Mäuse Transplantatnieren von Mäusen, die in Bezug auf den MHC vollständig inkompatibel waren und somit ein hohes Risiko hatten abgestoßen zu werden. Eine Gruppe der Wildtypmäuse wurde mit einem IL-18 neutralisierenden IL-18 Bindeprotein (IL-18BP) behandelt. An den IL-18 k.o. Mäusen und an Wildtyp Mäusen die mit IL-18BP behandelt wurden, war 10 Tage nach Transplantation signifikant weniger mRNA von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und induzierbarer NO-Synthase (iNOS) in den Allotransplantaten nachweisbar. Allerdings wurde kein signifikanter Schutz vor der Entwicklung von Abstoßungsreaktionen im Vergleich zu mit IL-18BP unbehandelten Wildtypmäusen festgestellt. Es wurde diskutiert, dass IL-18 zwar in die immunologischen Prozesse bei einer Abstoßungsreaktion

involviert ist, deren Auslöser, nämlich die Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen, jedoch weitestgehend von IL-18 unabhängig ist. Da in den Allotransplantaten der IL-18 k.o. Mäuse im Vergleich zu den mit IL-18BP behandelten Wildtyp Mäusen signifikant mehr IL-4 mRNA und CD4 T-Zellen nachgewiesen wurde, wurde weiterhin diskutiert, dass es durch ein vollständiges Fehlen von IL-18 nicht zu einem Ausbleiben von Abstoßungsreaktionen kommt, sondern dass es zu der Entwicklung einer alternativen potenten Th2 Immunantwort gegen das Transplantat kommen könnte. Dies wäre über eine Verschiebung des Gleichgewichtes der Th1 Immunantwort in Richtung Th2 Immunantwort denkbar, wobei es zu einer vermehrten Bildung von Antikörpern kommen würde.

Nach den erhaltenen Ergebnissen der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studie scheinen Unterschiede in der IL-18 Expression keinen Einfluss auf die Auslösung von Abstoßungsreaktion zu haben. Die durch die untersuchten SNP's verursachte, unterschiedlich hohe Expression von IL-18 ist vermutlich nicht schwerwiegend genug, als dass sie sich auf die Initiierung einer Abstoßungsreaktion, die über eine spezifische Antigenerkennung durch T-Zellen verläuft, auswirken würde. Den Hinweisen, dass IL-18 an Abstoßungsreaktionen beteiligt sein könnte, sollte nachfolgend in Untersuchungen der Lokalisation von IL-18 in Transplantatbiopsien nachgegangen werden.

#### **4.4 IL-18 in Biopsien nach Nierentransplantation**

Durch die bei den Assoziationsstudien erhaltenen Ergebnisse, dass sich die Promotorpolymorphismen der Empfänger auf die Entwicklung einer DGF auswirken können, ließ sich vermuten, dass aus dem Empfängerorganismus stammendes IL-18 eine Funktion bei immunologischen Vorgängen im Transplantat haben kann. In der zuvor diskutierten Literatur gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von lokalem IL-18 an Abstoßungsreaktionen. Die Assoziationsstudien zeigten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen genetischen Unterschieden der IL-18 SNP's der Spender und der Entwicklung von DGF oder Abstoßungsreaktionen. Es besteht zum einen die Möglichkeit, dass die Auswirkung der genetischen Unterschiede auf die IL-18 Expression nicht groß genug ist, um sich

signifikant auf die Entstehung dieser Komplikationen auszuwirken. Zum anderen könnte die geringere Fallzahl der Spender dazu geführt haben, dass die Unterschiede unerkannt blieben. Es resultierte die Frage, ob nur aus dem Empfängerorganismus stammendes IL-18 an den immunologischen Vorgängen beteiligt ist, oder ob das im Spenderorgan lokalisierte IL-18 ebenfalls involviert ist. In menschlichen Nierentransplantatbiopsien konnte bei akuten Abstoßungsreaktionen signifikant mehr IL-18 mRNA nachgewiesen werden im Vergleich zum Gewebe aus Nierentransplantaten ohne Abstoßungsreaktion [de Oliveira, J. G. et al. 2002]. Dies spricht für eine erhöhte IL-18 Expression in der Niere bei Abstoßung, die genaue Quelle der IL-18 mRNA blieb jedoch unbekannt. Es ist denkbar, dass die erhöhte Expression von IL-18 auf infiltrierende Zellen zurückzuführen ist. Eine bedeutende Quelle von IL-18 im Menschen stellen Makrophagen dar, die auch Hauptbestandteil von infiltrierenden Zellen bei Transplantat-Abstoßungsreaktionen sind. Es wurde beschrieben, dass bei Transplantat-Abstoßungsreaktionen Makrophagen im Transplantat nach Hauttransplantation beim Menschen akkumulieren [BRENT, L. et al. 1959] und bei Nierentransplantationen an Ratten bei akuten Abstoßungsreaktionen im Transplantat proliferieren [Grau, V. et al. 1998].

An nierentransplantierten Ratten konnte gezeigt werden, dass das in den Nieren nachgewiesene IL-18 hauptsächlich aus infiltrierenden Makrophagen stammt und dass nach Depletion der Makrophagen durch liposomales Clodronat Abstoßungsreaktionen stark abgemildert werden. Es konnte signifikant weniger mRNA von IL-18, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und iNOS im Transplantat nachgewiesen werden im Vergleich zu den Ratten ohne Makrophagendepletion. So wurde den Makrophagen zum einen ein schädlicher Effekt bei Abstoßungsreaktionen zugesprochen, zum anderen wurde gezeigt, dass sie eine Quelle von IL-18 darstellen. Allerdings war in den Experimenten kein Unterschied in der T-Zell Aktivierung oder -Infiltration zu erkennen. In der gleichen Studie konnten durch Doppelfärbungen die Makrophagen als einzige infiltrierende Zellen identifiziert werden, die IL-18 enthielten. Bei dieser Studie blieb die Frage offen, wie es, obwohl die Makrophagen als Hauptquelle von IL-18 depletiert waren, zu einer Aktivierung und Infiltration von T-Zellen kommen konnte [Wyburn, K. et al. 2005].

Nach Ausschleusung von aktivem IL-18 aus den tubulären Schaltzellen könnte dieses IL-18 eine Infiltration von T- und B-Zellen sowie von Makrophagen veranlassen um die Immunantwort zu verstärken. Diese Annahme ergibt sich durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten IL-18 Färbungen an Biopsien der Diagnosen zelluläre und vaskuläre Abstoßung, CAN und ATN wobei je nach immunologischem Status Korrelationen von intrazellulären IL-18 Färbungen von Tubuluszellen und der Anzahl an infiltrierenden Zellen festgestellt wurden. Die Anzahl der infiltrierenden Zellen korrelierte mit dem Ausmaß der immunologischen Aktivität. Damit stimmten die erhaltenen Ergebnisse mit den in der Literatur beschriebenen Daten überein [Mengel, M. et al. 2007]. Bei den akuten Abstoßungen (vaskuläre und zelluläre Abstoßung) war die Gesamtzahl an infiltrierenden Zellen am höchsten. Bei CAN, welche eine chronische Abstoßungsform ist, war die Gesamtzahl an infiltrierenden Zellen niedriger. Gleichzeitig lagen bei CAN und bei vaskulärer Abstoßung deutlich geringere intrazelluläre Mengen an IL-18 in den Tubuluszellen vor, die intrazellulären IL-18 Konzentrationen der Schaltzellen waren bei zellulärer Abstoßung ebenfalls niedriger als bei gesunden Nieren und ATN, waren allerdings höher als bei vaskulärer Abstoßung und CAN. Möglicherweise war in den Tubuluszellen der zellulären Abstoßungen noch eine höhere IL-18 Konzentration im Vergleich zur CAN und vaskulärer Abstoßung „gespeichert“. Bei CAN sind diese Speicher aufgrund dauerhafter Aktivierung möglicherweise ausgeschöpfter als bei akuter zellulärer Abstoßung. Bei akuter vaskulärer Abstoßung könnten die Speicher aufgrund einer stärkeren Immunreaktion ausgeschöpfter sein. Möglicherweise besteht eine Funktion von in der Niere lokalisiertem IL-18 darin, über die Bildung chemotaktischer Zytokine und Adhäsionsmoleküle, zirkulierende Immunzellen in das Gewebe zu rekrutieren.

Insgesamt waren in Bezug auf die Gesamtzahl relativ wenige infiltrierende Zellen IL-18 positiv gefärbt. Aktivierte Makrophagen bilden konstitutiv IL-18 und schleusen dies nach einem Stimulus, beispielsweise durch IL-18, aus. Möglicherweise wurde bei den IL-18 Färbungen an den Biopsien nur ein geringer Teil von IL-18 freisetzenden infiltrierenden Zellen detektiert, da diese nach Stimulation IL-18 bereits freigesetzt hatten und die intrazelluläre Konzentration dadurch sehr gering war.

Es gibt Hinweise, dass bei Abstoßungsreaktionen außer Makrophagen und Tubuluszellen noch weitere Kompartimente der Niere IL-18 bilden können. Striz et al. beobachteten während Abstoßungsreaktionen IL-18 positive Färbungen an proximalen Tubuluszellen, Blutgefäßen, Mesangiumzellen und Podozyten in Biopsien von Transplantatnieren [Striz, I. et al. 2005]. Diese Beobachtungen sollten an einer größeren Anzahl von Biopsien überprüft und differenziert zu den Diagnosen ATN, CAN sowie zelluläre und vaskuläre Abstoßung ausgewertet werden. Bei den untersuchten Biopsien mit zellulärer und vaskulärer Abstoßung sowie mit ATN fanden sich keine signifikanten Unterschiede bei den Färbemustern im Vergleich zur gesunden Niere. Es waren morphologisch eindeutig einzelne Zellen von Sammelrohr- und distalen Tubulusabschnitten als IL-18 positiv gefärbt zu erkennen. Demnach entsprach das Färbebild dem der gesunden Niere. Eine signifikante *de novo* Expression von IL-18 in anderen Zellstrukturen, wie Bereichen der Glomeruli oder proximalen Tubuluszellen, ließ sich in unserer Studie nicht beobachten. Vereinzelt punktuelle positive Färbungen an Gefäß- oder proximalen Tubuluszellen sind unter Umständen durch die Durchsetzung mit infiltrierenden Zellen zu erklären. Die Infiltrate waren vereinzelt IL-18 positiv gefärbt, dies ließ sich ebenfalls auf IL-18 positive Färbungen in Makrophagen zurückführen. Diesbezüglich widersprechen unsere Ergebnisse den Daten von Striz et al. [Striz, I. et al. 2005]. Möglicherweise konnte die Arbeitsgruppe von Striz et al. die beschriebenen Färbungen beobachten, die publizierten Färbungen zeigen diese Ergebnisse jedoch nur unzureichend. An den durch Striz et al. veröffentlichten Färbungen sind nicht durchgehend die im Rahmen dieser Arbeit in allen Abstoßungen gefundenen typischen Färbebilder, in denen IL-18 positive Schaltzellen von negativen Hauptzellen abgewechselt werden, zu sehen. Die abgebildeten Färbungen erscheinen häufig überfärbt, es ist viel Hintergrundfärbung zu sehen, was dazu führt, dass z.T. auch die Hauptzellen IL-18 positiv gefärbt erscheinen. Eine signifikante Färbung von proximalen Tubuluszellen, Bereichen im Glomerulum oder in Blutgefäßen sind schwer zu erkennen und auch nicht eigens gekennzeichnet.

Das Potenzial verschiedener Zellen der Niere als Antwort auf einen externen Stimulus IL-18 zu exprimieren wurde von Melnikov et. al in Erwägung gezogen, wo vermutet wird, dass proximale Tubuluszellen in Mäusen eine Quelle von IL-18

darstellen könnten [Melnikov, V. Y. et al. 2002]. Diese Gruppe beobachtete, dass frisch isolierte proximale Tubuluszellen aus Mäusen unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen unterschiedlich hohe Mengen IL-18 produzierten. Vorausgesetzt, dass die konstitutive Expression von IL-18 in Menschen und Mäusen gleichartig verläuft, wären die Beobachtungen ein Hinweis darauf, dass die proximalen Tubuluszellen während des Isolierungsprozesses zur IL-18 Expression stimuliert wurden. Der Promotor des IL-18 Gens der Maus besitzt im Gegensatz zum Menschen eine Bindungsstelle für das IFN consensus sequence binding protein (ICSBP), welches durch IFN- $\gamma$  aktiviert wird [Tone, M. et al. 1997]. Möglicherweise kann in proximalen Tubuluszellen der Maus über IFN- $\gamma$  und ICSBP eine Expression von IL-18 induziert werden. Desweiteren befinden sich im Promotor des IL-18 Gens der Maus zwei Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor für Nf- $\kappa$ B, über die eine Expression von IL-18 durch proinflammatorische Stimuli induziert werden kann [Chandrasekar, B. et al. 2004]. Diese Bindungsstellen existieren im menschlichen IL-18 Gen nicht. Somit sind die aus Experimenten mit Mäusen gewonnenen Daten bezüglich der induzierbaren Expression von IL-18 nicht direkt auf den Menschen übertragbar. Es gibt wenige eindeutige Hinweise auf eine *de novo* Expression von IL-18 im Menschen. Bei ANCA assoziierter Glomerulonephritis wurde eine starke Färbung von IL-18 an den Podozyten beschrieben [Hewins, P. et al. 2006]. Diese Ergebnisse wurden an anderer Stelle diskutiert. Es wurde eine Funktion des IL-18 in diesem Zelltyp diskutiert und angenommen, dass podozytär exprimiertes IL-18 vor der Entfaltung einer Wirkung mit dem Urin weggespült würde [Pressler, B. M. et al. 2006].

Die in dieser Arbeit durchgeführten Färbungen an Biopsien mit CAN zeigten häufig IL-18 positive Färbungen der Intima von Arteriolen. Ein typisches Bild der CAN sind die fibrotischen und entzündlichen Veränderungen an Blutgefäßen. Interessanterweise wird IL-18 bei der Entstehung von Atherosklerose als Schlüsselmediator angesehen [McLaren, B. K. et al. 2004]. In atherosklerotischen Läsionen von menschlichen Carotiden wurden in allen Stadien große Mengen an Makrophagen und T-Zellen gefunden, die Zytokine exprimieren [Mallat, Z. et al. 2001]. IFN- $\gamma$  scheint hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen, da es proentzündliche Reaktionen vermittelnde Makrophagen aktiviert, Endothelzellen zur Expression von Adhäsionsmolekülen stimuliert, die Kontraktilität und

Fibrogenese in Gefäßmuskelzellen herabsetzt und das „ATP-binding cassette protein-1“ inhibiert, welches einen Cholesterol-Efflux aus den Makrophagen vermittelt. IL-18 Rezeptoren (IL-18R $\alpha/\beta$ ) werden konstitutiv in Epithelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen und Makrophagen exprimiert, nach Stimulation mit LPS, TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  wird deren Expression hochreguliert. Es konnte gezeigt werden, dass glatte Gefäßmuskelzellen in atherosklerotischen Bereichen zur IFN- $\gamma$  Expression fähig sind. IL-18 ist in atherosklerotischen Gefäßläsionen sowie in Gefäßmuskelzellen der Intima bei atherosklerotischen Plaques nachweisbar, wobei die Quelle des IL-18 hier unbekannt ist. Es wird vermutet, dass Makrophagen die Hauptquellen der IL-18 Expression darstellen [Gerdes, N. et al. 2002]. In Versuchen an Mäusen konnte gezeigt werden, dass IL-18 induzierte IFN- $\gamma$  Expression mit einer erhöhten CXCR16 „Scavenger Receptor“ Expression in Makrophagen und Gefäßmuskelzellen einhergeht, die für eine vermehrte Schaumzellbildung verantwortlich gemacht werden [Tenger, C. et al. 2005]. Eine Entgleisung der Antwort in Gefäßmuskelzellen von atherosklerotischen Bereichen wird auf einen positiven Feedback Kreislauf zurückgeführt. In diesen Zellen wird eine Expression von IL-18R $\alpha/\beta$  durch IFN- $\gamma$  induziert, gleichzeitig werden diese Zellen durch IL-18 zur Bildung von IFN- $\gamma$  aktiviert. Dieser Kreislauf wird als möglicher Faktor für eine übermäßig starke Th1-Antwort bei Atherosklerose angenommen [Frostedgard, J. et al. 1999]. Durch bakterielle und virale Infektionen wird in hohem Maße IL-18 freigesetzt. Es wird diskutiert, dass durch diese erhöhte Freisetzung von IL-18 und einer Entstehung bzw. Progression von Atherosklerose Zusammenhänge bestehen könnten, in denen IL-18 die Schlüsselfunktion einnimmt [Caligiuri, G. et al. 2005; Pirhonen, J. et al. 1999; Vankayalapati, R. et al. 2000]. Es wäre möglich, dass die bei den Biopsien mit CAN beobachteten IL-18 positiven Intimafärbungen durch eine lokal entgleiste Th1-Antwort im Transplantat entstanden sind. Infiltrierende Zellen könnten im Laufe von langandauernden, chronischen Abstoßungsreaktionen über eine hohe Menge an IL-18 zu Entzündungen der Gefäße führen. Das IL-18 könnte dabei das Verbindungsglied von Abstoßungsreaktion zur Entstehung von Gefäßentzündungen im Transplantat darstellen. Das Erscheinungsbild der an der Intima beobachteten IL-18 Färbungen könnte auf eine *de novo* Bildung von IL-18 schließen lassen. Diese Beobachtung bedarf genauerer Untersuchungen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl das IL-18 aus dem Empfängerorganismus, als auch das lokal im Transplantat exprimierte IL-18 an immunologischen Komplikationen nach Nierentransplantation beteiligt ist.

Im Zusammenhang anderer immunologischer Erkrankungen, wie chronisch entzündliche Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen, wird dem IL-18 eine schädliche Rolle zugesprochen. Dabei wird diskutiert, dass IL-18 eine Schlüsselfunktion in der Entgleisung der Immunantwort hat. Durch seine proximale Stellung in der angeborenen und erworbenen Immunabwehr stellt das IL-18 ein attraktives Target für die Entwicklung neuer Immunsuppressiva in der Transplantationsmedizin dar.

## 5 Zusammenfassung

Die allogene Nierentransplantation ist im Vergleich zur extrakorporalen Blutreinigung die optimale Therapie, um Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz eine signifikante Erhöhung der Lebenszeit bei gleichzeitig hoher Lebensqualität zu ermöglichen. Die schwerwiegendsten Komplikationen und die in Bezug auf das Transplantatüberleben limitierenden Faktoren bei einer Nierentransplantation haben ihren Ursprung in immunologischen Prozessen. IL-18, auch bekannt als Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )-induzierender Faktor, ist ein proximaler Mediator in der Regulation der angeborenen sowie erworbenen Immunabwehr. Es wird konstitutiv in Zellen des Immunsystems wie Makrophagen und in verschiedenen Gewebetypen in einer inaktiven pro-Form exprimiert und bis zu seiner Aktivierung gespeichert. Aktiviertes IL-18 induziert die Bildung einer Vielzahl proinflammatorischer Mediatoren, darunter sind IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und verschiedene Chemokine. Gleichzeitig ist IL-18 als Kostimulator von IL-12 an der Steuerung des Gleichgewichtes der Th1- und Th2-Antwort beteiligt. Damit könnte IL-18 maßgeblich zu der Entstehung von Abstoßungsreaktionen sowie einem verzögerten Funktionsbeginn des Nierentransplantates („Delayed Graft Function“ = DGF) beitragen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Beteiligung von lokal in der menschlichen Niere exprimiertem IL-18 an immunologischen Prozessen prinzipiell möglich ist, da die Expression von IL-18 und weiterer für seine Funktion essentieller Komponenten auf mRNA- und Proteinebene in der gesunden menschlichen Niere nachgewiesen wurde. Über immunhistochemische Färbungen konnte eine Lokalisation des IL-18 im distalen Tubulussystem und Sammelrohrabschnitten der Niere nachgewiesen werden. Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen von IL-18 zusammen mit Proteinen, die für einzelne Tubulus- und Sammelrohrabschnitte spezifisch sind, zeigten, dass IL-18 in den Schaltzellen des distalen Konvolutes, des Verbindungstubulus und des Sammelrohrs lokalisiert ist. Weiterhin sind die für die Aktivierung von IL-18 notwendigen Komponenten, der purinerge Rezeptor P<sub>2X7</sub> und Caspase-1, in der Niere mit IL-18 kolokalisiert. Damit sind grundlegende Voraussetzungen für eine Aktivierung von IL-18 in diesen Bereichen gegeben. Im Zuge von Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantation könnte das im Nierengewebe exprimierte

IL-18 an immunologischen Vorgängen beteiligt sein. Es wurde festgestellt, dass die Menge an konstitutiv exprimiertem IL-18 in den Schaltzellen von Tubulus- und Sammelrohrabschnitten bei akuten Abstoßungen sowie bei der chronischen Allograftnephropathie im Vergleich zur gesunden Niere abnahm, gleichzeitig lagen vermehrt infiltrierende Makrophagen sowie T- und B-Lymphozyten im Nierenparenchym vor. Diese Beobachtung lässt die Spekulation zu, dass durch eine Ausschleusung von aktivem IL-18 aus den Schaltzellen eine Immunantwort unterhalten wird, und es im Zuge dessen zu einer Infiltration von Immunzellen kommt. Durch immunohistochemische IL-18 Färbungen an Transplantatbiopsien konnte keine *de novo* Expression von IL-18 in Bereichen der Tubuli oder der Glomeruli bei immunologischen Komplikationen nach Nierentransplantation nachgewiesen werden. Bei der chronischen Allograftnephropathie wurde IL-18 an kleineren Blutgefäßen nachgewiesen, was für eine Beteiligung von IL-18 an atherosklerotischen Veränderungen bei dieser Diagnose spricht. Weitere Rückschlüsse auf einen Effekt des IL-18 bei Komplikationen nach Nierentransplantation sollten durch die Analyse von IL-18 Genpolymorphismen erhalten werden. Funktionelle Einzelbasenaustausch-Polymorphismen („Single Nucleotide Polymorphisms“ = SNP's) des IL-18 Promotors scheinen sich auf die Expression von IL-18 auszuwirken und wurden für eine Beteiligung an der Entstehung oder dem Verlauf verschiedener Erkrankungen verantwortlich gemacht. In dieser Arbeit wurde durch Assoziationsanalysen und Haplotypenanalysen gezeigt, dass sich die IL-18 Promotor SNP's -607C/A und -137G/C des Empfängers auf die Entstehung einer DGF auswirken. Der -137CC Genotyp und das -137C Allel sowie der kombinierte Genotyp -607CA und -137CC des Empfängers sind mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer DGF assoziiert. Im Gegensatz dazu scheinen sich Unterschiede in der Genexpression des IL-18, welche durch die SNP's -607C/A und -137G/C verursacht werden, nicht auf die Entstehung von Abstoßungsreaktionen auszuwirken.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass aus dem Empfänger stammendes IL-18 sowie lokal im Spenderorgan exprimiertes IL-18 an immunologischen Komplikationen nach Nierentransplantation beteiligt sein könnte. Durch seine Stellung am Beginn von proinflammatorischen Kaskaden stellt das IL-18 ein attraktives Target für die Entwicklung neuer Immunsuppressiva dar.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, Nakanishi K, Akira S* 1998 Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 9: 143-150
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J* 1996 Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87: 171
- Bachmann M, Horn K, Poleganov MA, Paulukat J, Nold M, Pfeilschifter J, Muhl H* 2006 Interleukin-18 secretion and Th1-like cytokine responses in human peripheral blood mononuclear cells under the influence of the toll-like receptor-5 ligand flagellin. *Cell Microbiol* 8: 289-300
- Baer PC, Scherberich JE, Bereiter-Hahn J, Geiger H* 2000 Induction of RANTES, HLA-DR, and intercellular adhesion molecule-1 on highly purified distal tubular cells from human kidney. *Transplantation* 69: 2456-2459
- Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL* 1989 Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 84: 1045-1049
- Balding DJ* 2006 A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet* 7: 781-791
- Bazan JF, Timans JC, Kastelein RA* 1996 A newly defined interleukin-1? *Nature* 379: 591
- Biner HL, rpin-Bott MP, Loffing J, Wang X, Knepper M, Hebert SC, Kaissling B* 2002 Human cortical distal nephron: distribution of electrolyte and water transport pathways. *J Am Soc Nephrol* 13: 836-847
- Boraschi D, Dinarello CA* 2006 IL-18 in autoimmunity: review. *Eur Cytokine Netw* 17: 224-252
- Boraska V, Terzic J, Skrabic V, Cacev T, Bucevic-Popovic V, Peruzovic M, Markotic A, Zemunik T* 2006 NeuroD1 gene and interleukin-18 gene polymorphisms in type 1 diabetes in Dalmatian population of Southern Croatia. *Croat Med J* 47: 571-578
- Bossu P, Ciaramella A, Moro ML, Bellincampi L, Bernardini S, Federici G, Trequattrini A, Macciardi F, Spoletini I, Di IF, Caltagirone C, Spalletta G* 2007 Interleukin 18 gene polymorphisms predict risk and outcome of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78: 807-811
- Bowie A, O'Neill LA* 2000 The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* 67: 508-514

- Brent L, Brown JB, Medawar PB* 1959 Skin transplantation immunity in relation to hypersensitivity reactions of the delayed type. *Bull Soc Int Chir* 18: 116-130
- Bucher O, Wartenberg H* 1997: Niere. Cytologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. pp. 328-341
- Caligiuri G, Kaveri S, Nicoletti A* 2005 When interleukin-18 conducts, the Preludio sounds the same no matter who plays. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 655-657
- Cardoso SM, DeFor TE, Tilley LA, Bidwell JL, Weisdorf DJ, MacMillan ML* 2004 Patient interleukin-18 GCG haplotype associates with improved survival and decreased transplant-related mortality after unrelated-donor bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 126: 704-710
- Chandrasekar B, Marelli-Berg FM, Tone M, Bysani S, Prabhu SD, Murray DR* 2004 Beta-adrenergic stimulation induces interleukin-18 expression via beta2-AR, PI3K, Akt, IKK, and NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun* 319: 304-311
- Cybulsky MI, McComb DJ, Movat HZ* 1988 Neutrophil leukocyte emigration induced by endotoxin. Mediator roles of interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha 1. *J Immunol* 140: 3144-3149
- Daemen MA, van't VC, Wolfs TG, Buurman WA* 1999 Ischemia/reperfusion-induced IFN-gamma up-regulation: involvement of IL-12 and IL-18. *J Immunol* 162: 5506-5510
- de Oliveira JG, Xavier PD, Sampaio SM, Tavares IS, Mendes AA* 2002 The synthesis by fine-needle aspiration biopsy cultures of IL-7, IL-16 and IL-18 is significantly associated with acute rejection in kidney transplants. *Nephron* 92: 622-628
- de Perrot M, Sekine Y, Fischer S, Waddell TK, McRae K, Liu M, Wigle DA, Keshavjee S* 2002 Interleukin-8 release during early reperfusion predicts graft function in human lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 211-215
- Dinarello CA* 2000 Targeting interleukin 18 with interleukin 18 binding protein. *Ann Rheum Dis* 59 Suppl 1: i17-i20
- Dinarello CA, Fantuzzi G* 2003 Interleukin-18 and host defense against infection. *J Infect Dis* 187 Suppl 2: S370-S384
- Dong GP, Yu ZS, Liang L, Zou CC, Fu JF, Wang CL* 2007 IL-18 gene promoter -137C/G and -607C/A polymorphisms in Chinese Han children with type 1 diabetes mellitus. *Int J Immunogenet* 34: 75-79
- Dunne A, O'Neill LA* 2003 The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* 2003: re3

- Faust J, Menke J, Kriegsmann J, Kelley VR, Mayet WJ, Galle PR, Schwarting A* 2002 Correlation of renal tubular epithelial cell-derived interleukin-18 up-regulation with disease activity in MRL-Faslpr mice with autoimmune lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 46: 3083-3095
- Feucht HE* 2003 Complement C4d in graft capillaries -- the missing link in the recognition of humoral alloreactivity. *Am J Transplant* 3: 646-652
- Frei, U. Schober-Halstenberg H. J. and .* 2006: Nierenersatztherapie in Deutschland. *QuaSi-Niere Jahresbericht 2005/2006*.
- Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson GK* 1999 Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* 145: 33-43
- Geiger H, Jonas D, Lenz T, Kramer B* 2003 *Nierenerkrankungen*. Schattauer,
- Gerdes N, Sukhova GK, Libby P, Reynolds RS, Young JL, Schonbeck U* 2002 Expression of interleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for atherogenesis. *J Exp Med* 195: 245-257
- Giedraitis V, He B, Huang WX, Hillert J* 2001 Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation. *J Neuroimmunol* 112: 146-152
- Gracie JA, Koyama N, Murdoch J, Field M, McGarry F, Crilly A, Schobel A, Madhok R, Pons-Kuhnemann J, McInnes IB, Moller B* 2005 Disease association of two distinct interleukin-18 promoter polymorphisms in Caucasian rheumatoid arthritis patients. *Genes Immun* 6: 211-216
- Grau V, Herbst B, Steiniger B* 1998 Dynamics of monocytes/macrophages and T lymphocytes in acutely rejecting rat renal allografts. *Cell Tissue Res* 291: 117-126
- Hentze H, Lin XY, Choi MS, Porter AG* 2003 Critical role for cathepsin B in mediating caspase-1-dependent interleukin-18 maturation and caspase-1-independent necrosis triggered by the microbial toxin nigericin. *Cell Death Differ* 10: 956-968
- Hewins P, Morgan MD, Holden N, Neil D, Williams JM, Savage CO, Harper L* 2006 IL-18 is upregulated in the kidney and primes neutrophil responsiveness in ANCA-associated vasculitis. *Kidney Int* 69: 605-615
- Hirankarn N, Manonom C, Tangkijvanich P, Poovorawan Y* 2007 Association of interleukin-18 gene polymorphism (-607A/A genotype) with susceptibility to chronic hepatitis B virus infection. *Tissue Antigens* 70: 160-163

- Hosking L, Lumsden S, Lewis K, Yeo A, McCarthy L, Bansal A, Riley J, Purvis I, Xu CF* 2004 Detection of genotyping errors by Hardy-Weinberg equilibrium testing. *Eur J Hum Genet* 12: 395-399
- Jang WC, Park SB, Nam YH, Lee SS, Kim JW, Chang IS, Kim KT, Chang HK* 2005 Interleukin-18 gene polymorphisms in Korean patients with Behcet's disease. *Clin Exp Rheumatol* 23: S59-S63
- Karlson P* 2005 *Biochemie und Pathobiochemie*. Thieme Verlag,
- Knippers R* 1995 *Molekulare Genetik*. Thieme Verlag,
- Kolesar L, Novota P, Krasna E, Slavcev A, Viklicky O, Honsova E, Striz I* 2007 Polymorphism of interleukin-18 promoter influences the onset of kidney graft function after transplantation. *Tissue Antigens* 70: 363-368
- Koyama I, Bulkley GB, Williams GM, Im MJ* 1985 The role of oxygen free radicals in mediating the reperfusion injury of cold-preserved ischemic kidneys. *Transplantation* 40: 590-595
- Krasna E, Kolesar L, Slavcev A, Valhova S, Kronosova B, Jaresova M, Striz I* 2005 IL-18 receptor expression on epithelial cells is upregulated by TNF alpha. *Inflammation* 29: 33-37
- Kretowski A, Mironczuk K, Karpinska A, Bojaryn U, Kinalski M, Puchalski Z, Kinalska I* 2002 Interleukin-18 promoter polymorphisms in type 1 diabetes. *Diabetes* 51: 3347-3349
- Kriz W, Bankir L* 1988 A standard nomenclature for structures of the kidney. *Kidney Int* 33: 1-7
- Lee HM, Park SA, Chung SW, Woo JS, Chae SW, Lee SH, Kang HJ, Hwang SJ* 2006 Interleukin-18/-607 gene polymorphism in allergic rhinitis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 70: 1085-1088
- Lee YJ, Kang SW, Park JJ, Bae YD, Lee EY, Lee EB, Song YW* 2006 Interleukin-18 promoter polymorphisms in patients with Behcet's disease. *Hum Immunol* 67: 812-818
- Lin YJ, Wan L, Lee CC, Huang CM, Tsai Y, Tsai CH, Shin TL, Chao K, Liu CM, Xiao JW, Tsai FJ* 2007 Disease association of the interleukin-18 promoter polymorphisms in Taiwan Chinese systemic lupus erythematosus patients. *Genes Immun* 8: 302-307
- Liu Y, Lin N, Huang L, Xu Q, Pang G* 2007 Genetic polymorphisms of the interleukin-18 gene and risk of prostate cancer. *DNA Cell Biol* 26: 613-618
- Lovett DH, Ryan JL, Sterzel RB* 1983 A thymocyte-activating factor derived from glomerular mesangial cells. *J Immunol* 130: 1796-1801

- Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, Besnard S, Leseche G, Chvatchko Y, Tedgui A* 2001 Expression of interleukin-18 in human atherosclerotic plaques and relation to plaque instability. *Circulation* 104: 1598-1603
- Matsumoto K, Kanmatsuse K* 2001 Elevated interleukin-18 levels in the urine of nephrotic patients. *Nephron* 88: 334-339
- McInnes IB, Gracie JA, Leung BP, Wei XQ, Liew FY* 2000 Interleukin 18: a pleiotropic participant in chronic inflammation. *Immunol Today* 21: 312-315
- McLaren BK, Zhang PL, Herrera GA* 2004 P53 protein is a reliable marker in identification of renal tubular injury. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 12: 225-229
- Mehta VB, Hart J, Wewers MD* 2001 ATP-stimulated release of interleukin (IL)-1beta and IL-18 requires priming by lipopolysaccharide and is independent of caspase-1 cleavage. *J Biol Chem* 276: 3820-3826
- Melnikov VY, Ecder T, Fantuzzi G, Siegmund B, Lucia MS, Dinarello CA, Schrier RW, Edelstein CL* 2001 Impaired IL-18 processing protects caspase-1-deficient mice from ischemic acute renal failure. *J Clin Invest* 107: 1145-1152
- Melnikov VY, Faubel S, Siegmund B, Lucia MS, Ljubanovic D, Edelstein CL* 2002 Neutrophil-independent mechanisms of caspase-1- and IL-18-mediated ischemic acute tubular necrosis in mice. *J Clin Invest* 110: 1083-1091
- Mengel M, Gwinner W, Schwarz A, Bajeski R, Franz I, Brocker V, Becker T, Neipp M, Klempnauer J, Haller H, Kreipe H* 2007 Infiltrates in protocol biopsies from renal allografts. *Am J Transplant* 7: 356-365
- Mojtahedi Z, Naeimi S, Farjadian S, Omrani GR, Ghaderi A* 2006 Association of IL-18 promoter polymorphisms with predisposition to Type 1 diabetes. *Diabet Med* 23: 235-239
- Mühl H, Hofler S, Pfeilschifter J* 2003 Inhibition of lipopolysaccharide/ATP-induced release of interleukin-18 by KN-62 and glyburide. *Eur J Pharmacol* 482: 325-328
- Mühl H, Pfeilschifter J* 2004 Interleukin-18 bioactivity: a novel target for immunopharmacological anti-inflammatory intervention. *Eur J Pharmacol* 500: 63-71
- Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H* 2001 Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol* 19: 423-474
- Neighbors M, Xu X, Barrat FJ, Ruuls SR, Churakova T, Debets R, Bazan JF, Kastelein RA, Abrams JS, O'Garra A* 2001 A critical role for interleukin 18 in primary and memory effector responses to *Listeria monocytogenes* that extends beyond its effects on Interferon gamma production. *J Exp Med* 194: 343-354

- Neumayer H* 2001 Neue Medikamente in der Transplantationsmedizin. Uni-Med Verlag,
- Ohsuzu F* 2004 The roles of cytokines, inflammation and immunity in vascular diseases. *J Atheroscler Thromb* 11: 313-321
- Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K, .* 1995 Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 378: 88-91
- Parikh CR, Jani A, Melnikov VY, Faubel S, Edelstein CL* 2004 Urinary interleukin-18 is a marker of human acute tubular necrosis. *Am J Kidney Dis* 43: 405-414
- Parikh CR, Jani A, Mishra J, Ma Q, Kelly C, Barasch J, Edelstein CL, Devarajan P* 2006 Urine NGAL and IL-18 are predictive biomarkers for delayed graft function following kidney transplantation. *Am J Transplant* 6: 1639-1645
- Pawlik A, Kaminski M, Kusnierczyk P, Kurzawski M, Dziedziejko V, Adamska M, Safranow K, Gawronska-Szklarz B* 2007 Interleukin-18 promoter polymorphism in patients with atopic asthma. *Tissue Antigens* 70: 314-318
- Pawlik A, Kurzawski M, Czerny B, Gawronska-Szklarz B, Drozdziak M, Herczynska M* 2006 Interleukin-18 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 67: 415-418
- Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G* 2004 Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 364: 1814-1827
- Pirhonen J, Sareneva T, Kurimoto M, Julkunen I, Matikainen S* 1999 Virus infection activates IL-1 beta and IL-18 production in human macrophages by a caspase-1-dependent pathway. *J Immunol* 162: 7322-7329
- Pressler BM, Falk RJ, Preston CA* 2006 Interleukin-18, neutrophils, and ANCA. *Kidney Int* 69: 424-425
- Puren AJ, Fantuzzi G, Gu Y, Su MS, Dinarello CA* 1998 Interleukin-18 (IFN-gamma-inducing factor) induces IL-8 and IL-1beta via TNFalpha production from non-CD14+ human blood mononuclear cells. *J Clin Invest* 101: 711-721
- Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, Croker BP, Demetris AJ, Drachenberg CB, Fogo AB, Furness P, Gaber LW, Gibson IW, Glotz D, Goldberg JC, Grande J, Halloran PF, Hansen HE, Hartley B, Hayry PJ, Hill CM, Hoffman EO, Hunsicker LG, Lindblad AS, Yamaguchi Y, .* 1999 The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 55: 713-723
- Ronco P, Dosquet P, Verroust P* 1988 [Tamm-Horsfall protein]. *Presse Med* 17: 1641-1646

- Rush DN, Karpinski ME, Nickerson P, Dancea S, Birk P, Jeffery JR* 1999 Does subclinical rejection contribute to chronic rejection in renal transplant patients? *Clin Transplant* 13: 441-446
- Samuelsson P, Hang L, Wullt B, Irjala H, Svanborg C* 2004 Toll-like receptor 4 expression and cytokine responses in the human urinary tract mucosa. *Infect Immun* 72: 3179-3186
- Schoop R, Wahl P, Le HM, Heemann U, Wang M, Wuthrich RP* 2004 Suppressed T-cell activation by IFN-gamma-induced expression of PD-L1 on renal tubular epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant* 19: 2713-2720
- Simon T, Opelz G, Wiesel M, Pelzl S, Ott RC, Susal C* 2004 Serial peripheral blood interleukin-18 and perforin gene expression measurements for prediction of acute kidney graft rejection. *Transplantation* 77: 1589-1595
- Sivalingam SP, Yoon KH, Koh DR, Fong KY* 2003 Single-nucleotide polymorphisms of the interleukin-18 gene promoter region in rheumatoid arthritis patients: protective effect of AA genotype. *Tissue Antigens* 62: 498-504
- Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, Halloran PF, Baldwin W, Banfi G, Collins AB, Cosio F, David DS, Drachenberg C, Einecke G, Fogo AB, Gibson IW, Glotz D, Iskandar SS, Kraus E, Lerut E, Mannon RB, Mihatsch M, Nankivell BJ, Nickeleit V, Papadimitriou JC, Randhawa P, Regele H, Renaudin K, Roberts I, Seron D, Smith RN, Valente M* 2008 Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 8: 753-760
- Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, Campbell PM, Cascalho M, Collins AB, Demetris AJ, Drachenberg CB, Gibson IW, Grimm PC, Haas M, Lerut E, Liapis H, Mannon RB, Marcus PB, Mengel M, Mihatsch MJ, Nankivell BJ, Nickeleit V, Papadimitriou JC, Platt JL, Randhawa P, Roberts I, Salinas-Madruga L, Salomon DR, Seron D, Sheaff M, Weening JJ* 2007 Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 7: 518-526
- Stassen NA, Breit CM, Norfleet LA, Polk HC, Jr.* 2003 IL-18 promoter polymorphisms correlate with the development of post-injury sepsis. *Surgery* 134: 351-356
- Stephens M, Donnelly P* 2003 A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet* 73: 1162-1169
- Stephens M, Smith NJ, Donnelly P* 2001 A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68: 978-989

- Striz I, Krasna E, Honsova E, Lacha J, Petrickova K, Jaresova M, Lodererova A, Bohmova R, Valhova S, Slavcev A, Vitko S* 2005 Interleukin 18 (IL-18) upregulation in acute rejection of kidney allograft. *Immunol Lett* 99: 30-35
- Sugiura T, Maeno N, Kawaguchi Y, Takei S, Imanaka H, Kawano Y, Terajima-Ichida H, Hara M, Kamatani N* 2006 A promoter haplotype of the interleukin-18 gene is associated with juvenile idiopathic arthritis in the Japanese population. *Arthritis Res Ther* 8: R60
- Takeda K, Akira S* 2005 Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17: 1-14
- Tariverdian, Buselmaier* 2004 *Humangenetik*. Springer Verlag,
- Tenger C, Sundborger A, Jawien J, Zhou X* 2005 IL-18 accelerates atherosclerosis accompanied by elevation of IFN-gamma and CXCL16 expression independently of T cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 791-796
- Thews, Mutschler, Vaupel* 2007 *Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart,
- Thompson SR, Novick D, Stock CJ, Sanders J, Brull D, Cooper J, Woo P, Miller G, Rubinstein M, Humphries SE* 2007 Free Interleukin (IL)-18 levels, and the impact of IL18 and IL18BP genetic variation, in CHD patients and healthy men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 2743-2749
- Tone M, Thompson SA, Tone Y, Fairchild PJ, Waldmann H* 1997 Regulation of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) gene expression. *J Immunol* 159: 6156-6163
- Vankayalapati R, Wizek B, Weis SE, Samten B, Girard WM, Barnes PF* 2000 Production of interleukin-18 in human tuberculosis. *J Infect Dis* 182: 234-239
- Verlander JW, Hassell KA, Royaux IE, Glapion DM, Wang ME, Everett LA, Green ED, Wall SM* 2003 Deoxycorticosterone upregulates PDS (Slc26a4) in mouse kidney: role of pendrin in mineralocorticoid-induced hypertension. *Hypertension* 42: 356-362
- Wahl P, Schoop R, Bilic G, Neuweiler J, Le HM, Yoshinaga SK, Wuthrich RP* 2002 Renal tubular epithelial expression of the costimulatory molecule B7RP-1 (inducible costimulator ligand). *J Am Soc Nephrol* 13: 1517-1526
- Wall SM* 2005 Recent advances in our understanding of intercalated cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14: 480-484
- Wall SM, Kim YH, Stanley L, Glapion DM, Everett LA, Green ED, Verlander JW* 2004 NaCl restriction upregulates renal Slc26a4 through subcellular redistribution: role in Cl- conservation. *Hypertension* 44: 982-987

- 
- Wyburn K, Wu H, Yin J, Jose M, Eris J, Chadban S 2005 Macrophage-derived interleukin-18 in experimental renal allograft rejection. *Nephrol Dial Transplant* 20: 699-706
- Wyman TH, Dinarello CA, Banerjee A, Gamboni-Robertson F, Hiester AA, England KM, Kelher M, Silliman CC 2002 Physiological levels of interleukin-18 stimulate multiple neutrophil functions through p38 MAP kinase activation. *J Leukoc Biol* 72: 401-409
- Xu Q, Tin SK, Sivalingam SP, Thumboo J, Koh DR, Fong KY 2007 Interleukin-18 promoter gene polymorphisms in Chinese patients with systemic lupus erythematosus: association with CC genotype at position -607. *Ann Acad Med Singapore* 36: 91-95
- Zhang PA, Wu JM, Li Y, Yang XS 2005 Association of polymorphisms of interleukin-18 gene promoter region with chronic hepatitis B in Chinese Han population. *World J Gastroenterol* 11: 1594-1598



## Publikationen

### Originalarbeiten

*Sichler O\*, Gauer S\*, Mühl H, Pfeilschifter J, Geiger H, Hauser IA* Association of Interleukin-18 promoter polymorphisms with the incidence of delayed graft function in kidney allograft transplantation. *Submitted to Clinical Nephrology*

*Gauer S\*, Sichler O\*, Obermüller N\*, Holzmann Y, Kiss E, Sobkowiak E, Pfeilschifter J, Geiger H, Mühl H, Hauser IA.* 2007 IL-18 is expressed in the intercalated cell of human kidney. *Kidney Int.: 72(9):1081-7*

*Hauser IA, Spiegler S, Kiss E, Gauer S, Sichler O, Scheuermann EH, Ackermann H, Pfeilschifter JM, Geiger H, Gröne HJ, Radeke HH* 2005 Prediction of acute renal allograft rejection by urinary monokine induced by IFN-gamma (MIG). *J Am Soc Nephrol.:16(6):1849-58*

*Brosi A\*, Burghardt B\*, Fischer E\*, Sichler O\*, Marschalek R\** 2004 Interaktionen mit P-Glycoprotein *PZ Prisma 11(2): 133*

\* *Authors contributed equally*

### Posterbeiträge

*Sichler O, Gauer S, Höfeld H, Mühl H, Geiger H, Hauser IA* Do the Interleukin-18 Promoter SNPs -607C/A and -137G/C of Kidney Allograft Recipients Predict Delayed Graft Function? American Transplant Congress; Mai 31-Juni 04, 2008; Toronto, Canada

*Gauer S, Sichler O, Mühl H, Kiss E, Holzmann Y, Obermüller N, Geiger H, Hauser IA* IL18 Is Constitutively expressed in intercalated cells of the human distal tubule, the connecting tubule, and the cortical collecting duct XLIII ERA-EDTA Congress; July 15-18, 2006; Glasgow, United Kingdom

*Gauer S, Sichler O, Mühl H, Kiss E, Holzmann Y, Obermüller N, Geiger H, Hauser IA* IL-18 ist in der gesunden humanen Niere in Schaltzellen des distalen Tubulus, des Verbindungstubulus und des Sammelrohres exprimiert. Kongress der deutschen Gesellschaft für innere Medizin; April 22-26, 2006; Wiesbaden

*Hauser IA, Kiss E, Radeke H, Gauer S, Sichler O, Baer P, Scheuermann EH, Geiger H, Pfeilschifter J, Gröne H-J, Mühl H* Expression of IL18 in the Human Kidney – A Case Study of Renal Allografts; Congress of Nephrology 2004, September 18–21; Basel, Schweiz

## Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde als externe Doktorarbeit im Institut für Nephrologie des Zentrums für innere Medizin III der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. Ingeborg A. Hauser angefertigt.

Mein Dank gilt

Frau Prof. Dr. Ingeborg A. Hauser für die Möglichkeit unter ihrer Anleitung promovieren zu dürfen. Außerdem möchte ich mich herzlich für ihre ständige Diskussionsbereitschaft und die freundliche Unterstützung bedanken.

Herrn Prof. Dr. Walter E. Müller, der als Vertreter des Fachbereiches Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt meine Arbeit als wissenschaftlicher Gutachter betreut und freundlich unterstützt hat.

Herrn Dr. Stefan Gauer aus dem nephrologischen Forschungslabor für die intensive fachliche Betreuung und die freundschaftliche Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn Dr. Niko Obermüller aus dem Zentrum für innere Medizin III / Nephrologie der J.W.Goethe-Universität Frankfurt für die konstruktive Zusammenarbeit und seine hilfreichen Beratungen insbesondere zum Thema Nierenmorphologie.

Herrn PD Dr. Heiko Mühl aus dem Pharmazentrum Frankfurt für seine freundliche Unterstützung und die konstruktive Diskussionsbereitschaft zu allen Fragen über IL-18.

Herrn Prof. Dr. H.-J. Gröne und Frau Dr. Eva Kiss des Institutes für Zelluläre und Molekulare Pathologie des DKfZ Heidelberg für die gute Zusammenarbeit.

Herrn PD Dr. Ralf Brandes und Herrn Dr. Rüdiger Popp des Institutes für kardiovaskuläre Physiologie der J.W.Goethe-Universität Frankfurt für ihre freundliche Unterstützung bei der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie.

Allen Laborkolleginnen und -kollegen in den nephrologischen Forschungslaboratorien von Dr. Stefan Gauer und Dr. Patrick Baer sowie des nephrologischen Routinelabores für die fachliche und mentale Unterstützung, insbesondere Frau Petra Metzner, Frau Annalena Hendrich, Frau Mirka Ptacek sowie allen Doktorandinnen und Doktoranden für die freundschaftliche Begleitung durch alle Höhen und Tiefen im Laboralltag.

Frau Düss aus dem frankfurter Büro Deutsche Stiftung Organtransplantation und den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Transplantationsambulanz des KfH in Frankfurt für die freundliche Unterstützung bei den Datenrecherchen.

Frau Dr. Frauke Woltmann aus der Firma Roche Diagnostics Mannheim für das Korrekturlesen dieser Arbeit und für ihre hilfreichen kollegialen Ratschläge.

Meiner Schwester Dr. Katrin Sichler für Ihre wertvollen Tipps und das Korrekturlesen dieser Arbeit sowie meinen Eltern für das Vertrauen und die Unterstützung über all die Jahre.

Meiner Lebensgefährtin Maria Pforr, die während der Anfertigung dieser Arbeit leider oftmals viel zu kurz kam und mich dennoch rücksichtsvoll unterstützte.

## Lebenslauf

### Persönliche Informationen

Olaf Sichler  
Geboren am 3. Mai 1974 in Kassel  
Wohnhaft in Frankfurt am Main  
Ledig, keine Kinder

### Promotion

Seit  
November 2004                      Promotionsarbeit in der Arbeitsgruppe von  
Frau Prof. Dr. I. A. Hauser,  
Nephrologisches Forschungslabor,  
Klinikum der J.W. Goethe-Universität Frankfurt,  
Zentrum für innere Medizin III, Nephrologie

### Berufliche Tätigkeiten

Seit April 2008                      Referent für Qualitätsmanagement,  
Abteilung Qualitätssicherung / Quality Engineering der  
Firma Roche Diagnostics GmbH, Division Pharma,  
Mannheim, Vollzeit

April 2006 -  
März 2008                              Referent für Qualitätsmanagement,  
Abteilung Qualitätssicherung / Compliance Laboratory &  
IT der Firma Roche Diagnostics GmbH,  
Division Pharma, Mannheim, Teilzeit 50%

Juni 2005 -  
April 2008                              Apotheker in der „Apotheke im Brunnencenter“, Bad  
Vilbel und in der „Apotheke im Kaufland“, Rödermark  
Insgesamt 2-3 Notdienste / Monat

Februar 2005 -  
März 2006                              Apotheker in der „Apotheke im Main-Taunus-Zentrum“,  
Frankfurt a.M., 24 Std / Woche

März 1999 -  
Mai 2003                                Krankenpfleger, Uniklinik Frankfurt,  
Teilzeit 25%

April 1998 -  
Februar 1999                          Krankenpfleger, Städtische Kliniken Kassel,  
Aushilfe

---

Oktober 1997 -  
März 1998                      Krankenpfleger, Kliniken der Stadt Köln,  
Vollzeit

### **Studium**

Januar 2005                      Approbation als Apotheker

Juni 2004 -  
November 2004                      Pharmaziepraktikum in der Struwwelpeter-Apotheke,  
Frankfurt a.M.

Dezember 2003 -  
Mai 2004                      Pharmaziepraktikum im Zentrum für innere Medizin III,  
Nephrologie der J.W. Goethe Universität, Frankfurt a.M.

April 1998 -  
Oktober 2003                      Studium der Pharmazie an der J.W. Goethe Universität,  
Frankfurt a.M.

### **Ausbildung**

Oktober 1994 -  
September 1997                      Ausbildung zum Krankenpfleger,  
Städtische Kliniken Kassel

### **Schule**

1990 - 1994                      Geschwister Scholl-Schule Melsungen,  
Oberstufengymnasium

1984 - 1990                      Gesamtschule Melsungen, Gymnasialzweig

1980 - 1984                      Christian Bitter-Schule, Melsungen, Grundschule