

Universitätsklinikum Ulm

Zentrum für Chirurgie

Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie

Prof. Dr. med. D. Henne-Bruns

Ärztliche Direktorin

**Der Einfluss zellulärer Seneszenzmechanismen auf den
Langzeitverlauf nach Nierentransplantation**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen
Fakultät der Universität Ulm**

Julian Johannes Schröder, Hannover

2014

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Doris Henne-Bruns

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Frieder Keller

Tag der Promotion: 22.05.2015

Gewidmet

Herrn Johannes Schröder und Herrn Dr. med. Wolf-Dietrich Bischoff

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iii
1. Einleitung	1
1.1 Die Nierentransplantation und ihre klinische Bedeutung	1
1.2 Transplantatfunktion und zelluläre Seneszenz	3
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit	6
2. Material und Methoden	7
2.1 Studiendesign	7
2.2 Ein- und Ausschlusskriterien, Rekrutierung	7
2.3 Dokumentation, Datenbankentwurf & Ethikvotum	8
2.4 Gewinnung der Biopsie, Präparataufarbeitung, Histologische Technik	9
2.5 RNA Extraktion und RT-PCR aus formalin-fixiertem Gewebe	16
2.6 Auswertung & Statistik	20
3. Ergebnisse	21
3.1 Patientenkollektiv	21
3.2 Patientendaten und klinischer Verlauf	25
3.3 Histologie	31
3.4 RT – PCR: Expression von p21 ^{CIP/WAF} , p16 ^{INK4A} and p14 ^{ARF}	33
4. Diskussion	39
4.1 Zusammenfassung der klinischen Parameter	39
4.2 Histologie	40
4.3 Expression der Seneszenzmarker p21 ^{CIP/WAF} , p16 ^{INK4A} und p14 ^{ARF}	42

5. Zusammenfassung	47
5.1 Einleitung	47
5.2 Methoden	47
5.3 Ergebnisse	48
5.4 Diskussion	48
6. Literaturverzeichnis	49
Anhang	55
7. Danksagung	59

Abkürzungsverzeichnis

ACE	angiotensin converting enzyme - Angiotensin konvertierendes Enzym
AK	Antikörper
ARF	alternate reading frame – alternativer Leserahmen
AT2	Angiotensin 2
ATG	Anti Thymozyten Globulin
BMI	Body Mass Index – Körper-Masse Index
CAN	chronic allograft nephropathy, chronische Transplantatnephropathie
CDK	cyclin-dependent kinase - Zyklin-abhängige Kinase
CDKN2a	cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A - Inhibitor der Cyclin abhängigen Kinase 2A
cDNA	complementary-deoxyribonucleic acid, komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIP 1	CDK inhibitory protein 1, Inhibitor der Zyklin-abhängigen Kinase; auch KIP oder WAF
C _T -Wert	cycle threshold - „Schwellenwertzyklus“
DAB	3,3-Diaminobenzidin

DEPC	Diethyl – pyrocarbonat
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
ESP	Eurotransplant Senior Program
G0 (G1,G2)- Phase	Gap-Phasen des Zellzyklus
HLA	human leukocyte antigen - Humanes Leukozyten Antigen
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INK4a	inhibitor of cyclin-dependent kinase 4a - Inhibitor der Zyklin- abhängigen Kinase 4a
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
M-Phase	Mitose-Phase (Phase des Zellzyklus)
PAS-Färbung	Periodic Acid Schiff Färbung - Perjodsäure Schiff-Färbung
PBS	phosphate buffered saline - Phosphat- gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction - Polymerase-Kettenreaktion
POLR2A	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A – RNA – Polymerase II Polypeptid A
RB	Retinoblastom

RNA	ribonucleic acid - Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute - Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
SD	Standard Deviation – Standardabweichung
siRNA	small interfering ribonucleic acid
S-Phase	Synthese-Phase (Phase des Zellzyklus)
STASIS	stimulation and stress-induced senescence-like arrest

1. Einleitung

1.1 Die Nierentransplantation und ihre klinische Bedeutung

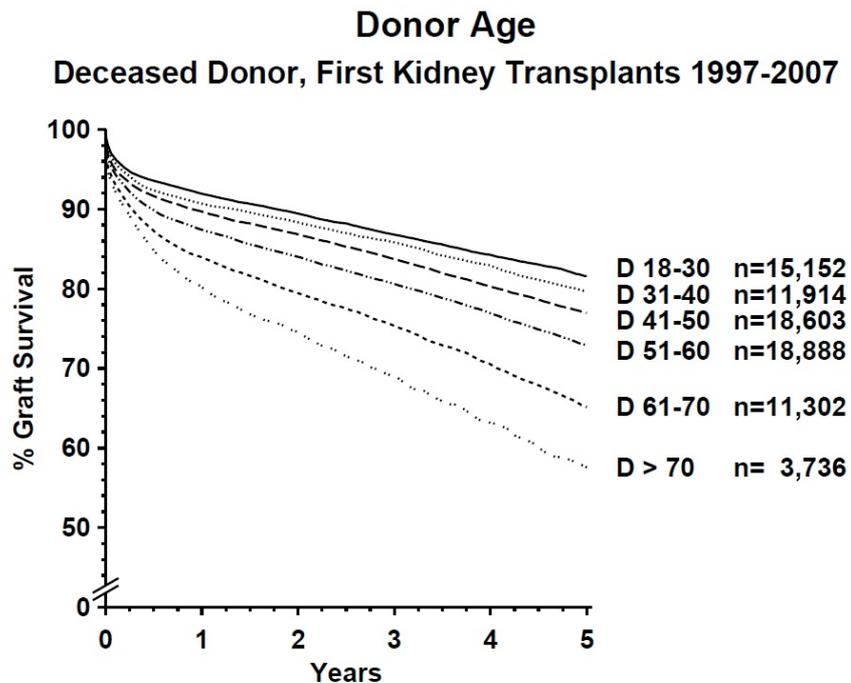
Die steigende Lebenserwartung und die zunehmende Alterung der Gesellschaft stellen auch die Medizin vor große Herausforderungen. Immer mehr Menschen besonders in fortgeschrittenem Lebensalter sind multimorbide und leiden unter chronischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder arterieller Hypertonie und deren Folgen.

Vor dem Hintergrund dieser Entwicklungen steigt auch seit Jahren die Inzidenz des chronischen Nierenversagens und damit der Bedarf an Nierenersatzverfahren. So stieg von 1997 bis 2006 die Prävalenz von Patienten mit chronischer Nierenersatztherapie jährlich um 4,4%. Ende des Jahres 2006 wurden in Deutschland 91.718 Patienten mit chronischem Nierenversagen behandelt. Davon erhielten 66.508 eine Dialysebehandlung und 25.210 wurden nach erfolgreicher Transplantation betreut [14]. Die Transplantation hat eine bessere Langzeit-Prognose als die chronische Dialyse [10, 43]. Leider stellt der Mangel an verfügbaren Spenderorganen den begrenzenden Faktor für eine Transplantation dar.

Ende des Jahres 2010 standen 10.768 Patienten auf der Warteliste für eine Nierentransplantation bei der Eurotransplant International Foundation. Demgegenüber wurden im Jahre 2010 nur 3.737 Organe transplantiert [34]. Eurotransplant regelt die Zuteilung von in den 7 teilnehmenden Staaten Belgien, Österreich, Kroatien, Deutschland, den Niederlanden, Slowenien und Luxemburg entnommenen Organen an passende Empfänger.

Auch die Zusammensetzung des Spenderkollektivs hat sich verändert. Dies führt zu einer weiteren Verschärfung des Organmangels. Die Spender sind im Durchschnitt älter und versterben häufiger im Rahmen zerebrovaskulärer Ereignisse als an Schädel-Hirn-Traumata. Beide Faktoren wirken sich negativ auf das Transplantatüberleben aus [7, 8]. Auch die potentiellen Empfänger der Spenderorgane sind im Durchschnitt immer älter.

Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass sowohl ein höheres Lebensalter des Empfängers als auch des Organspenders einen negativen Einfluss auf das Transplantatüberleben haben [33, 35].



CTS Collaborative Transplant Study

K-17131-0809

Abbildung 1: Transplantatüberleben nach Nierentransplantation in Abhängigkeit vom Spenderalter in Jahren, D steht für donor age (Alter des Organspenders) in Jahren.

(Quelle: Collaborative Transplant Study, <http://www.ctstransplant.com/>, Bild-ID: K-17131-0809)

Ein möglichst langes Überleben des Organempfängers mit funktionierendem Transplantat ist Therapieziel bei der Nierentransplantation. Daher ist es bei einem Mangel an Spenderorganen sinnvoll, älteren Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz ein älteres Organ anzubieten.

Um diesen Umständen gerecht zu werden, führte Eurotransplant im Januar 1999 das „Eurotransplant Senior Program“ (ESP) ein. Ziel dieses Programms ist zum einen zu einer effizienteren Nutzung chronologisch älterer Spenderorgane

beizutragen und zum anderen auch älteren Patienten auf der Warteliste ein Spenderorgan anbieten zu können.

Im Rahmen des ESP werden Organe von Spendern mit einem Lebensalter ab 65 Jahren Empfängern in der gleichen Altersgruppe angeboten. Um trotz dieser besonderen Umstände eine Transplantatfunktion zu gewährleisten, werden die Organe mit möglichst kurzer Kaltischämiezeit und in Deutschland nur im regionalen Umfeld vergeben.

Es gelang die Wartezeit von Patienten dieser Altersklasse zu verringern und die Anzahl der Spender über 65 Jahre zu verdoppeln. Die Kaltischämiezeit konnte verringert werden. Das Patienten- und Transplantatüberleben wurde durch die ESP – Zuteilung nicht negativ beeinflusst [13].

Das ESP ist eine effektive Methode älteren Patienten, die zuvor auf Grund der schlechteren Prognose nicht auf die Wartelisten genommen wurden, eine Transplantation anbieten zu können. Des Weiteren zeigte sich, dass trotz der schlechteren Voraussetzungen gute Ergebnisse erzielt werden konnten. Ältere Spenderorgane bieten somit unter bestimmten Bedingungen durchaus eine zufriedenstellende Funktion.

Es stellt sich die Frage, warum einige Organe trotz hohen chronologischen Alters über längere Zeit eine gute Funktion aufrecht erhalten können und andere versagen.

1.2 Transplantatfunktion und zelluläre Seneszenz

Die häufigste Ursache für ein Transplantatversagen und damit die erneute Dialysebehandlung ist die Chronische Transplantatnephropathie (*chronic allograft nephropathy*, CAN) [36].

Bei CAN kommt es zu Veränderungen, die auch Teil des normalen Alterungsprozesses in der Niere sind. Es finden sich ein Funktionsverlust und unspezifische histopathologische Veränderungen wie tubuläre Atrophie, interstitielle Fibrose und Glomerulosklerose [18].

Basierend auf diesen Beobachtungen wurde die Hypothese entwickelt, dass die Ursache für CAN und damit das Transplantatversagen in einer beschleunigten Alterung des transplantierten Organs zu suchen ist. Die Persistenz seneszenten Zellen (lat. *senescere* = altern) im Organparenchym führt demnach zu einer

gestörten Organfunktion und beeinträchtigt die Fähigkeit des Gewebes Stressfaktoren zu widerstehen [18, 28].

Der Begriff der zellulären Seneszenz wurde erstmals 1961 von Hayflick und Moorhead verwendet. Sie konnten beobachten, dass humane Fibroblasten in vitro nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen in einen Ruhezustand verfallen, der sich durch den irreversiblen Stillstand der Proliferation mit noch erhaltenen physiologischen Funktionen auszeichnet [20].

Es konnte fast 30 Jahre später gezeigt werden, dass dieser heutzutage „replikative Seneszenz“ genannte Zustand eintritt, sobald die Telomere am Ende der Chromosomen durch wiederholte Replikation „verbraucht“ sind [19].

Da die meisten humanen Zellen keine Möglichkeit haben die Telomere zu regenerieren, ist ihr Potential zur Replikation begrenzt.

Haben die Telomere eine kritische Länge erreicht, löst dies ein DNA – Schadenssignal aus und führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53. P53 induziert dann die Expression des Zellzyklusinhibitors p21^{CIP1/WAF1}. p21^{CIP1/WAF1} ist ein Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen (Cyclin-dependent Kinase, CDK), deren Aktivität Voraussetzung für ein Fortschreiten des Zellzyklus ist. Die Inhibition der CDK führt zur Hypophosphorylierung und damit Aktivierung des Retinoblastomaproteins (RB), woraus der permanente Zellzyklusarrest resultiert [9, 26].

Neben der replikativen Seneszenz gibt es noch einen weiteren von der Telomerlänge unabhängigen Weg, über den zelluläre Seneszenz induziert werden kann.

Man spricht hier von „stimulation and stress-induced senescence-like arrest“ (STASIS). Durch verschiedene Belastungsfaktoren wie oxidativen Stress, metabolischen Stress oder Kontakt zu Onkogenen kommt es zur Induktion des Zellzyklusinhibitors p16^{INK4a} [22, 45]. p16^{INK4a} inhibiert die Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6, was wiederum zu Hypophosphorylierung des Retinoblastomaproteins und damit zum Zellzyklusarrest führt [38, 39, 42].

Extrinsische Faktoren können ebenfalls zur Induktion des Zellzyklusinhibitors p14^{ARF} führen, dies resultiert über einen verminderten Abbau von p53 ebenfalls in einem Stillstand des Zellzyklus [29].

P16^{INK4a} und p14^{ARF} sind Transkripte des Gens CDKN2a (Eng. Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A). Sie unterscheiden sich im ersten von insgesamt 3 Exons. Das zu p14^{ARF} gehörende Exon 1β wird an das Exon 2 gespleißt. Dadurch entsteht ein alternatives Leseraster (Eng. Alternate Reading Frame, ARF), so dass p14^{ARF} nach Translation eine vollständig von p16^{INK4a} verschiedene Aminosäuresequenz aufweist [17].

Auch wenn sich die in vitro gewonnenen Erkenntnisse möglicherweise nicht vollständig übertragen lassen, gibt es zahlreiche Hinweise, dass die geschilderten Prozesse auch in vivo relevant sind.

So lässt sich in humanen Nieren mit zunehmendem Alter eine signifikante Verkürzung der Telomere [11, 27] und eine erhöhte Expression von p16^{INK4a} nachweisen [6, 30].

Auch besteht eine inverse Korrelation zwischen der p16^{INK4a} Expression und der Proliferation renaler Zellen [30].

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die p16^{INK4a} Expression in Nieren mit glomerulären Erkrankungen und hypertensiver Nephrosklerose erhöht ist [31, 43].

Die beschriebenen Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass somatische zelluläre Seneszenz nicht nur eine Rolle im physiologischen Alterungsprozess spielt, sondern auch für renale Erkrankungen relevant ist. Belastungsfaktoren können das endliche Regenerationspotential eines Organs erschöpfen und so die Entwicklung zellulärer Seneszenz beschleunigen.

Wie bereits erwähnt könnten die Schädigungen schon vor, während und nach einer Transplantation diesen Prozess stark beschleunigen. Für das Behandlungsergebnis wäre dann weniger das chronologische Alter des Organs als vielmehr das biologische Alter entscheidend. Dies könnte erklären, warum einige Transplantate trotz hohen chronologischen Alters eine gute Funktion aufrechterhalten können und andere nicht.

Das Ausmaß der Vorschädigung bzw. das biologische Alter könnte an Hand der oben beschriebenen Biomarker wie p16^{INK4a}, p14^{ARF} und p21^{CIP1/WAF1} bestimmt werden.

Koppelstaetter et al. und McGlynn et al. konnten bereits zeigen, dass die Expression von Seneszenzmarkern mit der Organfunktion 12 Monate nach Transplantation korreliert [24, 25]. Daten für eine Langzeitbeobachtung fehlen jedoch.

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Ob dieser Zusammenhang allerdings auch im Langzeitverlauf nach Transplantation besteht, ist bisher nicht erwiesen. Gerade heute bei einer Vielzahl von Organempfängern in höherem Lebensalter und einem nach wie vor dramatischen Mangel an Spenderorganen sind Möglichkeiten zur Evaluation der Organqualität und damit einer effizienteren Nutzung von Spenderorganen relevanter denn je.

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es, die Aussagekraft der Seneszenzmarker p16^{INK4a}, p14^{ARF} und p21^{CIP1/WAF1} in Nullbiopsien zum Zeitpunkt der Transplantation als prognostische Parameter für die Organfunktion nach 24 monatigem Verlauf zu evaluieren. Des Weiteren sollen die Zusammensetzung und klinischen Parameter des hier vorliegenden Patientenkollektivs analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Studiendesign

Bei der hier durchgeführten Studie handelt es sich um eine nicht-randomisierte, retrospektive klinische Beobachtungsstudie.

Diese wurde am Universitätsklinikum Ulm in der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie sowie an der Medizinischen Hochschule Hannover im Zentrum für Kinderheilkunde, Klinik für pädiatrische Leber-, Nieren- und Stoffwechselerkrankungen und am Institut für Pathologie im Zeitraum vom Juni 2009 bis November 2010 durchgeführt.

In Ulm erfolgten die Entnahme der Biopsien zum Zeitpunkt der Transplantation (sogenannte Nullbiopsie, Zero-Hour-Biopsy) sowie die weitere Betreuung der Patienten in der chirurgischen Klinik. Die dieser Arbeit zu Grunde liegenden Patientendaten wurden aus den dort vorliegenden Krankenakten ermittelt.

Das gewonnene Biopsie - Material wurde zur weiteren Untersuchung nach Hannover übersandt. In Hannover wurden die Gewebeuntersuchungen im Institut für Pathologie durchgeführt. Alle Biopsien wurden im Rahmen der Routinediagnostik durch einen Pathologen evaluiert, die zusätzlichen Untersuchungen wurden in der Abteilung für pädiatrische Nephrologie sowie im Institut für Pathologie durchgeführt.

2.2. Ein- und Ausschlusskriterien, Rekrutierung

In das Studienkollektiv aufgenommen wurden erwachsene Patienten, bei denen im Rahmen einer Nierentransplantation an der Universitätsklinik Ulm in den Jahren 2006 - 2009 eine Implantationsbiopsie des Transplantates entnommen wurde.

Als Ein- und Ausschlusskriterien wurden demnach definiert:

Einschlusskriterien:

- Patientenalter 18 Jahre oder älter

- Nierentransplantation am Universitätsklinikum Ulm in den Jahren 2006 – 2009
- Vorhandensein einer Nullbiopsie
- Bekanntes Alter des Organspenders

Ausschlusskriterien:

- Patientenalter unter 18 Jahren
- Unbekanntes Alter des Organspenders

Zur Rekrutierung der Patienten wurde mit Hilfe der Datenbank des Pathologischen Institutes der Medizinischen Hochschule Hannover eine Liste aller aus Ulm in den Jahren 2006 – 2009 eingesandten Nierenbiopsien erstellt. Daraufhin wurden alle diese Biopsiebefunde von einem Pathologen auf das Vorliegen einer Implantationsbiopsie (Angabe in der Anforderung oder im Befundtext) untersucht. Diese Liste wurde anschließend in Ulm mit einer internen Liste der im Transplantationszentrum betreuten Patienten abgeglichen, um das Vorliegen der klinischen Daten zu gewährleisten.

2.3 Dokumentation, Datenbankentwurf & Ethikvotum

Die persönlichen Daten und klinischen Parameter der in Ulm behandelten Transplantationspatienten, die während des stationären Aufenthalts und im Rahmen der Nachsorgetermine dokumentiert wurden, sind als digitale Krankenakte im EDV-System des Uniklinikums (SAP, Walldorf, Deutschland) verfügbar. Die anonymisierten Daten der Organspender liegen in Form der „Donor Reports“ von Eurotransplant vor. Die Daten zu den Ergebnissen der Routinediagnostik der Implantationsbiopsien und eventuell durchgeführten Folgebiopsien liegen schriftlich in Form der Pathologiebefunde der MHH vor.

Um den Vergleich der Befunde aus den Implantationsbiopsien mit dem klinischen Verlauf zu ermöglichen, wurden retrospektiv die Geburtsdaten der Patienten, vorbestehende Risikofaktoren und Grunderkrankungen, Alter und medizinische Vorgeschichte der Organspender, Daten zur Operation, die Ergebnisse der histopathologischen Diagnostik von Implantations- und Folgebiopsien und die

klinischen Verlaufsparemeter ca. 3, 6, 12, 24, 36 und 48 Monate post OP erfasst. Die letzten noch erfassten Verlaufsdaten wurden im Juni 2010 erhoben. Die Datenerfassung erfolgte in pseudonymisierter Form. Eine genaue Auflistung der für diese Untersuchung in Ulm dokumentierten Parameter bietet Tabelle 7 im Anhang.

Im Rahmen der Aufklärung für die Transplantation willigten die Patientin auch in die Durchführung der Implantationsbiopsie ein und stimmten einer eventuellen Verwendung des überschüssigen Gewebes für wissenschaftliche Untersuchungen zu. Das Studienprotokoll wurde durch die Ethikkommissionen sowohl der Medizinischen Hochschule Hannover (Ethikvotum Nr. 5346 vom 15.06.2009) als auch der Universität Ulm (Ethikvotum Nr. 298/09 vom 09.12.2009) geprüft und genehmigt.

2.4 Gewinnung der Biopsie, Therapieregime, Präparataufarbeitung und Histologische Technik

2.4.1 Biopsieentnahme und Therapieregime

Die Biopsieentnahme erfolgte nach Implantation der Spenderniere zwischen 15 und 30 Minuten nach Reperfusion. Es wurde ein 8 – 10 mm langer und 3 mm breiter Parenchymkeil im Bereich des unteren Nierenpols entnommen. Die Gewebeprobe wurde anschließend in Formalinlösung fixiert und zur histologischen Aufarbeitung und Begutachtung an das pathologische Institut der MHH versandt.

Die postoperative immunsuppressive Therapie wurde in der Regel mit einer 3-fach Kombination bestehend aus Tacrolimus, Mycophenolsäure und Glucocorticoiden durchgeführt. Die Entscheidung zur Gabe einer Induktionstherapie mit Thymoglobulin oder Interleukin-2 Rezeptorantagonisten oblag dem behandelnden Chirurgen.

Die laborchemischen Untersuchungen wurden durch das Institut für klinische Chemie der Universitätsklinik Ulm durchgeführt (Kreatininbestimmung nach Jaffé, Siemens Dimension RxL) [40].

2.4.2 Verwendete Materialien

Paraffin	Medite Tissue Wax (56-58 °C), Medite, Burgdorf, Germany
Xylol	Baker, Holland
Hämatoxylin	Riedel, Deutschland
Natirumjodat	Applichem
Kaliumaluminiumsulfat-12- hydrat	Applichem
Chloralhydrat	Sigma Aldrich
Citronensäuremonohydrat	Merck
Eukit	O. Kindler GmbH & Co.
Masson Trichrom Färbung	Masson Trichrome Staining Kit, Sigma Aldrich

Hämalaun nach P. Mayer (Hämatoxylin):

1 g Hämatoxylin in 1000 ml dest. Wasser lösen

0,2 g Natriumjodat hinzufügen

50 g chemisch reines Kalialaun (Kaliumaluminiumsulfat-12-hydrat) dazugeben und erwärmen

Nach dem Erkalten 50 g Chloralhydrat und 1 g kristalline Citronensäuremonohydrat dazugeben und lösen, danach filtrieren.

2.4.3 Präparataufarbeitung und Histologische Technik

Die folgenden Arbeitsschritte wurden an der Medizinischen Hochschule Hannover im Institut für Pathologie durchgeführt.

Nach Eintreffen des versandten Materials in Formalinlösung in Hannover erfolgte die Überführung in 70%iges Ethanol und Inkubation für 24 Stunden. Anschließend wurde das Gewebe nacheinander in 96%igem Ethanol für 2 x 30 Minuten, 99%igem Ethanol für 2 x 45 Minuten und in Xylol für 45 Minuten inkubiert. Dies gewährleistete die für die Einbettung in Paraffin nötige Entwässerung des Gewebes und die Extraktion der Lipide.

Um die für die lichtmikroskopische Beurteilung nötigen Schnitte herstellen zu können, erfolgte die Einbettung in Paraffin.

Ein auf 55°C vorgewärmtes Metallschälchen wurde auf die auf 60°C geheizte Arbeitsplatte des Einbettungsgerätes gestellt und der Boden des Schälchens mit einer dünnen Schicht Paraffin gefüllt, die man kurz erkalten ließ. Anschließend wurde die Gewebeprobe hineingelegt und das Schälchen mit Paraffin aufgefüllt. Nach Abkühlung und Herauslösen aus dem Schälchen wurde der hergestellte Block bei 4°C gelagert.

Im nächsten Schritt wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (Mikrotom Typ 2040, Reichert-Jung) 3 µm dicke Schnitte vom Paraffinblock angefertigt. Diese wurden dann auf Objektträger gezogen und getrocknet.

2.4.4 Periodic Acid Schiff (PAS)-Färbung

Die PAS-Färbung dient der Darstellung von Polysacchariden, Glykoproteinen, Muzinen und Glykolipiden, welche durch Reaktion mit Perjodsäure (HI₀₄) und Schiff-Reagenz (= farblose fuchsinschweflige Säure) purpurrot angefärbt werden.

Zunächst erfolgte die Entparaffinierung mittels Xylol, die Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70% Ethanol) sowie gründliche Spülung mit Aqua dest.. Zur Färbung wurden die Objektträger 5 Minuten lang in 1%ige-Perjodsäure-Lösung (Merck) gestellt und anschließend nach Spülung mit Aqua dest. 25 Minuten mit Schiff-Reagenz (Sigma) behandelt. Anschließend erfolgte nach erneuter Spülung mit Leitungswasser und Aqua dest. eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 40 Minuten und Bläuen in Leitungswasser für 10 Minuten. Abschließend wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%iges, 96%iges, 100%iges Ethanol) sowie Xylol behandelt und mit Eukit eingebettet.

2.4.5 Masson – Trichrom - Färbung

Die weiteren Färbungen wurden im Labor der Arbeitsgruppe Interdisziplinäre Transplantationsmedizin der Klinik für pädiatrische Nierenerkrankungen der MHH durchgeführt.

Die Masson – Trichrom – Färbung dient der quantitativen Beurteilung der interstitiellen Fibrose, da das enthaltene Anilinblau Kollagenfasern blau anfärbt.

Zunächst erfolgte die Entparaffinierung mittels Xylol, die Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70% Ethanol) sowie gründliche Spülung mit Aqua dest. Die Schnitte wurden 60 Minuten lang mit Bouin-Lösung behandelt und mit Leitungswasser und Aqua dest. gespült. Im nächsten Schritt wurde 2 Minuten lang mit Hämatoxylin gefärbt und erneut mit Leitungswasser und Aqua dest. gespült. Anschließend wurde 5 Sekunden lang mit Säurefuchsin angefärbt, mit Aqua dest. ausgewaschen und die Schnitte 5 Minuten lang mit Phosphorsäure behandelt, um das Herausdiffundieren des roten Farbstoffes aus dem Kollagen zu erreichen. Zur Färbung der Kollagenfasern wurde ein 15-minütiges Anilinblaubad durchgeführt und dann 10 Sekunden mit Essigsäure entfärbt. Abschließend wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden

Alkoholreihe (70%iges, 96%iges, 100%iges Ethanol) sowie Xylol behandelt und mit Eukit eingebettet.

Auswertung Masson – Trichrom

Zur Auswertung wurden von jedem gefärbten Schnitt jeweils 10 hochauflösende Photographien in 400-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Bilder wurden mit mindestens einem Gesichtsfeld Abstand zur Nierenkapsel aufgenommen und zeigten keine Überschneidungen.

Diese Bilder wurden anschließend mit Hilfe des Leica QWin-Programms Version V3.0 ausgewertet. Die visuell als positiv erkannten Blautöne wurden markiert. Das Programm bestimmte anschließend den Anteil entsprechend gefärbter Pixel in der Photographie. Gewebeanteile, die nicht dem Interstitium zugehörten wie Glomerula, wurden hierbei außer Acht gelassen, so dass das Ergebnis dem prozentualen Fibroseanteil im Interstitium entspricht.

2.4.6 KI – 67 – AK – Färbung

Der Antikörper KI – 67 bindet an ein Epitop, das nur in den Kernen proliferierender Zellen vorkommt. Daher ermöglicht die Färbung eine Unterscheidung von ruhenden (G0 – Phase) und proliferierenden (G1 -, S -, G2 – und M – Phase) Zellen [15, 16].

Zunächst erfolgte die Entparaffinierung mittels Xylol, die Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70% Ethanol) sowie gründliche Spülung mit Aqua dest. Zur Demaskierung der Antigene wurden die Schnitte für 5 Minuten in Citratpuffer auf 125°C erwärmt (Dako Pascal). Zur Inaktivierung endogener Peroxidasen wurde mit einer Mischung aus Wasserstoffperoxid (3%) und Methanol behandelt und anschließend mit Wasser gespült. Um Reaktionsfelder für den spezifischen Antikörper und die Negativkontrolle (Isotypenkontrolle) zu erhalten, wurde mit einem Fettstift (PAP – Pen) eine Trennlinie zwischen den Gewebeschnitten auf dem Objektträger

gezogen. Anschließend wurden die Schnitte über 20 Minuten mit Universal Blocking Reagent (BioGenex) behandelt. Es erfolgte dann die Zugabe des Antikörpers für Ki - 67 (MIB-9, 190 mg/ml in einer Verdünnung von 1:25) sowie der Isotypenkontrolle (Maus-AK IgG_{2a}: 250 µg/ml: 1.6 in 800 µl antibody diluting buffer) für 60 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte mit phosphatgepufferter Salzlösung (Phosphate-buffered Saline, PBS) gewaschen, dann für 30 Minuten in einer feuchten Kammer mit dem Sekundärantikörper (EnVision+, Dako Cytomation GmbH) inkubiert und erneut mit PBS gewaschen. Nun erfolgte die Inkubation mit Diaminobenzidin (Dako Cytomation GmbH) für 5 Minuten zur optischen Darstellung des Sekundärantikörpers. Zur besseren Kontrastierung wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 5 Minuten durchgeführt. Nach Bläuen unter fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte abschließend mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100% Ethanol) sowie Xylol behandelt und mit Eukit eingebettet.

Auswertung KI – 67 Färbung

Zur Auswertung der erstellten Färbungen wurden von den Präparaten jeweils 10 Photographien in 400-facher Vergrößerung angefertigt. Es wurden glomeruläre, tubuläre, vaskuläre und interstitielle Zellen separat betrachtet und für jedes zelluläre Kompartiment die Anzahl KI – 67 positiver Zellen sowie die absolute Anzahl von Zellen bestimmt. Anschließend wurde der prozentuale Anteil proliferierender Zellen für das jeweilige Kompartiment berechnet.

2.4.7 H2AX – AK – Färbung

Die H2AX – AK – Färbung wurde an der Universität Newcastle, Newcastle upon Tyne, England im Institute for Ageing and Health durchgeführt.

Im Falle von DNA – Doppelstrangbrüchen kommt es zur Phosphorylierung der Histonvariante H2AX. Der hier verwendete Antikörper bindet an die

phosphorylierte Form des Proteins und ermöglicht die Identifikation solcherart geschädigter Zellen an Hand der positiv gefärbten Zellkerne.

Es erfolgte die Entparaffinierung mittels HistoClear (National Diagnostics) und Rehydrierung der Schnitte mit 100% Methanol und Aqua dest. Zur Demaskierung der Antigene wurden die Schnitte in Citratpuffer 14 Minuten lang erwärmt und mit Aqua dest. gespült. Anschließend wurde das Untersuchungsmaterial für 20 Minuten mit PBS plus 0,1% Tween und 30 Minuten mit Blocking Reagent (VECTASTAIN Elite ABC Kit, Vector Laboratories) behandelt. Die Schnitte wurden dann mit dem Primär – Antikörper für H2AX (1:250, Phospho-Histone H2A.X (Ser139) (20E3) Rabbit Antibody) über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend mit PBS und Wasser gewaschen. Zur Inaktivierung endogener Peroxidasen wurde Wasserstoffperoxid (0,9%) in Wasser angewendet und dann mit Wasser gespült. Anschließend wurde der Sekundärantikörper (Biotinylated goat Anti-rabbit IgG Reagent, VECTASTAIN Elite ABC Kit, Vector Laboratories) angewendet und die Schnitte 30 Minuten inkubiert. Es wurde erneut mit PBS gewaschen. Daraufhin wurde mit AB – Komplex – Lösung (20µl reagent A und 20µl reagent B in 1ml PBS, VECTASTAIN Elite ABC Kit, Vector Laboratories) für 30 Minuten inkubiert und im Anschluss mit PBS gewaschen. Nun erfolgte die Inkubation mit DAB für bis zu 7 Minuten visueller Kontrolle zur optischen Darstellung des Sekundärantikörpers. Zur besseren Kontrastierung wurde eine Färbung mit Hämatoxylin für durchgeführt. Nach Bläuen unter fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte abschließend mit Ethanol und HistoClear dehydriert und mit DPX eingebettet.

Auswertung H2AX – AK – Färbung

Zur Auswertung der erstellten Färbungen wurden von den Präparaten jeweils 10 Photographien in 400-facher Vergrößerung angefertigt. Es wurden glomeruläre, tubuläre, vaskuläre und interstitielle Zellen separat betrachtet und für jedes zelluläre Kompartiment die Anzahl H2AX positiver Zellen sowie die absolute Anzahl von Zellen bestimmt. Anschließend wurde der prozentuale Anteil H2AX – positiver Zellkerne für das jeweilige Kompartiment berechnet.

2.5 RNA Extraktion und RT-PCR aus formalin-fixiertem Gewebe

Die folgenden unter 2.5 beschriebenen Schritte erfolgten im Labor von Professor Bock im pathologischen Institut der MHH.

2.5.1 RNA – Extraktion aus formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe [4]

Es wurden zunächst 10 Schnitte von 15µm Dicke vom Paraffinblock angefertigt und diese anschließend über Nacht bei 55°C mit 750 µl „Digestion Solution“ (4,2M Guanidin-Thiocyanat (Fluka), 30 mM Tris – HCL pH 7,6 (Applichem), 2% Na – N – Laury – Sarcosin (Fluka)), 5,5 µl Mercaptoethanol (Merck) und 300 µl Proteinase K (20 mg/ml, Merck) inkubiert. Nach Zentrifugieren bei 13.000 rpm und 4°C für 5 Minuten wurden 950 µl der verdauten Lösung in ein neues Probenröhrchen überführt und 100 µl 3M Na – Acetat pH 5,2, 630 µl saures, wassergesättigtes Phenol (Aqua – Roti – Phenol, Roth) und 270 µl Chloroform (J.T. Baker) hinzupipettiert. Zur Phasentrennung wurde die Lösung 15 Minuten auf Eis stehen gelassen und anschließend 20 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. 950 µl des wässrigen Überstandes wurden abgenommen und zusammen mit 1 µl Glykogen – Lösung (20 mg/ml, Roche) und 950 µl Isopropanol (Merck) zur Fällung über Nacht bei 20°C gelagert.

Nach Zentrifugieren für 20 Minuten mit 13.000 rpm bei 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Pellet gesichert. Es wurden dann 300 µl 70%iges Ethanol dazupipettiert und nach Zentrifugieren für 5 Minuten mit 13000 rpm bei 4 °C erneut der Überstand abgenommen ,verworfen und das Pellet dann für 5 Minuten luftgetrocknet. Das Pellet wurde anschließend je nach Größe in 20 – 40 µl 0,2% DEPC/H₂O (Diethyl – pyrocarbonat (DEPC), Fluka) gelöst. Zur Konzentrationsberechnung der RNA nach dem Lambert – Beerschen Gesetz wurde die Extinktion bei 260nm photometrisch bestimmt.

2.5.2 Complementary DNA (cDNA) - Synthese

Aus der zuvor isolierten RNA werden in diesem Schritt mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase entsprechende DNA Kopien hergestellt.

Zunächst wurde ein „Mastermix“ hergestellt, der die für die Reaktion nötigen Substanzen enthält. Es wurden hierfür 2 µl RT Buffer, 0,8 µl Desoxynukleotidtriphosphat – Mix (100 mM), 2,0 µl RT Random Primer, 1,0 µl RNAse Inhibitor, 3,2 µl Wasser/Diethyl – pyrocarbonat – Lösung, sowie das Enzym MultiScribe Reverse Transkriptase (1,0 µl, 50 U/µl) (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems) angesetzt. Es wurden je 10 µl des „Mastermix“ und 10 µl der im letzten Schritt gewonnenen RNA in DEPC/H₂O in einem Probenröhrchen vermischt. Die eigentliche Synthese erfolgte in einem PCR – Cyclus (TPersonal 48 Thermocycler, Biometra GmbH) in folgenden Schritten:

1. Inkubation bei 25 °C für 10 Minuten
2. Inkubation bei 37 °C für 120 Minuten
3. Polymerisation bei 85 °C für 5 Minuten
4. Abkühlen auf 4 °C

Die Proben wurden dann bei -20 °C gelagert.

2.5.3 Prä – Amplifikation und Quantitative Real-time-Polymerase Chain Reaction (PCR)

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1)	
Forward Primer	5' GACTTTGCTTTCCTTGGTCAGG 3'
Reverse Primer	5' AGTCTGGCTTATATCCAACACTTGG 3'
Sonde	5' TTTCACCAGCAAGCTTGCGACCTTGA 3'
polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A (POLR2A)	
Forward Primer	Applied Biosystems, Assay ID Hs00172187_m1

Reverse Primer	
Sonde	
cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, Isoform 4 (CDKN2A, p14)	
Forward Primer	Applied Biosystems, Assay ID Hs99999189_m1
Reverse Primer	
Sonde	
cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, Isoform 1 (CDKN2A, p16)	
Forward Primer	5' CCAACGCACCGAATAGTTACG 3'
Reverse Primer	5' CACTCGGGCGCTGCC 3'
Sonde	5' CATGACCTGGATCGGCCTCCGA 3'
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A, p21, Cip1)	
Forward Primer	Applied Biosystems, Assay ID Hs00355782_m1
Reverse Primer	
Sonde	

Um die Menge der für die PCR zur Verfügung stehenden cDNA zu erhöhen wurde zunächst eine Prä-Amplifikation durchgeführt. Es wurde ein sogenannter Primer-Pool angesetzt, der alle benötigten Primer und Sonden (POLR2A, HPRT1, CDKN1A, CDKN2A Isoform 4, CDKN2A Isoform 1) der Zielgene enthielt. Für die Reaktion wurden ein Master Mix (TaqMan PreAmp Master Mix Kit, Applied Biosystems), die benötigten Primer, Aqua dest. sowie die zu vervielfältigenden cDNA Proben in ein Probenröhrchen pipetiert. Die Prä-Amplifikation wurde in einem PCR-Cycler (TPersonal 48 Thermocycler, Biometra GmbH) mit folgendem Programm durchgeführt:

1. 10 Minuten bei 95 °C zur Aktivierung des Enzyms
2. 14 Zyklen
 - 95 °C für 15 Sekunden zur Denaturierung
 - 60 °C für 4 Minuten zur Hybridisierung und Elongation

Die quantitative real-time PCR ermöglicht die Vervielfältigung von Nukleinsäuren und mit Hilfe einer sequenzspezifischen fluoreszenzmarkierten Sonde die kontinuierliche Quantifizierung eines PCR – Produktes. Das von der Sonde abgegebene Lichtsignal ist hierbei proportional zur vorhandenen Menge der gesuchten Sequenz.

Der Versuchsaufbau war für alle untersuchten Gene identisch, es wurden lediglich die unterschiedlichen Primer und Sonden verwendet. Als Referenz für die Berechnung der Genexpression diente POLR2A.

Zunächst wurde eine Lösung aus den spezifischen Primern und Sonden, Aqua dest. und den benötigten Enzyme und Substraten (TaqMan Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems) hergestellt. Dann wurde die TaqMan – Platte in Doppelbestimmung belegt, in jedes Feld wurden 5 µl der 1:10 verdünnten präamplifizierten cDNA und 15 µl der entsprechenden Mastermix – Lösung gegeben. Die Platte wurde dann mit einer Folie verschlossen und 5 Sekunden zentrifugiert.

Die Amplifikation erfolgte dann in einem PCR Cyclyer (ABI PRISM 7500, Applied Biosystems) mit folgendem Programm:

- 2 Minuten bei 50 °C
- 10 Minuten bei 95 °C zur Enzymaktivierung
- 45 Zyklen mit 95 °C für 15 Sekunden zur Denaturierung
 60 °C für 1 Minute zur Hybridisierung und
 Extension

2.5.4 Bestimmung der relativen Genexpression

Mit Hilfe der Delta-Delta- C_T (dd C_T)-Methode erfolgte die Berechnung der relativen Genexpression. Zunächst wurde der C_T -Wert (*cycle threshold* = „Schwellenwertzyklus“) ermittelt, welcher den PCR-Zyklus darstellt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Dann wurden die C_T -Werte der Zielgene (p16^{INK4a}, p14^{ARF} und p21^{CIP1/WAF1}) von den C_T -Werten der Kontrolle POLR2A subtrahiert. Das so ermittelte d C_T musste abermals von dem Mittelwert der Pool-d C_T -Werte abgezogen werden. Zuletzt wurde das

Ergebnis logarithmiert und der Mittelwert aus den Doppelbestimmungen berechnet. Die Auswertung der Quantifizierung erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel.

Formel (nach Pfaffl):

$$dC_T = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Referenzgen (HPRT)}$$

$$ddC_T = dC_T \text{ Proben} - dC_T \text{ Kontrolle (Pool)}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-ddC_T}$$

2.6 Auswertung & Statistik

Zur Datenanalyse wurde das Programm SPSS Statistics in der Version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) verwendet.

Zum Vergleich von Häufigkeiten in verschiedenen Gruppen wurde Fisher's exakter Test angewandt. Die Mittelwerte verschiedener Gruppen wurden mit Hilfe des T-Tests verglichen. Bei fehlender Normalverteilung kam der U-Test nach Mann und Whitney zum Einsatz. Zur Korrelationsanalyse wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. Zur Beschreibung von Zusammenhängen zwischen 2 quantitativen Merkmalen wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt.

P – Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet. Alle Werte wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung oder Median \pm Standardabweichung angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Es wurden 58 Patienten eingeschlossen. Es konnten 41 männliche und 17 weibliche Patienten mit einem mittleren Alter bei Transplantation von 53,5 ($\pm 13,8$) Jahren untersucht werden. Das mittlere Körpergewicht betrug zum Zeitpunkt der Operation 73,6 ($\pm 14,3$) kg, der BMI im Mittel 24,9 ($\pm 3,9$). Eine Darstellung der geschlechtsabhängigen Altersverteilung bietet Abbildung 2.

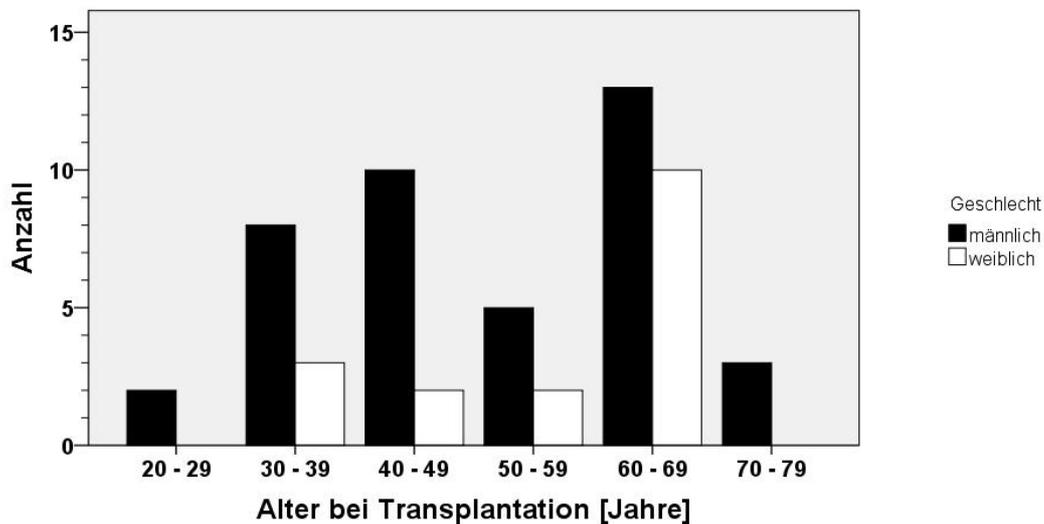


Abbildung 2: Geschlechtsabhängige Altersverteilung bei 58 Studienpatienten zum Zeitpunkt der Transplantation

In vielen Fällen ließ sich die renale Grunderkrankung, die schließlich zum Nierenversagen und damit zur Transplantation führte, nicht eindeutig diagnostisch einordnen. Tabelle 2 gibt eine Übersicht der Erkrankungen in der hier untersuchten Studienpopulation.

57 der untersuchten Patienten wurden vor der Transplantation mit einem Nierenersatzverfahren behandelt. Bei 51 Patienten (87,9%) kam die Hämodialyse, bei 5 (8,6%) Peritonealdialyse zum Einsatz, bei einem (1,7%) weiteren Patienten lag über die Form der Dialyse keine Dokumentation vor. Im Mittel verbrachten die Patienten 2077 (± 1218) Tage (5 Jahre und 5 ½ Monate) an der Dialyse.

Tabelle 2: Übersicht der zum Nierenversagen führenden Grunderkrankungen bei 58 Studienpatienten

Renale Grunderkrankung	Anzahl
IgA Glomerulonephritis	5
Membranöse Glomerulonephritis	1
Membranoproliferative Glomerulonephritis	5
Postinfektiöse Glomerulonephritis	1
Nicht klassifizierte rapid progressive Glomerulonephritis	1
Lupus Nephritis	1
Schoenlein-Henoch Glomerulonephritis	1
Andere nicht klassifizierte Glomerulonephritis	1
Chronische Pyelonephritis/Tubulointerstitielle Nephritis	4
Hypertensive Nephropathie	1
Diabetische Nephropathie	3
Polyzystische Nierenerkrankung	8
Kongenitale metabolische Erkrankungen	1
Nephrektomie	1
Medikamenten-/Toxin-induziertes Nierenversagen	3
Niereninsuffizienz unbekannter Ursache	21

Bei allen 58 hier untersuchten Patienten (100%) wurde vor Transplantation eine arterielle Hypertonie diagnostiziert. 27 Patienten (46,6%) litten zusätzlich unter einer Gefäßerkrankung (kardiovaskuläre, zerebrovaskuläre Erkrankungen, periphere arterielle Verschlusskrankheit). Bei 7 Patienten (12,1%) fand sich ein Diabetes mellitus. 12 Patienten (20,7%) waren zum Zeitpunkt der Transplantation

Raucher, bei 5 Patienten (8,6%) lagen hierzu keine Angaben vor. Adipös (BMI > 30 kg/m²) waren 6 Patienten (10,3%).

Bei 23 Patienten (39,7%) konnte nur ein Risikofaktor festgestellt werden, bei 22 Patienten (37,9%) 2 gleichzeitig vorliegende Risikofaktoren, bei 9 Patienten (15,5%) 3 Risikofaktoren und bei 4 Patienten (6,9%) 4 Risikofaktoren.

Von den 58 hier untersuchten transplantierten Organen stammten 51 (87,9%) von postmortalen und 7 (12,1%) von Lebendspendern. Unter den Organspendern waren die häufigsten Todesursachen hier nicht traumatische intrakranielle Blutungen (35/51, 69%), gefolgt von Traumata (11/51, 21,6%) und kardialen oder zerebralen Infarkten (3/51, 5,8%), bei 2 Organspendern (2/51, 3,9%) war die Ursache nicht zu ermitteln.

Es wurden Organe von 27 weiblichen und 31 männlichen Organspender mit einem mittleren Alter von 53,6 ($\pm 15,2$, 17 – 79) Jahren transplantiert. Einen Überblick über die geschlechtsabhängige Altersverteilung bietet Abbildung 3. Von den 7 Lebendspendern waren 4 weiblich (57%) und 3 männlich (43%), das mittlere Alter betrug hier 52 (± 14 , 30 - 69) Jahre.

Das mittlere Körpergewicht der Spender betrug 73,6 ($\pm 14,3$) kg, der mittlere BMI 24,9 ($\pm 3,9$). Der letzte vor Transplantation gemessene Kreatinin – Wert lag im Mittel bei 82,2 ($\pm 22,7$) $\mu\text{mol/l}$. Die mittlere Kaltischämiezeit bei allen Transplantationen betrug 12,83 ($\pm 6,9$, Lebendspende 1,6 \pm 0,5, verstorbene Organspender 14,4 \pm 5,9) Stunden, die mittlere Warmischämiezeit 27,9 ($\pm 8,3$) Minuten. Die Gesamtzahl der HLA – Mismatches lag durchschnittlich bei 2,47 ($\pm 1,7$).

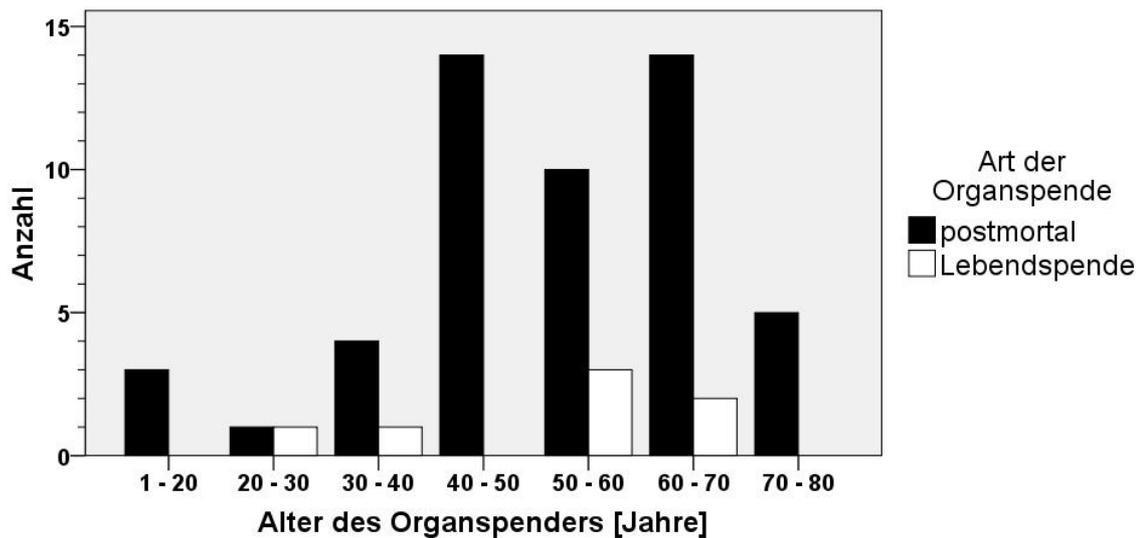


Abbildung 3: Altersverteilung bei 58 Organspendern unterteilt nach Art der Organspende (postmortal oder Lebenspende)

Einen Überblick über die Risikofaktoren der 51 untersuchten postmortalen Organspender geben Tabelle 3 und Abbildung 4.

Tabelle 3: Kardiovaskuläre Risikofaktoren bei 51 untersuchten postmortalen Organspendern

Risikofaktor	Anzahl / Prozent / Status unbekannt
Gefäßerkrankung	16 / 31,4% / 1
Arterielle Hypertonie	20 / 39,2% / 1
Diabetes mellitus	5 / 9,8% / 1
Adipositas	9 / 17,6% / 0
Nikotin Missbrauch	14 / 27,5% / 6

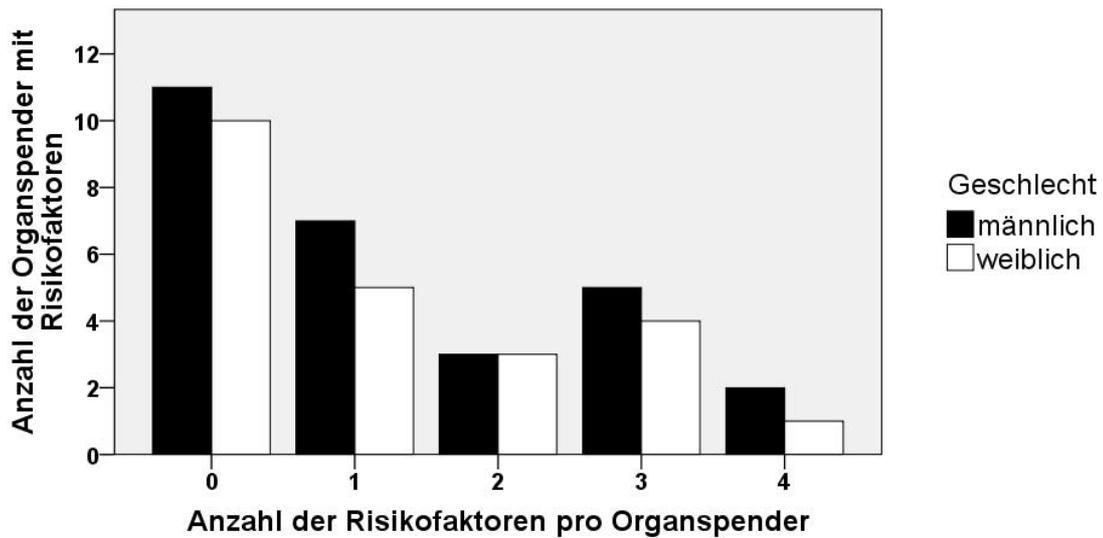


Abbildung 4: Geschlechterabhängiger Überblick der Anzahl der kardiovaskulären Risikofaktoren bei 51 postmortalen Organspendern

3.2. Patientendaten und klinischer Verlauf

Die durchschnittliche Dauer der Verlaufsbeobachtung bei 58 Patienten betrug 682 (± 348 Min: 10 Max: 1492) Tage. Abbildung 5 gibt einen Überblick über die Beobachtungsdauer, die genaue Anzahl der Patienten an jedem Kontrolltermin ist in Tabelle 4 aufgelistet. Für einen Patienten (1,7%) lagen nur unzureichende Verlaufsdaten vor. 5 Patienten (8,6%) verstarben während des Beobachtungszeitraums (Todesursachen: 2 im Rahmen einer Sepsis postoperativ, 1 kardiale Ursache 1 Monat nach Transplantation, 1 Sepsis 6 Monate nach Transplantation, 1 Lungenembolie 6 Monate nach Transplantation), es traten zusätzlich 3 Fälle von Transplantatversagen auf (nach 10, 105, 169 Tagen).



Abbildung 5: Überblick der Beobachtungsdauer im Verlauf bei 58 untersuchten Patienten, Patienten mit Transplantatversagen (8, 9, 45) sind grau markiert, Patienten, die während des Beobachtungszeitraumes verstarben, schwarz. Bei Patient 45 trat bereits am ersten postoperativen Tag ein Transplantatversagen auf.

Tabelle 4: Anzahl der Patienten zu jedem Kontrolltermin im Beobachtungszeitraum, Anzahl der Patienten mit Transplantatversagen und verstorbene Patienten sind angegeben.

Zeitpunkt	Anzahl der Patienten (Transplantatversagen / verstorben)
Studieneinschluss	58
Kontrolltermin nach 3 Monaten	51(3 / 3)
Kontrolltermin nach 6 Monaten	48 (3 / 5)
Kontrolltermin nach 12 Monaten	48 (3 / 5)
Kontrolltermin nach 24 Monaten	38 (3 / 5)
Kontrolltermin nach 36 Monaten	18 (3 / 5)
Kontrolltermin nach 48 Monaten	6 (3 / 5)

Die Abbildungen 6 und 7 bieten Kaplan - Meier Kurven für Gesamtüberleben und Transplantatfunktion. Bei 52 Patienten wurde eine Induktionstherapie (50 (86,2%) ATG, 2 (3,4%) IL-2-Antikörper) durchgeführt. Bei Krankenhausentlassung erfolgte die immunsuppressive Therapie mit Calcineurin-Inhibitoren (9 Ciclosporin A, 46 Tacrolimus) oder Rapamycin (1) in Kombination mit Mycophenolat-Mofetil und Steroiden.

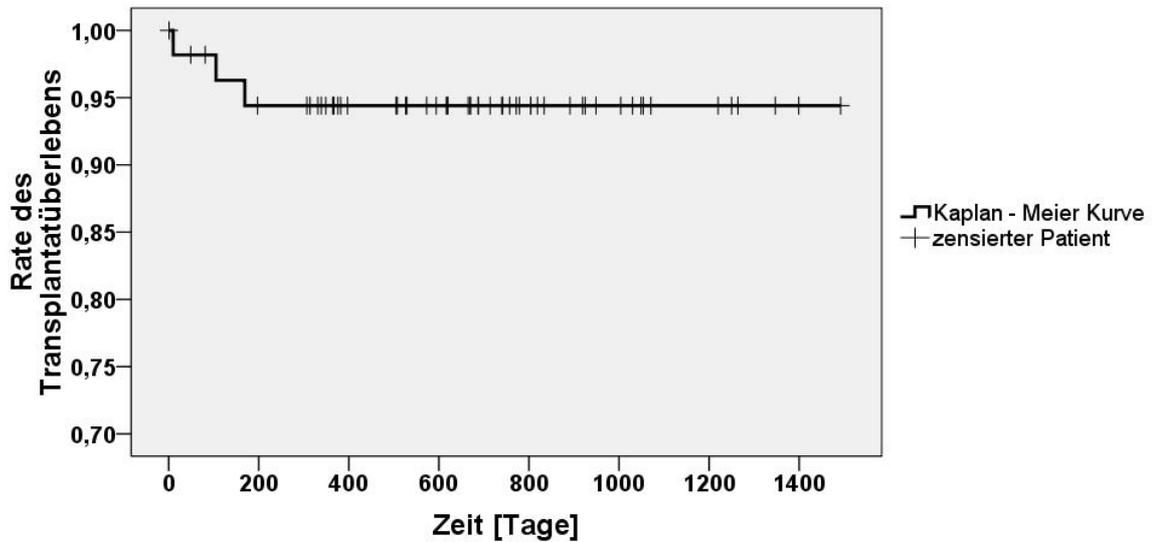


Abbildung 6: Kaplan – Meier Kurve des Transplantatüberlebens im zeitlichen Verlauf in Tagen

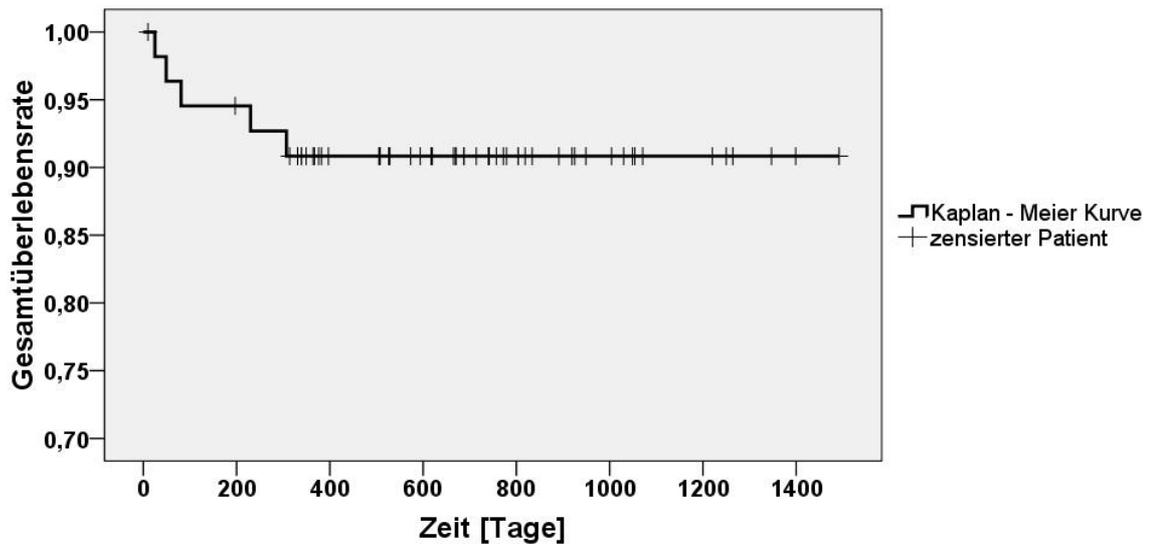


Abbildung 7: Kaplan – Meier Kurve des Gesamtüberlebens im zeitlichen Verlauf in Tagen

In 7 (12%) Fällen kam es initial nicht zu einer spontanen Transplantatfunktion (<500ml in den ersten 24h), in 2 dieser Fälle kam es auch im Verlauf zu keiner Transplantatfunktion, zusätzlich verstarb einer der Patienten ohne initiale Transplantatfunktion an den Komplikationen einer postoperativen Sepsis.

Der Kreatininwert zum Zeitpunkt der Kontrolle nach 3 Monaten lag im Mittel bei 191 (± 137 , Min: 66 Max: 1016) $\mu\text{mol/l}$, nach 6 Monaten bei 162 (± 65 , Min: 59 Max: 378) $\mu\text{mol/l}$, nach 12 Monaten 160 (± 56 , Min: 62 Max: 331) $\mu\text{mol/l}$, nach 24 Monaten 160 (± 60 , Min: 73 Max: 343) $\mu\text{mol/l}$, nach 36 Monaten bei 186 (± 91 , Min: 66 Max: 371) $\mu\text{mol/l}$, nach 48 Monaten bei 156 (± 108 , Min: 75 Max: 365).

Während des Beobachtungszeitraums erkrankten 7 Patienten (12,1%) neu an einer Gefäßerkrankung (kardiovaskuläre, zerebrovaskuläre Erkrankungen, periphere arterielle Verschlusskrankheit). Bei 6 Patienten (10,3%) trat ein Diabetes mellitus neu auf, 5 dieser Patienten wurden mit Tacrolimus behandelt. 23 Patienten (39,7%) erkrankten an einem Harnwegsinfekt, 13 Patienten (22,4%) an einer Sepsis. Bei einem Patienten (1,7%) trat eine Tumorerkrankung (Basaliom) neu auf.

Es fanden sich statistisch signifikante Zusammenhänge (Korrelationskoeffizient nach Spearman) zwischen dem Spenderalter und den Kreatininwerten als Marker der Transplantatfunktion bei Krankenhausentlassung ($p=0,013$), nach 3 Monaten ($p=0,006$), nach 12 Monaten ($p=0,005$), nach 24 Monaten ($p=0,027$) und nach 36 Monaten ($p=0,014$). Für den Wert nach 6 Monaten ergab sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p=0,054$).

Eine lineare Regressionsanalyse ergab, dass das Spenderalter 22,1% ($p=0,049$) der beobachteten Gesamtvarianz der Kreatininwerte der Patienten 36 Monate nach Transplantation erklärt. Für die Kreatininwerte nach 24 Monaten ergaben sich 15,2% ($p=0,015$). Für die Kontrolle nach 12 Monaten ein Wert von 14,2% ($p=0,009$). Einen Überblick über die Zusammenhänge bieten die Abbildungen 8, 9 und 10.

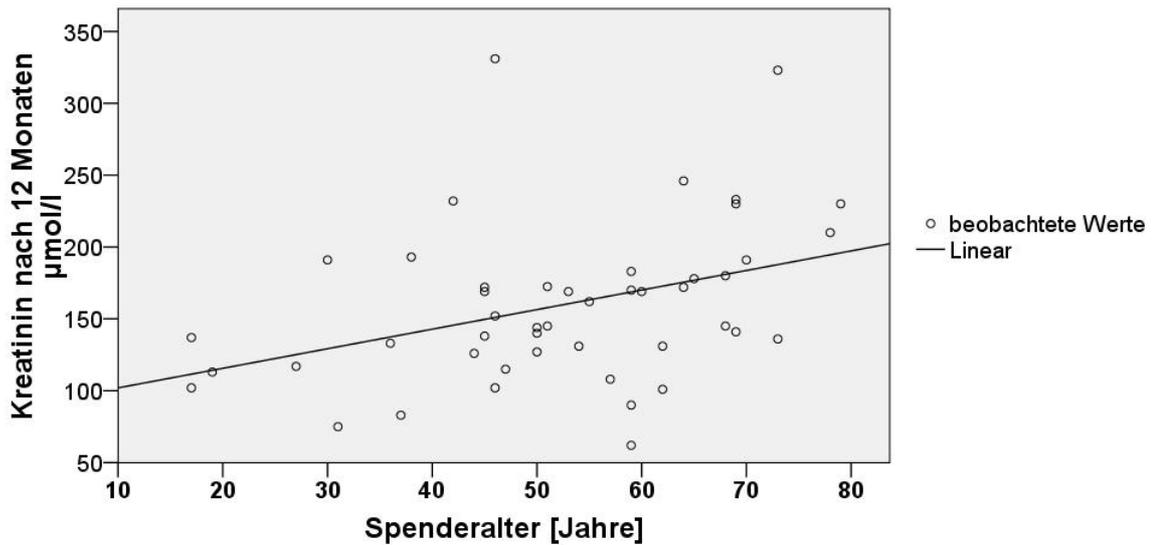


Abbildung 8: Zusammenhang zwischen Kreatinin im Serum [$\mu\text{mol/l}$] 12 Monate nach Transplantation und dem Alter des Organspenders [Jahre] mit Regressionsgerade ($r^2 = 14,2$, $p = 0,009$)

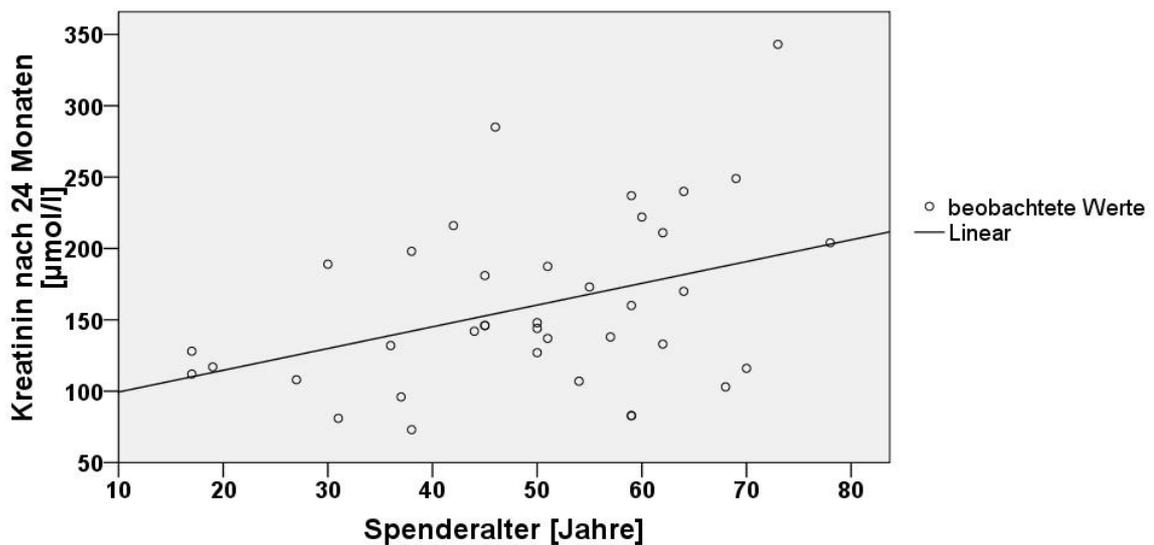


Abbildung 9: Zusammenhang zwischen Kreatinin im Serum [$\mu\text{mol/l}$] 24 Monate nach Transplantation und dem Alter des Organspenders [Jahre] mit Regressionsgerade ($r^2 = 15,2$, $p = 0,015$)

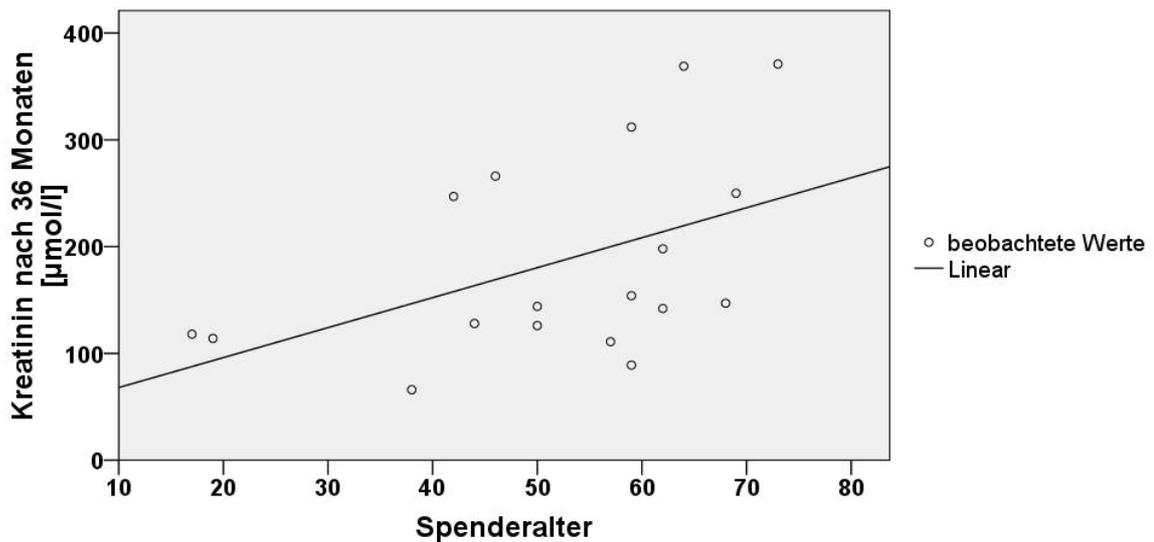


Abbildung 10: Zusammenhang zwischen Kreatinin im Serum [$\mu\text{mol/l}$] 36 Monate nach Transplantation und dem Alter des Organspenders [Jahre] mit Regressionsgerade ($r^2 = 22,1$, $p = 0,049$)

3.3 Histologie

Die für die Beurteilung im Rahmen der histopathologischen Routinediagnostik sowie der zusätzlichen für diese Studie durchgeführten Färbungen untersuchten Biopsien wurden in 48 Fällen (82,8%) als Keilexzisat und in 9 (15,5%) als Stanzbiopsie entnommen, in einem Fall ließ sich der Typ der Biopsie nicht ermitteln. 4 (6,9%) der entnommenen Biopsien waren nicht repräsentativ (weniger als 7 Glomerula und kein Gefäßanschnitt im Präparat), 2 (3,4%) eingeschränkt repräsentativ (7 – 10 Glomerula und mindestens 1 Gefäß) und 51 (87,9%) waren repräsentativ (> 10 Glomerula und mindestens 1 Gefäß).

Es wurden die Anzahl der global sklerosierten Glomerula, der atrophen Tubuli und der Schweregrad der vaskulären Veränderungen untersucht, die Ergebnisse sind in Tabelle 5 und Abbildung 11 dargestellt.

Tabelle 5: Anteil der global sklerosierten Glomerula und atrophen Tubuli in Prozent in den untersuchten Nullbiopsien

	Mittelwert (\pm SD)	Minimum	Maximum
Global sklerosierte Glomerula [%]	6,91 (\pm 10,21)	0	50
Atrophe Tubuli [%]	10,26 (\pm 6,46)	1	20

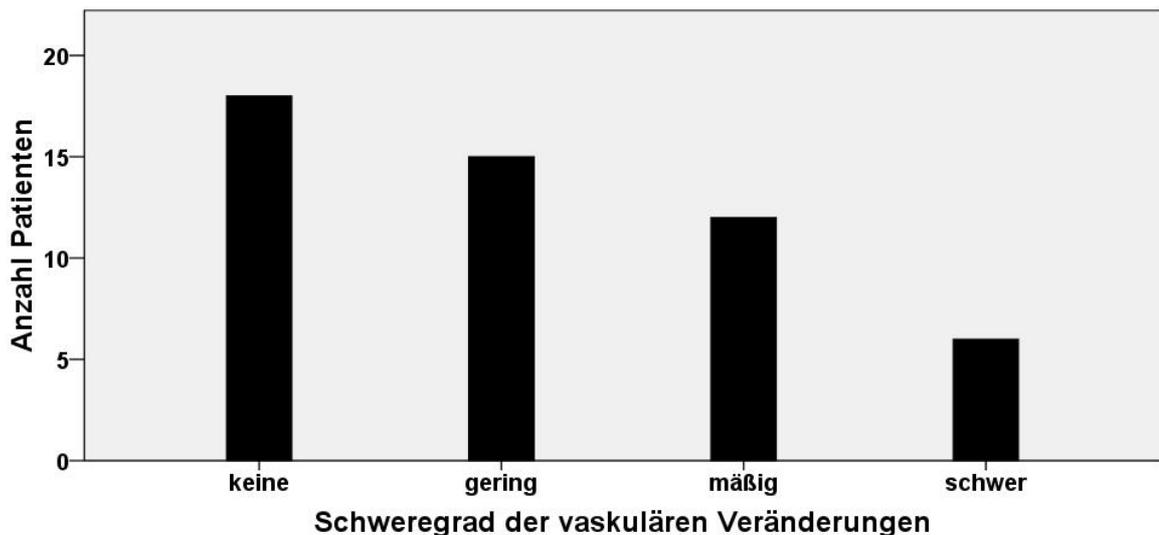


Abbildung 11: Überblick des Schweregrades vaskulärer Veränderungen (1=keine, 2=gering, 3=mäßig, 4= schwer) in den untersuchten Nullbiopsien.

In der Masson Trichrom Färbung ergab sich ein mittlerer interstitieller Fibrosegrad von 4,11(\pm 3,13)%.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen mit Antikörpern gegen KI – 67 und H2AX sind in Tabelle 7 dargestellt. Es wurden die prozentualen Anteile positiver Anfärbungen für glomeruläre, tubuläre, vaskuläre und interstitielle Zellen untersucht. Der höchste Anteil proliferierender Zellen (KI – 67 positiv) fand sich im Interstitium. Die meisten H2AX – AK positiven Zellen wurden im tubulären Kompartiment detektiert.

Tabelle 6: Mittlerer Anteil KI – 67 bzw. H2AX – AK positiver Zellen pro Kompartiment in Prozent, jeweils Mittelwert (\pm Standardabweichung)

Kompartiment	Glomerulär	Tubulär	Vaskuläre	Interstitiell
KI – 67 positiv [%]	0,17 (\pm 0,35)	0,38 (\pm 0,52)	0,03 (\pm 0,14)	1,58 (\pm 2,6)
H2AX – AK positiv [%]	2,23 (\pm 3,02)	19,81(\pm 15,27)	1,3(\pm 2,54)	2,96(\pm 3,67)

Es fand sich eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Alter der Organspender und dem Prozentsatz der global sklerosierten Glomerula ($r = 0,31$, $p = 0,027$). Eine graphische Darstellung kann Abbildung 12 entnommen werden. Es fanden sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchungen und den klinischen Parametern.

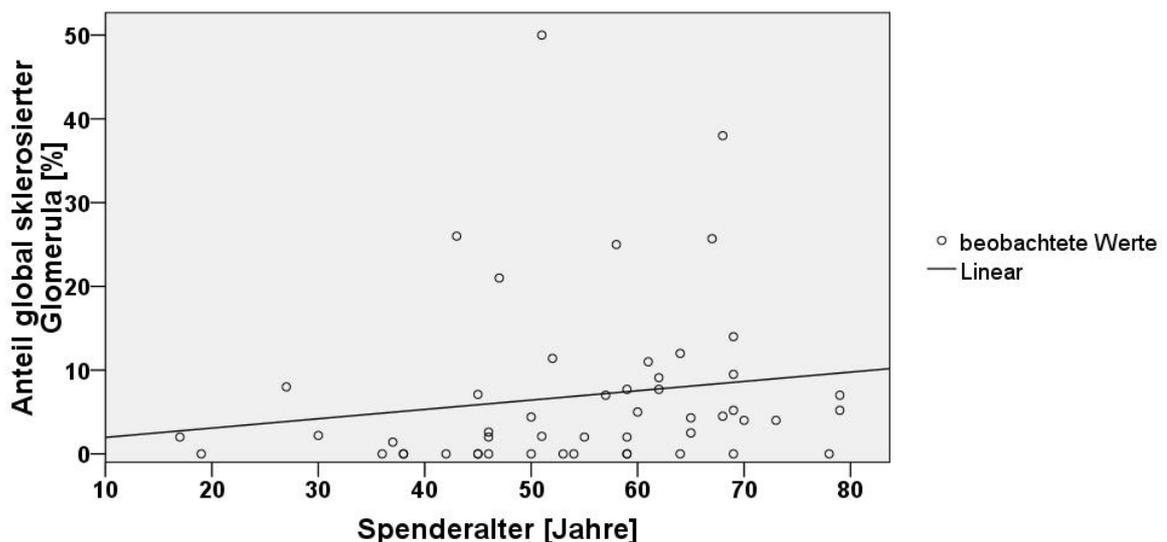


Abbildung 12: Darstellung des Zusammenhangs von Spenderalter in Jahren und dem Anteil global sklerosierter Glomeruli in Prozent. $r = 0,31$, $p = 0,027$

3.4 RT – PCR: Expression von p21^{CIP/WAF}, p16^{INK4A} and p14^{ARF}

Der Zellzyklusinhibitor p21^{CIP/WAF} konnte in insgesamt 53 (91,3%) Biopsien nachgewiesen werden. Die mittlere Expression im Verhältnis zum Referenzgen betrug hier 2,19 (\pm 1,9, Min: 0,0028 Max: 8,99). Eine Darstellung der Expression in Abhängigkeit vom Spenderalter bietet Abbildung 13.

p16^{INK4A} als Mediator von "Stress induzierter" Seneszenz konnte in 11 (19%) Präparaten nachgewiesen werden, in 42 (72,4%) Biopsien konnte keine Expression detektiert werden. Die mittlere Expression betrug hier 0,31 (±0,93, Min: 0 Max: 4,43).

p14^{ARF} wurde in 21 (36,2%) Biopsien nachgewiesen, keine Expression fand sich in 29 (50%) Proben. Die mittlere Expression betrug hier 0,089 (±0,27, Min: 0 Max: 1,72).

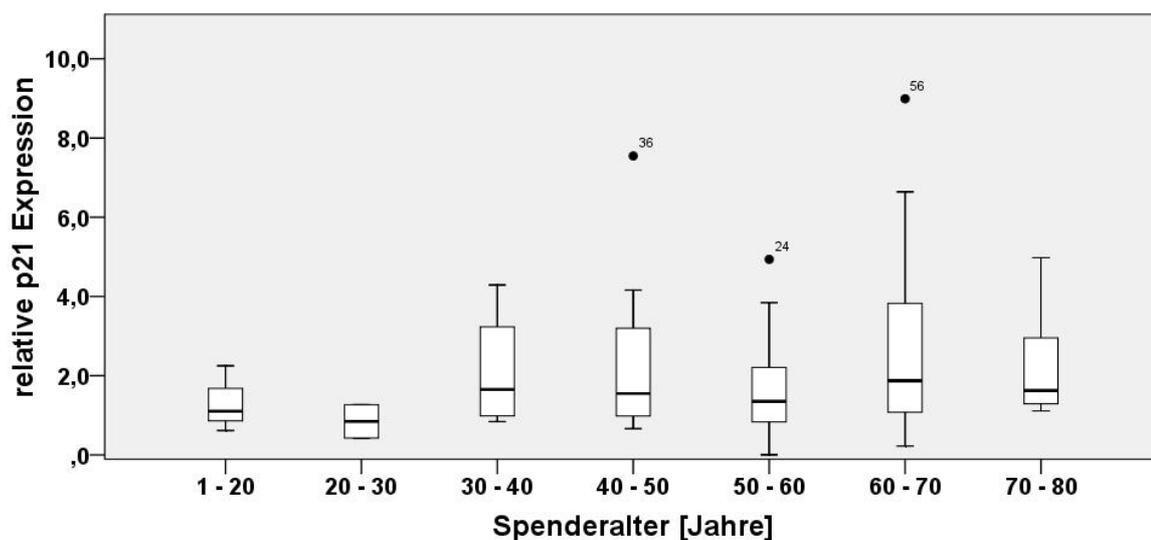


Abbildung 13: Altersabhängige Darstellung der Expression von p21^{CIP/WAF}. Es konnte eine Tendenz zu höherer Expression bei älteren Patienten nachgewiesen werden.

Bei Organspendern mit einer bekannten arteriellen Hypertonie konnten höhere Werte für p21^{CIP/WAF} detektiert werden (Mann–Whitney–U–Test p=0.05)

Die Expression von p16^{INK4A} war signifikant höher bei Organspendern, die Raucher waren (Mann–Whitney–U–Test p=0.002), oder an einer Gefäßerkrankung litten (Mann–Whitney–U–Test p=0.022).

Es fand sich ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der pro Organspender gleichzeitig vorliegenden Risikofaktoren (arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, vaskuläre Vorerkrankung, Adipositas) und der Höhe der p16^{INK4A} – Expression (r = 0,39 p=0,004). Eine lineare Regressionsanalyse ergab, dass die Anzahl der

gleichzeitig vorliegenden Risikofaktoren 10,7% ($p=0,017$) der Gesamtvarianz der $p16^{INK4A}$ – Expression erklärt.

Die Abbildungen 14, 15 und 16 bieten einen Überblick der beschriebenen Zusammenhänge.

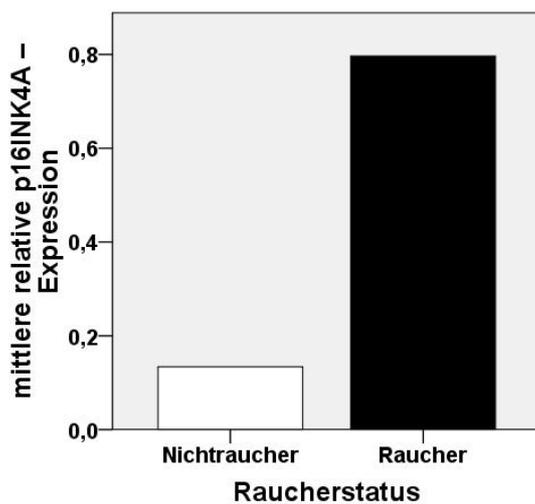


Abbildung 14: Mittlere $p16^{INK4A}$ – Expression in Abhängigkeit des Raucherstatus des Organspenders.

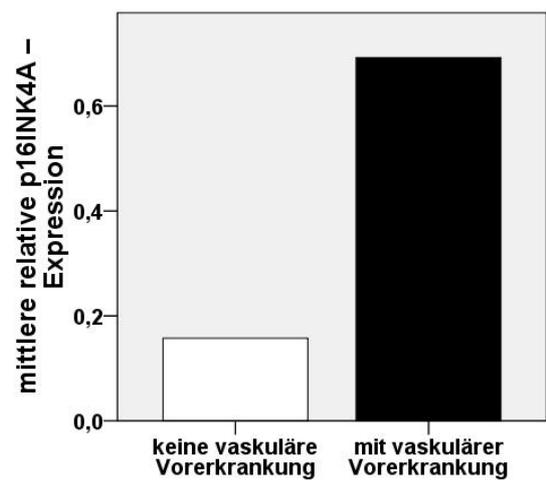


Abbildung 15: Mittlere $p16^{INK4A}$ – Expression in Abhängigkeit vom Vorliegen einer vaskulären Vorerkrankung.

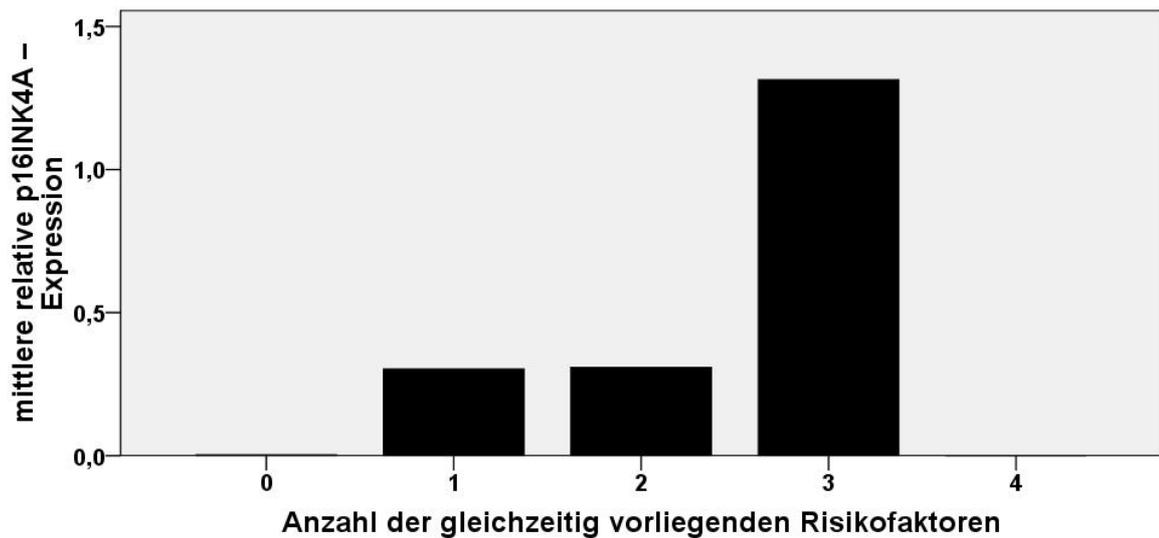


Abbildung 16: Mittlere $p16^{INK4A}$ – Expression in Abhängigkeit von der Anzahl der gleichzeitig vorliegenden kardiovaskulären Risikofaktoren (arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, vaskuläre Vorerkrankung, Adipositas).

Zur Analyse des Einflusses der Seneszenzmarker auf den klinischen Verlauf wurde zwischen Patienten mit einer verschlechterten Nierenfunktion und solchen mit gleichbleibender oder verbesserter Nierenfunktion 24 Monate nach Transplantation unterschieden. Bei Patienten mit verschlechterter Nierenfunktion wurde bei der Kontrolle nach 24 Monaten ein höherer Kreatininwert gemessen als bei Krankenhausentlassung.

Es zeigte sich, dass in der Gruppe mit verschlechterter Nierenfunktion signifikant häufiger $p16^{INK4A}$ (Fisher's Exact Test $p=0,018$) und $p14^{ARF}$ (Fisher's Exact Test $p=0,027$) in den zugehörigen Implantationsbiopsien nachgewiesen werden konnte. Für $p21^{CIP/WAF}$ ließ sich ein solcher Zusammenhang nicht nachweisen. Den Abbildungen 17 und 18 kann eine graphische Darstellung dieser Zusammenhänge entnommen werden.

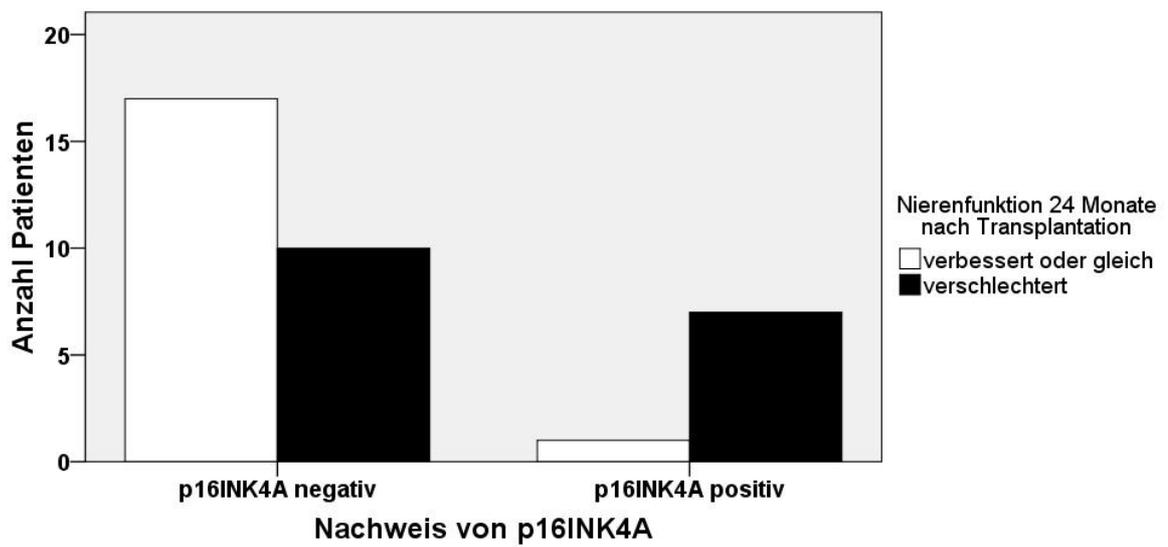


Abbildung 17: Darstellung der Nierenfunktion 24 Monate nach Transplantation in Abhängigkeit des Nachweises von p16^{INK4A}. Von den p16^{INK4A} positiven Organen wiesen im Verlauf 7 von 8 eine verschlechterte Funktion auf, bei den p16^{INK4A} negativen Organen fiel in 10 von insgesamt 27 Fällen eine Verschlechterung auf.

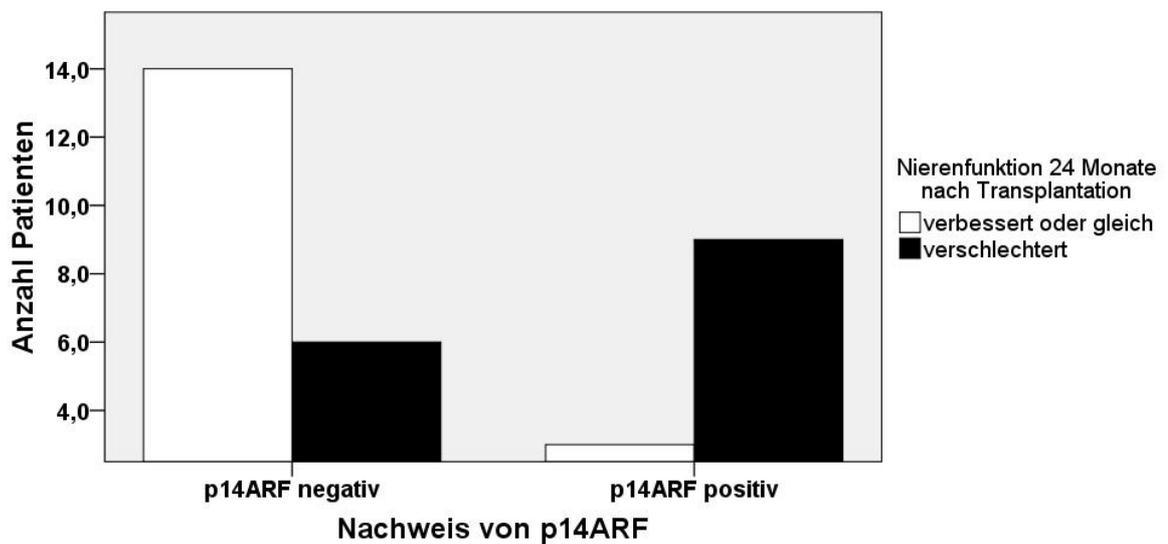


Abbildung 18: Darstellung der Nierenfunktion 24 Monate nach Transplantation in Abhängigkeit des Nachweises von p14^{ARF}. Von den p14^{ARF} positiven Organen wiesen im Verlauf 9 von 12 eine verschlechterte Funktion auf, bei den p14^{ARF} negativen Organen fiel in 6 von insgesamt 20 Fällen eine Verschlechterung auf.

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der klinischen Parameter

Am hier untersuchten Patientenkollektiv lässt sich eine Vielzahl der auch aus größeren Untersuchungen bekannten Befunde nachvollziehen.

Die höhere Prävalenz der terminalen Niereninsuffizienz unter Männern schlägt sich in der Tatsache nieder, dass in Ulm wie auch in Gesamtdeutschland deutlich mehr Männer als Frauen ein Spenderorgan erhielten [14]. Auch das durchschnittliche Alter bei Transplantation war (mit 53 Jahren) ähnlich, wobei die männlichen Patienten zum Zeitpunkt der Transplantation im Mittel jünger waren [14].

Die Hämodialyse war vor Transplantation wie im Bundesdurchschnitt das bevorzugte Nierenersatzverfahren. Die durchschnittliche Wartezeit an der Dialyse allerdings war bei den in Ulm behandelten Patienten länger (67 Monate gegen 40 Monate) [14].

In deutlich mehr Fällen als deutschlandweit konnte die Grunderkrankung, die die Ursache für die chronische Niereninsuffizienz darstellte, nicht diagnostisch eingeordnet werden. Auch der geringere Anteil an Patienten mit diabetischer oder vaskulärer Nephropathie ist auffällig, hier könnten im bundesweiten Vergleich unterschiedliche Zuweisungsraten eine Rolle spielen [14]. Letztendlich ist die hier untersuchte Stichprobe zu klein, um valide Aussagen über die vorliegenden Unterschiede zwischen den in Ulm behandelten Patienten und dem Bundesdurchschnitt in Wartezeit und Grunderkrankung zu ermöglichen. Möglicherweise wurde bei den 21 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz unklarer Ätiologie wegen fehlender klinischer Konsequenz bei bereits bestehender Dialysepflichtigkeit auf eine weitere diagnostische Einordnung verzichtet. Detailliertere Aufzeichnungen lagen hierzu nicht vor.

Auch die Ursache der längeren Wartezeit an der Dialyse kann bei der geringen Zahl der untersuchten Probanden zufällig sein. Eine mögliche Erklärung könnte eine im Vergleich zu anderen Zentren zurückhaltendere Annahme von Organen mit ungünstigen Voraussetzungen (z.B. vorraussichtlich lange Kaltischämiezeit, hohes Spenderalter, etc.) in Ulm sein.

Während der Verlaufsbeobachtung nach Transplantation erkrankten 6 Patienten neu an einem Diabetes mellitus, 5 dieser Patienten wurden immunsuppressiv mit Tacrolimus behandelt. Die Induktion einer diabetischen Stoffwechsellage ist eine bekannte Nebenwirkung von Tacrolimus [12]. Alternativ steht Ciclosporin A zur Verfügung, welches aber auf Grund des bezüglich der weiteren kardiovaskulären Risikofaktoren ungünstigeren Nebenwirkungsprofils keine sinnvolle Alternative darstellt. Auch ist die unter Tacrolimus auftretende höhere Inzidenz eines Diabetes mellitus durch die Inhibition der Insulinsekretion möglicherweise eher als Demaskierung einer bereits gestörten Glukosehomöostase zu betrachten [41]. Auch die Anzahl an Harnwegsinfekten während des Beobachtungszeitraums ist vorbeschrieben und unter Anderem durch die immunsuppressive Therapie nachvollziehbar [1].

Der bereits bekannte Zusammenhang zwischen Spenderalter und postoperativer Organfunktion findet sich auch im von uns untersuchten Kollektiv wieder. Auch die Aussagekraft des Spenderalters als prädiktiver Parameter ist hier ähnlich ausgeprägt wie in Vorarbeiten [24, 33, 35]. Aber auch im vorliegenden Kollektiv finden sich Organspender mit hohem Lebensalter, deren Organe nach Transplantation über längere Zeit eine gute Funktion zeigten.

Viele der Befunde, welche in großen Beobachtungsstudien gewonnen werden konnten, finden sich also auch in der hier durchgeführten Untersuchung. Es lässt sich daher annehmen, dass auch die im Folgenden besprochenen Ergebnisse der histopathologischen und molekulargenetischen Untersuchungen für ein größeres Kollektiv repräsentativ sein könnten.

4.2 Histologie

Globale Glomerulosklerose gehört wie auch tubuläre Atrophie, interstitielle Fibrose und Intimaverdickung der Arterien zum histologischen Phänotyp renaler Alterung [28].

Auch in den vorliegenden Biopsien konnte wie erwartet eine Assoziation von Spenderalter mit zunehmender Glomerulosklerose nachgewiesen werden.

Das Ausmaß der tubulären Atrophie war dagegen in den untersuchten Implantationsbiopsien nur eingeschränkt beurteilbar, was eine Erklärung für den fehlenden Zusammenhang mit klinischen Parametern darstellen könnte. In Nullbiopsien ist durch die Ischämie eine massive Tubulusschädigung zu erwarten, so dass eine tubuläre Atrophie möglicherweise dadurch maskiert wurde.

Der vermehrte Nachweis von KI – 67 im Interstitium lässt sich am ehesten auf ein entzündliches Infiltrat in diesem Bereich zurückführen, das sich noch vor oder während der Organentnahme im Rahmen des Hirntods des Spenders entwickelte. Die erwartete geringere Proliferationsrate bei älteren Organen ließ sich hier nicht nachweisen. Möglicherweise sind auch die untersuchten Probenzahlen für den Nachweis eines geringen Unterschiedes nicht groß genug.

Auch für die mittels Masson Trichrom Färbung untersuchte interstitielle Fibrose ließen sich keine Assoziationen zum Spenderalter nachweisen. Die kapselnahe Gewebeentnahme durch Keilbiopsie könnte den Fibrosegehalt des Gewebes verfälschen oder die zu geringe Probenanzahl für einen Nachweis nicht ausreichen.

Andererseits ist das Fehlen einer vermehrten interstitiellen Fibrose ein weiterer Hinweis, dass das biologische Alter eines Organs nicht allein entscheidend für den Zustand ist. Die interstitielle Fibrose gehört zum Phänotyp der renalen Seneszenz. Somit könnte der fehlende Zusammenhang zwischen Spenderalter und Ausmaß der Fibrose auch Ausdruck einer unterschiedlichen Belastung der Organe durch zelluläre Stressfaktoren sein. Dies würde erneut die Hypothese stützen, dass das biologische Alter entscheidender für die Ausprägung der renalen Seneszenz ist als das chronologische.

Einschränkend muss hier jedoch angemerkt werden, dass sich ebenfalls kein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der histologischen Veränderungen und den Retentionsparametern, also der Organfunktion im weiteren Verlauf feststellen ließ. Gemäß des Konzeptes der beschleunigten Seneszenzentwicklung (STASIS) in den transplantierten Organen wäre eine schlechtere Funktion der schwerer betroffenen Nieren zu erwarten gewesen.

4.3 Expression der Seneszenzmarker p21^{CIP/WAF}, p16^{INK4A} and p14^{ARF}

Kommt es in der Zelle zu einer kritischen Telomerlängenverkürzung führt dies zur Aktivierung von p53, dies induziert dann die Expression des Zellzyklusinhibitors p21^{CIP/WAF1}.

P21^{CIP/WAF1} ist ein Inhibitor der Zyklin-abhängigen Kinasen (Cyclin-dependent Kinase, CDK), deren Aktivität Voraussetzung für ein Fortschreiten des Zellzyklus ist. Die Inhibition der CDK führt zur Hypophosphorylierung und damit Aktivierung des Retinoblastomproteins (RB), woraus der permanente Zellzyklusarrest resultiert [9, 26, 28]. P21^{CIP/WAF1} ist somit in der Lage zelluläre Seneszenz zu induzieren.

Es ist bekannt, dass mit zunehmendem Lebensalter die Telomerlänge in humanen Nieren in signifikantem Umfang abnimmt [27]. Ebenfalls konnte im Vorfeld gezeigt werden, dass die arterielle Hypertonie und auch oxidativer Stress mit verkürzten Telomeren assoziiert ist [5, 28, 45], auch induziert Hypertonie renale Seneszenz [43]. Eine kritische Telomerverkürzung führt in der Niere zur Hochregulation von p21^{CIP/WAF} über den p53 – Signalweg [23].

Es zeigte sich auch in den hier vorliegenden Ergebnissen eine Tendenz zu höherer Expression von p21^{CIP/WAF} bei höherem Alter des Organspenders und beim Vorliegen einer arteriellen Hypertonie. Dies entspricht den in Vorarbeiten gewonnenen Erkenntnissen und ist ein weiterer Hinweis, dass die beschriebenen molekularen Mechanismen auch im klinischen Umfeld relevant sind.

Die fehlende statistische Signifikanz der Zusammenhänge zwischen Expression und Spenderalter ist wahrscheinlich auf die kleine Zahl von Probanden zurückzuführen.

Der Zellzyklusinhibitor p16^{INK4a} spielt eine bedeutende Rolle im Signalweg der STASIS (*stress and aberrant signaling induced senescence*). P16^{INK4A} kann in seiner Expression durch extrinsische Stressfaktoren induziert werden [30].

Melk et al. konnten 2001 zeigen, dass p16^{INK4a} nicht bzw. nur in geringem Maße in jungen (<30 Jahre) humanen Nieren exprimiert, jedoch in alternden und erkrankten Individuen induziert ist. Sie beobachteten eine gesteigerte p16^{INK4a}-

Expression bei den Krankheitsbildern der Hydronephrose, der interstitiellen Nephritis, der Pyelonephritis und der polyzystischen Nierenerkrankung [28]. Weitere Studien veranschaulichten, dass die Expression von p16^{INK4a}, neben mehreren untersuchten Seneszenzmarkern, sowohl in menschlichen Nieren als auch in Nieren von Mäusen und Ratten am stärksten mit der Nierenalterung korreliert. Dies zeigte sich in der positiven Korrelation von p16^{INK4a} und dem Auftreten chronisch histologischer Veränderungen [22, 28, 30].

Extrinsische Faktoren können ebenfalls zur Induktion des Zellzyklusinhibitors p14^{ARF} führen, dies resultiert über einen verminderten Abbau von p53 ebenfalls in einem Stillstand des Zellzyklus [29].

p16^{INK4a} und p14^{ARF} sind Transkripte des Gens CDKN2a (Eng. Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A) [17].

Das äquivalente Protein bei der Maus, P19^{ARF}, ist nach der bisherigen Erkenntnislage bezüglich der Induktion eines Zellzyklusarrests potenter als p16^{INK4a} zu sein. In humanen Fibroblasten jedoch scheint p14^{ARF} im Vergleich zu p16^{INK4a} eher eine untergeordnete Rolle zu spielen [29].

In Vorarbeiten konnte außerdem gezeigt werden, dass oxidativer Stress zu einer erhöhten Expression des Seneszenzmarkers p16^{INK4A} führt [38, 39, 42]. Zigarettenrauchen führt nachweisbar zu einem erhöhten Maß an oxidativem Stress und zur Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen [2, 21, 3].

Die erhöhte Expression von p16^{INK4A} bei Rauchern stimmt mit diesen Befunden überein und stützen wiederum die Hypothese der durch zellulären Stress induzierten Seneszenz (STASIS) [22, 28].

Auch die höhere Expression bei Patienten mit einer bekannten Gefäßerkrankung unterstützt dies. Es ist interessant, dass die Höhe der Expression von p16^{INK4A} mit der Gesamtzahl der gleichzeitig bei einem Organspender vorliegenden kardiovaskulären Risikofaktoren (wobei der Nikotinkonsum auf Grund der relativ häufig unzureichenden Dokumentation hier nicht berücksichtigt wurde) korreliert. Dies verdeutlicht weiter den Zusammenhang zwischen zellulärer Seneszenz und systemischen Erkrankungen, wie zum Beispiel arterieller Hypertonie, deren nierenschädigende Wirkung schon lange bekannt sind. Diese Ergebnisse legen erneut nahe, dass in vivo eine Verbindung zwischen den im klinischen Umfeld

etablierten vaskulären Risikofaktoren, wie zum Beispiel Nikotinkonsum, und den molekularen Mechanismen der Seneszenzentwicklung besteht.

Insgesamt muss angemerkt werden, dass die Expression von p16^{INK4A} und p14^{ARF} generell niedrig ist und in der hier vorliegenden Arbeit trotz Präamplifikation nur in wenigen Biopsien detektiert werden konnte, die Expression also in vielen Präparaten unter der Nachweisgrenze blieb. Ein Faktor, der hier neben der geringen Expression ursächlich sein könnte, ist der lange Zeitraum zwischen Biopsieentnahme und Analyse. Um eine größere statistische Signifikanz zu erreichen, sollte eine solche Untersuchung an nativem Gewebe und mit einer höheren Fallzahl durchgeführt werden.

Ziel dieser Arbeit war die Evaluation zellulärer Seneszenzmarker hinsichtlich der Prognose der Transplantatfunktion nach 24 Monaten. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass ein Nachweis von p16^{INK4A} oder p14^{ARF} in der Implantationsbiopsie mit einer verschlechterten Nierenfunktion im Langzeitverlauf über 2 Jahre assoziiert ist.

Da ein solcher Nachweis für p21^{CIP/WAF} nicht gelang, könnte man spekulieren, dass für die Prognose der Transplantatfunktion die stressinduzierten Seneszenzmechanismen (STASIS) relevanter sind als die chronologische Alterung und die daraus resultierende Telomerlängenverkürzung. Dies wiederum unterstützt die bereits mehrfach geäußerte Vermutung, dass für die Prognose nach Transplantation das biologische Alter eines Organs entscheidender ist als das chronologische [18, 24, 25, 28].

Dieses Ergebnis deckt sich mit den Vorarbeiten von Koppelstaedter et al sowie McGlynn et al. Diese konnten bereits unabhängig voneinander zeigen, dass die Expression von CDKN2A eine bessere Vorhersage der Organfunktion nach 12 Monaten ermöglicht als das Spenderalter [24, 25]. Es wurde hier allerdings nicht zwischen den beiden Transskripten p16^{INK4A} und p14^{ARF} unterschieden. Es wurde im Vorfeld angemerkt, dass p14^{ARF} in humanen Nieren nur von untergeordneter Relevanz ist [30]. Die hier vorliegenden Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass

die Entwicklung stressinduzierter Seneszenz über p14^{ARF} auch eine Rolle in der Organdysfunktion nach Transplantation spielen kann.

Die hier nachgewiesenen Zusammenhänge sprechen für die Hypothese der durch Stressfaktoren beschleunigten zellulären Seneszenzentwicklung (STASIS) als Grundlage der chronischen Transplantatnephropathie (CAN). Es ist daher wahrscheinlich, dass die mit der Transplantation verbundenen massiven Belastungen auf zellulärer Ebene ein wesentlicher Faktor bei der Entwicklung einer späteren Funktionsverschlechterung sind. Zur weiteren Evaluation der Relevanz von p14^{ARF} sind allerdings weitere Studien mit einer größeren Fallzahl notwendig.

Es stellt sich die Frage nach der klinischen Konsequenz der hier gewonnenen Erkenntnisse. Mit Hilfe der Bestimmung von Seneszenzmarkern im Rahmen einer Transplantation gewinnt man eine Zustandsbeschreibung des gerade transplantierten Organs. Es könnte dann möglich sein Patienten, die besonders gefährdet sind einen frühen Abfall der Transplantatfunktion zu erleiden, rechtzeitig zu identifizieren und diese dann intensiver zu betreuen, zum Beispiel mit einer noch engermaschigeren Einstellung kardiovaskulärer Risikofaktoren oder maßgeschneiderter immunsuppressiver Therapie. Ob ein solches Vorgehen erfolgsversprechend ist, sollte an Hand prospektiver Studien evaluiert werden, die möglichst auch die weitere histopathologische Entwicklung mit Hilfe von Protokollbiopsien verfolgen.

Eine andere Vorgehensweise wäre, die Entwicklung zellulärer Seneszenz während der Phase der Kaltischämie zu verlangsamen, um so das Phänomen einer gestörten Organhomöostase durch eine erhöhte Zahl seneszenten Zellen im Parenchym zu begrenzen.

Eine mögliche Option könnte hier die Unterdrückung der p53-Aktivität durch RNA-Interferenz sein. Es konnte bereits im Tiermodell gezeigt werden, dass die Gabe von p53 spezifischer small-interfering RNA (siRNA) eine akute ischämische oder medikamenteninduzierte Nierenschädigung minimieren könnte [32]. Eine solche Behandlung ist möglicherweise geeignet die mit der Transplantation einhergehende Organschädigung während der Phase der Kaltischämie zu

begrenzen. Die therapeutische Anwendung von siRNA zur Prophylaxe einer verzögerten Organfunktion nach Nierentransplantation wird aktuell in klinischen Studien evaluiert [37].

Insgesamt unterstützen die gewonnenen Ergebnisse die Hypothese einer beschleunigten zellulären Seneszenzentwicklung als Grundlage der Transplantatdysfunktion [18]. Es konnte hier gezeigt werden, dass das Ausmaß dieses Prozesses gemessen an der Expression der Biomarker p16^{INK4A} und p14^{ARF} auch im Langzeitverlauf nach Transplantation funktionell relevant ist. Die Bestimmung der zellulären Seneszenzmarker ermöglicht somit eine Aussage über die Nierenfunktion nach Transplantation auch über einen Verlauf von mehreren Jahren.

5. Zusammenfassung

5.1 Einleitung

Das Alter des Organspenders hat bei der Nierentransplantation einen relevanten Einfluss auf das Transplantatüberleben und das Therapieergebnis. Da einige Organe trotz hohen chronologischen Alters über längere Zeit eine gute Funktion bieten, wurde die Hypothese entwickelt, dass das biologische Alter eines Organs entscheidend für dessen Funktion ist. Das biologische Alter eines Organs wird durch das chronologische Alter und „Stressfaktoren“, wie arterielle Hypertonie bestimmt.

Somatische zelluläre Seneszenz beschreibt das Phänomen eines irreversiblen Zellzyklusarrests bei erhaltenen physiologischen Funktionen. Zelluläre Seneszenz wird durch eine kritische Telomerverkürzung oder Belastungsfaktoren, wie oxidativen Stress induziert. Die Persistenz seneszenten Zellen im Organparenchym führt zu einer gestörten Organfunktion. Ein erhöhter Anteil solcher Zellen in älteren Organen könnte erklären, warum das Spenderalter einen großen Einfluss auf Transplantatfunktion und –überleben hat. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass molekulare Marker zellulärer Seneszenz mit einer schlechteren Transplantatfunktion nach 12 Monaten assoziiert sind. Ziel dieser Arbeit war die Evaluation der Aussagekraft der Expression solcher Marker in Implantationsbiopsien über den Langzeitverlauf (24 Monate) nach Nierentransplantation.

5.2 Methoden

Es wurden retrospektiv 58 Patienten, die eine Nierentransplantation in Ulm in den Jahren 2006-2009 erhielten, untersucht. Vor der Transplantation wurde eine Biopsie entnommen. An der Medizinischen Hochschule Hannover erfolgte die histopathologische Routinediagnostik und die Bestimmung der Expression der Seneszenzmarker p16^{INK4a}, p14^{ARF} und p21^{CIP1/WAF1} aus den dort gelagerten in Paraffin fixierten Biopsien. Die klinischen Parameter wurden anonymisiert aus den Patientenakten in Ulm erhoben.

5.3 Ergebnisse

- Der Zusammenhang zwischen hohem Spenderalter und schlechterer Organfunktion im Verlauf findet sich auch im untersuchten Kollektiv.
- Bei Vorliegen einer Gefäßerkrankung und kardiovaskulären Risikofaktoren konnte eine höhere Expression von p16^{INK4A} nachgewiesen werden.
- Der Nachweis der Seneszenzfaktoren p16^{INK4A} oder p14^{ARF} in der Implantationsbiopsie ist mit einer verschlechterten Nierenfunktion im Langzeitverlauf assoziiert.

5.4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Evaluation zellulärer Seneszenzmarker hinsichtlich der Prognose der Transplantatfunktion nach 24 Monaten. Es konnte gezeigt werden, dass p16^{INK4A} und p14^{ARF} als Mediatoren „stress-induzierter“ Seneszenz einen Einfluss auf den Langzeitverlauf nach Nierentransplantation haben. Dies spricht für die Hypothese, dass das biologische Alter des Transplantats entscheidend für dessen Funktion ist.

Insgesamt konnten p16^{INK4a} und p14^{ARF} trotz Präamplifikation nur in wenigen Biopsien nachgewiesen werden, ursächlich ist hier wahrscheinlich eine zu geringe Fallzahl, die generell nur geringe Expression und der große zeitliche Abstand zwischen Biopsieentnahme und Analyse. Zur Bestätigung der vorliegenden Ergebnisse sind weitere Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv mit nativem Gewebe notwendig.

Die Bestimmung der untersuchten Marker in Implantationsbiopsien könnte in Zukunft die Identifikation besonders gefährdeter Patienten und eine individuell angepasste Therapie nach Nierentransplantation ermöglichen. Ein anderer Ansatz ist es die Entwicklung zellulärer Seneszenz während der Kaltischämie mittels RNA-Interferenz zu unterdrücken.

Insgesamt unterstützen die gewonnen Ergebnisse die Hypothese einer beschleunigten zellulären Seneszenzentwicklung als Grundlage der Transplantatdysfunktion. Es konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß dieses Prozesses gemessen an der Expression der Biomarker p16^{INK4A} und p14^{ARF} auch im Langzeitverlauf nach Transplantation funktionell relevant ist.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Alangaden G. J., Thyagarajan R., Gruber S. A., Morawski K., Garnick J., El-Amm J. M., West M. S., Sillix D. H., Chandrasekar P. H., Haririan A.: Infectious complications after kidney transplantation: current epidemiology and associated risk factors. *Clin Transplant* 20: 401-409 (2006).
- [2] Ambrose J. A., Barua R. S.: The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol* 43: 1731-1737 (2004).
- [3] Babizhayev M. A., Savel'yeva E. L., Moskvina S. N., Yegorov Y. E.: Telomere length is a biomarker of cumulative oxidative stress, biologic age, and an independent predictor of survival and therapeutic treatment requirement associated with smoking behaviour. *Am J Ther* 18: e209-226 (2011).
- [4] Bock O., Kreipe H., Lehmann U.: One-Step Extraction of RNA from Archival Biopsies. *Anal Biochem* 295: 116-117 (2001).
- [5] Butt H. Z., Atturu G., London N. J., Sayers R. D., Bown M. J.: Telomere length dynamics in vascular disease: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 40: 17-26 (2010).
- [6] Chkhotua A. B., Gabusi E., Altimari A., D'Errico A., Yakubovich M., Vienken J., Stefoni S., Chieco P., Yussim A., Grigioni W. F.: Increased expression of p16(INK4a) and p27(Kip1) cyclin kinase inhibitor genes in aging human kidney and chronic allograft nephropathy. *Am J Kidney Dis* 41: 1303-1313 (2003).
- [7] Cohen B., D'Amaro J., De Meester J., Persijn G.: Changing patterns in organ donation in Eurotransplant, 1990-1994. *Transplant Int* 10: 1-6 (1997).
- [8] Cohen B., Smits J., Haase B., Persijn G., Vanrenterghem Y., Frei U.: Expanding the donor pool to increase renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 20: 34-41 (2005).

- [9] Deng Y., Chan S. S. , Chang S.: Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. *Nat Rev Cancer* 8: 450-458 (2008).
- [10] Edwards E., Bennet L. , Cecka J.: Effect of HLA matching on the relative risk of mortality for kidney recipients: A comparison of the mortality risk after transplant to the mortality risk of remaining on the waiting list. *Transplantation* 64: 1274-1277 (1997).
- [11] Ferlicot S., Durrbach A., Ba N., Desvaux D., Bedossa P., Paradis V.: The role of replicative senescence in chronic allograft nephropathy. *Hum Pathol* 34: 924-928 (2003).
- [12] Flechner S. M., Glyda M., Cockfield S., Grinyó J., Legendre C., Russ G., Steinberg S., Wissing K. M., Tai S. S.: The ORION Study: Comparison of Two Sirolimus based Regimens versus Tacrolimus and Mycophenolate Mofetil in Renal Allograft Recipients. *Am J Transplant* 11: 1633-1644 (2011).
- [13] Frei U., Noeldeke J., Machold-Fabrizii V., Arbogast H., Magreiter R., Fricke L., Voiculescu A., Kliem V., Ebel H., Albert U., Lopau K., Schnuelle P., Nonnast-Daniel B., Pietruck F., Offermann R., Persijn G., Bernasconi C.: Prospective age matching in elderly kidney transplant recipients - a 5-year analysis of the Eurotransplant Senior Program. *Am J Transplant* 8: 50-57 (2008).
- [14] Frei U. , Schober-Halstenberg H.-J.: Nierenersatztherapie in Deutschland - Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007. QuaSi-Niere gGmbH, Berlin, Deutschland, 2008.
- [15] Gerdes J., Dallenbach F., Lennert K., Lemke H., Stein H.: Growth fractions in malignant non-Hodgkin's lymphomas (NHL) as determined in situ with the monoclonal antibody Ki-67. *Hematol Oncol* 2: 365-371 (1984).
- [16] Gerdes J., Lemke H., Baisch H., Wacker H. H., Schwab U., Stein H.: Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133: 1710-1715 (1984).
- [17] Haber D. A.: Splicing into senescence: the curious case of p16 and p19ARF.

Cell 91: 555-558 (1997).

- [18] Halloran P. F., Melk A., Barth C.: Rethinking chronic allograft nephropathy: the concept of accelerated senescence. *J Am Soc Nephrol* 10: 167-181 (1999).
- [19] Harley C. B., Futcher A. B., Greider C. W.: Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345: 458-460 (1990).
- [20] Hayflick L., Moorhead P. S.: The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 858-621 (1961).
- [21] Hulea S. A., Olinescu R., Nită S., Crocnan D., Kummerow F. A.: Cigarette smoking causes biochemical changes in blood that are suggestive of oxidative stress: a case-control study. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 14: 173-180 (1995).
- [22] Jacobi C., Hömme M., Melk A.: Is cellular senescence important in pediatric kidney disease? *Pediatr Nephrol* 26: 2121-2131 (2011).
- [23] Jennings P., Koppelstaetter C., Aydin S., Abberger T., Wolf A. M., Mayer G., Pfaller W.: Cyclosporine A induces senescence in renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: 831-838 (2007).
- [24] Koppelstaetter C., Schratzberger G., Perco P., Hofer J., Mark W., Ollinger R., Oberbauer R., Schwarz C., Mitterbauer C., Kainz A., Karkoszka H., Wiecek A., Mayer B., Mayer G.: Markers of cellular senescence in zero hour biopsies predict outcome in renal transplantation. *Aging Cell* 7: 491-497 (2008).
- [25] McGlynn L. M., Stevenson K., Lamb K., Zino S., Brown M., Prina A., Kingsmore D., Shiels P. G.: Cellular Senescence in pretransplant renal biopsies predicts postoperative organ function. *Aging Cell* 8: 45-51 (2009).
- [26] Meek D. W.: Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nat Rev Cancer* 9: 714-723 (2009).
- [27] Melk A., Ramassar V., Helms L. M., Moore R., Rayner D., Solez K., Halloran P. F.: Telomere shortening in kidneys with age. *J Am Soc Nephrol* 11: 444-

453 (2000).

- [28] Melk A., Halloran P. F.: Cell senescence and its implications for nephrology. *J Am Soc Nephrol* 12: 385-393 (2001).
- [29] Melk A.: Senescence of renal cells: molecular basis and clinical implications. *Nephrol Dial Transplant* 18: 2474-2478 (2003).
- [30] Melk A., Schmidt B. M., Takeuchi O., Sawitzki B., Rayner D. C., Halloran P. F.: Expression of p16INK4a and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney. *Kidney Int* 65: 510-520 (2004).
- [31] Melk A., Schmidt B. M., Vongwiwatana A., Rayner D. C., Halloran P. F.: Increased expression of senescence-associated cell cycle inhibitor p16INK4a in deteriorating renal transplants and diseased native kidney. *Am J Transplant* 5: 1375-1382 (2005).
- [32] Molitoris B. A., Dagher P. C., Sandoval R. M., Campos S. B., Ashush H., Fridman E., Brafman A., Faerman A., Atkinson S. J., Thompson J. D., Kalinski H., Skaliter R., Erlich S., Feinstein E.: siRNA targeted to p53 attenuates ischemic and cisplatin-induced acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 20: 1754-1764 (2009).
- [33] Morris P., Johnson R., Fuggle S., Belger M. A., Briggs J. D.: Analysis of factors that affect outcome of primary cadaveric renal transplantation in the UK. HLA Task Force Kidney Advisory Group United Kingdom Transplant Support Service Authority (UKTSSA). *Lancet* 354: 1147-1152 (1999).
- [34] Oosterlee A., Rahmel A.: Annual Report 2010. Eurotransplant International Foundation, Leiden, The Netherlands, 2011.
- [35] Oppenheimer F., Aljama P., Asensio Peinado C., Bustamante Bustamante J., Crespo Albiach J. F., Guirado Perich L.: The impact of donor age on the results of renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 19: iii11-15 (2004).
- [36] Paul L. C.: Chronic renal transplantation loss. *Kidney Int* 47: 1491-1499

(1995).

- [37] Quark Pharmaceuticals: Clinicaltrials.gov, U.S. National Institutes of Health, <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00802347>. (11 November 2012).
- [38] Ramirez R. D., Morales C. P., Herbert B. S., Rohde J. M., Passons C., Shay J. W., Wright W. E.: Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev* 15: 398-403 (2001).
- [39] Serrano M., Lee H. W., Chin L., Cordon Cardo C., Beach D., De Pinho R. A.: Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 85: 27-37(1996).
- [40] Universitätsklinikum Ulm, Zentrale Einrichtung für Klinische Chemie, <http://www.uniklinik-ulm.de/struktur/institute/klinische-chemie/home/praeanalytik/untersuchungen-leistungsverzeichnis/klm/kreatinin-kopie-1.html>. (15 Oktober 2012).
- [41] van Hooff J. P., Christiaans M. H. L., van Duijnhoven E. M.: Tacrolimus and posttransplant Diabetes mellitus in Renal Transplantation. *Transplantation* 79: 1465-1469 (2005).
- [42] Weinberg R. A.: The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81: 323-330 (1995).
- [43] Westhoff J. H., Hilgers K. F., Stenbach M. P., Hartner A., Klanke B., Amann K., Melk A.: Hypertension induces somatic cellular senescence in rat and human by induction of cell cycle inhibitor p16INK4a. *Hypertension* 52: 123-129 (2008).
- [44] Wolfe R., Ashby V., Milford E., Ojo A., Ettenger R., Agodoa L., Held P. , Port F.: Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 341: 1725-1730 (1999).

[45] Wright W. E., Shay J. W.: Historical claims and current interpretations of replicative aging. *Nat Biotechnol* 20: 682-688 (2002).

Anhang

Tabelle 7: Übersicht der in anonymisierter Form dokumentierten Parameter aus den Krankenakten

<u>Patientendaten:</u>
Geburtsdatum
Geschlecht
Renale Grunderkrankung
Vorbestehende Risikofaktoren: <ul style="list-style-type: none">• Bekannte Gefäßerkrankung• Arterielle Hypertonie• Diabetes mellitus• Nikotinabusus
Hat der Patient in der Vergangenheit bereits eine Organtransplantation erhalten?
Wurde vor der Transplantation dialysiert?
Dialyseform
Dialysezeitraum
Prozentzahl der präformierten Antikörper
Körpergewicht zum Zeitpunkt der Transplantation
Körpergröße zum Zeitpunkt der Transplantation
<u>Daten zum Organspender:</u>
Lebensalter in Jahren
Geschlecht
Körpergewicht
Körpergröße
Kreatinin des Donors bei Aufnahme und zuletzt gemessener Wert
HLA Mismatch der Loci A, B, DR
Risikofaktoren: <ul style="list-style-type: none">• Bekannte Gefäßerkrankung (periphere arterielle Verschlusskrankheit, Koronare Herzerkrankung, Schlaganfall)• Diabetes mellitus

<ul style="list-style-type: none"> • Arterielle Hypertonie • Nikotinabusus • Adipositas (BMI > 30)
<p>Todesursache des Organspenders:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Unbekannt • Trauma • Nichttraumatische Hirnblutung • Vaskuläre Todesursache • Herzrhythmusstörungen • Sonstige
<p><u>Daten zur Transplantation:</u></p>
<p>Monat und Jahr der Transplantation</p>
<p>Dauer der Kaltischämie</p>
<p>Dauer der Warmischämie</p>
<p>Initialfunktion (Diurese >500 ml / 24h)</p>
<p>Kreatininwert bei Entlassung</p>
<p>Induktionstherapie</p>
<p>Art der immunsuppressiven Therapie bei Krankenhausentlassung:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ciclosporin A • Tacrolimus • Mycophenolsäure • Azathioprin • Sirolimus • Steroide
<p><u>Daten zur Implantationsbiopsie:</u></p>
<p>Art der Biopsie (Stanzzyylinder, Keilexzisat)</p>
<p>Anzahl der Glomerula in der Biopsie</p>

Prozentzahl der global sklerosierten Glomerula
Prozentzahl der atrophen Tubuli
Schweregrad der vaskulären Veränderungen
Daten zu Folgebiopsien:
Indikation der Biopsie (Funktionsverschlechterung oder Kontrollbiopsie)
Monat und Jahr der Biopsie
Anzahl der Glomerula in der Biopsie
Prozentzahl der global sklerosierten Glomerula
Prozentzahl der atrophen Tubuli
Schweregrad der vaskulären Veränderungen
Banff-Score
<u>Verlaufsdaten nach jeweils 3, 6, 12, 24, 36 und 48 Monaten:</u>
Datum der Kontrolle
Transplantatsüberleben
Überleben des Patienten
Körpergewicht
Kreatinin im Serum
Blutdruck systolisch und diastolisch
Proteinurie
Kreatinin im Urin
Art der immunsuppressiven Therapie zum Zeitpunkt der Kontrolle: <ul style="list-style-type: none"> • Ciclosporin A • Tacrolimus • Mycophenolsäure • Azathioprin • Sirolimus • Steroide
Medikation mit einem ACE-Hemmer

Medikation mit einem AT2-Antagonisten
Ist eine Gefäßerkrankung neu aufgetreten?
Ist ein arterieller Hypertonus neu aufgetreten?
Ist ein Diabetes mellitus neu aufgetreten?
Ist ein Harnwegsinfekt aufgetreten?
Ist eine schwere Infektion/Spesie aufgetreten?
Ist eine Tumorerkrankung neu aufgetreten?
Ist eine andere schwere Erkrankung aufgetreten, die eine Hospitalisierung erforderlich machte?

7. Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. med. Henne-Bruns für die Möglichkeit diese Arbeit in Ihrer Abteilung anfertigen zu dürfen. Herrn Dr. med. Mathias Wittau danke ich für die großartige Betreuung in Ulm. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Christoph Jacobi für die ebenfalls exzellente Betreuung und die Durchführung der Versuche an der MHH. Des Weiteren danke ich Frau Carolin Utecht für Beratung und Erklärungen bezüglich der statistischen Auswertung der vorliegenden Daten.