

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN II
DIREKTOR: PROF. DR. MED. G. A. J. RIEGGER
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**UNTERSUCHUNG VON POLYMORPHISMEN DER
SIGNALTRANSDUKTIONSMOLEKÜLE MYD88 UND MAL DER TOLL-LIKE-
REZEPTOREN – AUSWIRKUNGEN AUF DEN VERLAUF DER
NIERENFUNKTION UND DAS PATIENTENÜBERLEBEN NACH
NIERENTRANSPLANTATION**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Andreas Walberer

2010

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN II
DIREKTOR: PROF. DR. MED. G. A. J. RIEGGER
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**UNTERSUCHUNG VON POLYMORPHISMEN DER
SIGNALTRANSDUKTIONSMOLEKÜLE MYD88 UND MAL DER TOLL-LIKE-
REZEPTOREN – AUSWIRKUNGEN AUF DEN VERLAUF DER
NIERENFUNKTION UND DAS PATIENTENÜBERLEBEN NACH
NIERENTRANSPLANTATION**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Andreas Walberer

2010

Dekan:	Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Bernhard K. Krämer
2. Berichterstatter:	PD Dr. Stefan Farkas
Tag der mündlichen Prüfung:	Freitag, 18. März 2011

MEINEN ELTERN
Georg und Ingrid Walberer
IN LIEBE UND DANKBARKEIT

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
1.1 Hintergrund.....	3
1.2 Das angeborene und das adaptive Immunsystem (IS).....	6
1.3 Toll-like Rezeptoren.....	7
1.3.1 MyD88 abhängiger Weg	8
1.3.2 TRIF - abhängiger Weg.....	8
1.3.3 Gleichzeitige Aktivierung verschiedener TLRs.....	9
1.4 TLR und Transplantation	10
1.5 Zusammenfassung aktueller Probleme der Nierentransplantation und Hypothese der Arbeit.....	12
2. Material und Methoden	14
2.1 Demographie der Studienpopulation.....	14
2.2 Endpunkte	15
2.2.1 Primäre Endpunkte.....	15
2.2.2 Sekundäre Endpunkte	15
2.3 DNA – Isolierung.....	16
2.4 Detektion von genetischen Varianten mittels Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)-Analyse	17
2.5 Taqman Analyse.....	18
2.6 Rekonstruktion der Haplotypen und Diplotypen des MAL-Gens	18
2.7 Statistik.....	19
3. Ergebnisse	20
3.1 Demographische Daten der Studienpopulation.....	20
3.2 Screening nach genetischen Variationen.....	21
3.3 Kopplungs (Linkage-)-Analyse und Auftreten der Haplotypen	23
3.4 Auswirkung von MAL-Haplotypen auf die Transplantatfunktion.....	28
3.5 Auswirkung von MAL-Diplotypen auf die Transplantatfunktion.....	28
3.5.1 Verzögerte Organfunktion (DGF).....	28
3.5.2 Transplantatüberleben.....	28
3.5.3 Patientenüberleben.....	31
3.5.4 Akute Abstoßung (ARE)	33

3.6	Häufigkeit kardiovaskulärer Ereignisse (CV-Ereignis)	33
4.	Diskussion.....	37
4.1	Akute Rejektion und mikrobielle Infektionen	38
4.2	Transplantatüberleben.....	39
4.3	Verzögerte Organfunktion (Delayed graft function, DGF) und Ischämie-Reperfusionsschaden (IRS).....	40
4.4	Arteriosklerotische Ereignisse	41
4.5	Die Rolle der Toll-like Rezeptoren und ihre Signaltransduktionsmoleküle als pharmakologische Zielstrukturen zur Eindämmung von Infektionen und sterilen Inflammationen bei NTX	42
4.6	Hardy-Weinberg Equilibrium	44
4.7	Schlussfolgerung	44
5.	Zusammenfassung.....	46
6	Literaturverzeichnis.....	49
7	Anhang.....	59
8	Danksagung	63
9	Lebenslauf.....	64
10	Publikationen	65
	Originalarbeiten.....	65
	Buchbeiträge.....	66
	Vorträge auf wissenschaftlichen Kongressen.....	66
	Poster auf wissenschaftlichen Kongressen.....	66
	Preise	68

1. Einleitung

1.1 Hintergrund

Eine Organtransplantation stellt weiterhin die Therapie der Wahl bei Patienten dar, die an einer terminalen Niereninsuffizienz leiden [1-4]. Durch viele Neuerungen, insbesondere auf dem Sektor der immunsuppressiven Therapie, konnten die Komplikationen in der Frühphase, d.h. innerhalb des ersten Jahres, zunehmend beherrscht werden [5, 6]. Im Rahmen von Studien konnten z. B. akute Rejektionsraten von 10-15% und weniger erreicht werden [7, 8]. Dies war zum einen durch die Entwicklung und den Einsatz potenterer Immunsuppressiva (Abbildung 1), zum anderen durch die Erstellung besserer therapeutischer Protokolle möglich.

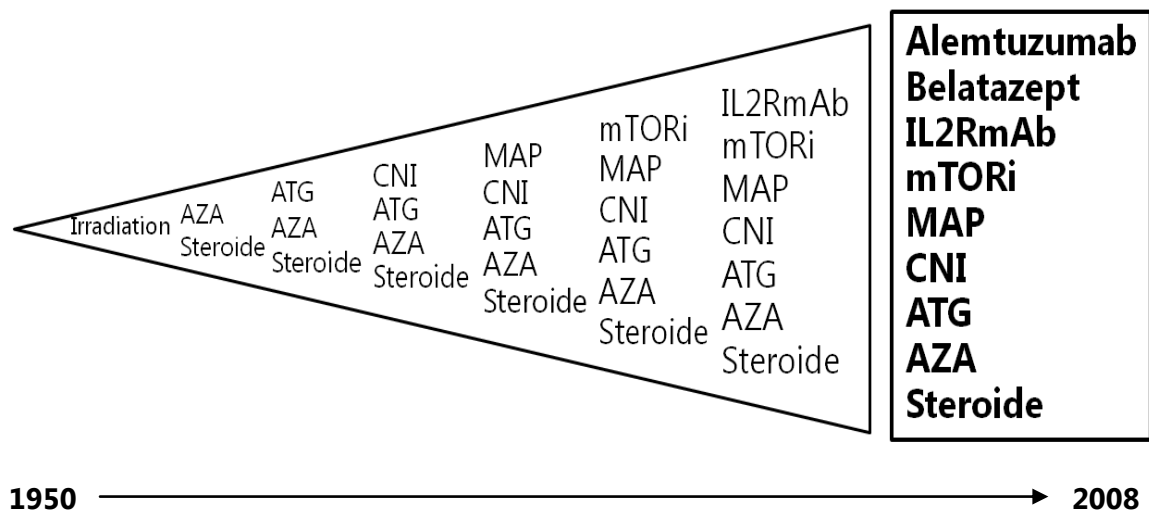


Abbildung 1: Entwicklung der Immunsuppression; Physikalische und medikamentöse Immunsuppression im Wandel der Zeit. AZA: Azathioprin, ATG: Anti-Thymozytenglobulin, MAP: Mycophenolsäure-Derivate, mTORi: mTOR-Inhibitoren, IL2RmAB: monoklonale Interleukin-2-Rezeptor Antikörper

Dieser Erfolg im ersten Jahr nach Nierentransplantation konnte jedoch nicht auf die darauf folgenden Jahre übertragen werden. Während im ersten Jahr nach Transplantation eine Überlebensrate von über 90-95%, im Gegensatz zu 50-60% Anfang der 80iger Jahre, erreicht wird, sind die jährlichen Verlustraten ab dem Folgejahr in den letzten 20-30 Jahren weitgehend stabil bei 3-5 % pro Jahr geblieben

[9]. Dies legt nahe, dass für den Langzeitverlauf bzw. den späteren Organverlust noch weitere Faktoren eine Rolle spielen. In einem ersten Schritt kann man hier eine chronische Allograftdysfunktion (CAD) vom Tod mit funktionierendem Organ (DWFG) abgrenzen, die jeweils für etwa 30 – 40% der späten Organverluste verantwortlich sind [10, 11]. Die CAD, auch als chronische Allograftnephropathie bezeichnet, wird neben einer chronischen Abstoßungsreaktion, ebenfalls durch nicht-immunologische Ursachen hervorgerufen, zu denen chronisch-toxische Effekte von Calcineurin-Inhibitoren, eine Rekurrenz der Grunderkrankung, wie beispielsweise eine diabetische Nephropathie, eine Oxalose oder eine fokale segmentale Glomerulosklerose (FSGS) gezählt werden können [12-14]. Histopathologische Kennzeichen einer CAD sind die Ausbildung einer tubulären Atrophie (TA) sowie eine interstitielle Fibrose (IF) mit einer fibrösen Verdickung der Intima der kleinen Arterien (FIT). Eventuell ist die CAD vergesellschaftet mit einer aktiven immunologischen Reaktion, die durch eine Einwanderung von leukozytären Zellen bzw. den Nachweis von abgelaufenen Antikörperreaktionen (C4d) gekennzeichnet ist [15]. In den letzten Jahren fand man unterschiedliche Risikofaktoren für die Entwicklung einer CAD, die einerseits spenderspezifischen (Spenderalter, Organqualität, Einfluss des Hirntodes), andererseits empfangender/behandlungs-spezifischen Ursachen (ethnischer oder genetischer Hintergrund, Wahl der immunsuppressiven Therapie, Rejektionen, Compliance) zuzuordnen sind [10, 16, 17].

Durch die Untersuchung des innatalen Immunsystems und seiner Effekte im Rahmen der Organtransplantation, im Speziellen des TLR-Systems, kommt es zu einem besseren Verständnis immunologischer Abläufe vor und nach einer Transplantation. Dabei gibt es zunehmend Evidenz für den Einfluss dieses Systems auf das Outcome der Patienten nach Transplantation [18-21].

Zu Beginn wird im Spenderorganismus das angeborene Immunsystem durch den „Vorgang Hirntod“ aktiviert, wodurch unterschiedliche Signalwege zu einer Hochregulation pro-inflammatorischer Zytokine in den einzelnen Organen führen [22]. Die Aktivierung, bzw. die Entstehung einer „sterilen“ Inflammation im zu

transplantierenden Organ, führt nach Transplantation zu einer Aktivierung des patienteneigenen angeborenen Immunsystems, welches zeitnaher und intensiver erfolgt [23, 24]. Durch diese Vorgänge entstehen beispielsweise endogene Liganden der Toll-like Rezeptoren, wie die Hyaluronsäure, HMGB-1 oder Fibrinogen [4, 25] Diese „sterile“ Aktivierung stellt den Beginn einer Immunantwort dar, die eine verzögerte Transplantatfunktion (DGF), oder aber auch im weiteren Verlauf eine akute/chronische Rejektion begünstigt. (Abbildung 2) [11, 26, 27].

Die kardiovaskuläre Mortalität und Morbidität stellen auch wegen einer steigenden Altersentwicklung der Transplantatempfänger ein zentrales Problem dar. Heutzutage sind die Patienten zum Zeitpunkt der Transplantation 10-15 Jahr älter als noch vor 20 Jahren [28, 29]. Hinzu kommt aufgrund fehlender Spenderorgane eine Ausweitung der Kriterien bei der Auswahl der potentiellen Organspender, so genannter „expanded criteria donors“ [28, 30, 31]. Dabei können diese Organe eine vorbestehende Erhöhung der Kreatinin-Baseline zeigen oder von älteren Spendern bzw. von Spendern mit Komorbiditäten, wie arterieller Hypertonie oder manifester koronarer Herzkrankheit stammen [32]. Im Weiteren ist in der heutigen Zeit der Diabetes mellitus, ein kardiovaskulärer Hauptrisikofaktor, wichtigste Ursache einer terminalen Niereninsuffizienz [33, 34]

Ebenso stellt die Gabe potenter Immunsuppressiva selbst einen Risikofaktor dar, da Nebenwirkungen dieser Medikamente wie Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie oder auch Adipositas zu einer Amplifikation des kardiovaskulären Risikos führen [35].

Ein weiteres Problem der hochpotenten immunsuppressiven Therapie sind Infektionen, die aufgrund einer hoch dosierten Therapie, z.T. mittels depletierender Antikörper, gehäuft in der Frühphase nach Transplantation auftreten können [22, 36]. Trotz einer prophylaktischen Gabe von Antibiotika, Virustatika bzw. Antimykotika enden diese bei einem Teil der Patienten weiterhin tödlich, wobei sich diese Zahl in den letzten Jahren im Vergleich zu Zeiten vor Einführung dieser hochpotenten Immunsuppression nur

unwesentlich verändert hat [37]. Bedingt durch eine längere Funktionsdauer der Transplantate, finden sich auch Probleme, die einer langsamen Entstehung unterworfen sind. Hier ist insbesondere der kanzerogene Effekt der Immunsuppressiva anzusprechen, der einerseits durch stärkere Pharmazeutika früh auftritt, andererseits erst nach langjähriger Exposition entstehen kann [38, 39]. Den größten Anteil machen die Hauttumoren aus, wobei Spinaliome dominieren. Maligne Tumore der Niere, des Urogenitaltraktes, maligne Lymphome, sowie Tumore des Magen-Darmtraktes sind ebenfalls gehäuft anzutreffen [40, 41].

Diese vielfältigen Probleme führten in den letzten Jahren zu Bestrebungen, eine angepasste Immunsuppression anzuwenden: „So viel Immunsuppression wie nötig, so wenig wie möglich!“. Dazu ist jedoch eine genaue Kenntnis des individuellen Risikoprofils unabdingbar.

1.2 Das angeborene und das adaptive Immunsystem (IS)

In höheren Wirbeltieren wird zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem unterschieden. Hierbei stellt das angeborene Immunsystem den evolutionär älteren Teil dar, der sich bereits bei niederen Tieren und Pflanzen wiederfindet. Im Gegensatz hierzu findet sich das adaptive Immunsystem nur bei höheren Wirbeltieren und ist in Entwicklung sowie Aufbau deutlich komplexer [2, 42, 43].

Die Wirkungsweise des adaptiven Immunsystems beruht auf einer Antigenspezifität mit entsprechender Prozessierung, die eine initial verzögerte Reaktion auf Antigene bedingt, aber um so schneller ablaufen kann, je häufiger der Organismus mit dem Antigen in Kontakt getreten ist, ein Prozess der Memory-Effekt genannt wird [44]. Die Möglichkeit des Rearrangements/ genetische Rekombination dient dabei der Anpassung an eine Vielzahl unterschiedlicher pathogener Strukturen [45]. Im Gegensatz dazu sind die Erkennungsmuster des angeborenen Immunsystems genetisch determiniert, wodurch eine rasche Immunantwort ermöglicht wird, da im Vorfeld keine komplexen Schritte zur Aktivierung nötig sind. Hierbei werden evolutionsgenetisch konservierte Strukturen von Pathogenen, die sog. pathogen-associated molecular

patterns (PAMPs), regelhaft erkannt [4, 42]. Neben körperfremden, d. h. exogenen Liganden (PAMPs), die z. B. Oberflächenmoleküle bakterieller Organismen entsprechen, ist eine Aktivierung über endogene, d. h. körpereigene Liganden möglich [3]. Zu diesen zählen beispielsweise das high mobility group box protein-1 (HMGB-1), die Hitze-Schock Proteine (HSP), Harnsäure, veränderte Matrixproteine und S100-Proteine, die aus nekrotischen sowie immunologisch aktivierten Zellen stammen können und als DAMPs (damage-associated molecular patterns) bezeichnet werden [46-49].

Das angeborene Immunsystem ist jedoch nicht nur die erste Linie der körpereigenen Abwehr, vielmehr bildet es auch die Schnittstelle zwischen Antigenerkennung und Aktivierung des adaptiven Systems [42].

1.3 Toll-like Rezeptoren

Die Toll-like Rezeptoren (TLR) des menschlichen Körpers, als homologe Struktur der Toll-Rezeptoren der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*), sind ein wichtiger Baustein der angeborenen Immunität der höheren Vertebraten. Seit ihrer Entdeckung durch Medzhitov in den 1990er Jahren wurden mehr als 10 humane, genetisch determinierte TLR entdeckt (Tabelle 1) [4, 50]. Diese bestehen aus einer extrazellulären, leucinreichen Domäne und einer intrazellulären TIR-Domäne (Toll/IL-1 receptor domain) [51, 52]. Durch den Vergleich der Aminosäuresequenz von TLRs werden diese in 5 Rezeptorfamilien eingeteilt. Zur ersten Gruppe gehören die TLR-1, 2, 6 und 10. Zur TLR-9 Gruppe gehören weiterhin die Rezeptoren TLR-7 und TLR-8. TLR-3, TLR-4 sowie TLR-5 bilden eigenständige Rezeptorfamilien [51].

Tabelle 1:TLRs und ihre chromosomale Lokalisation

TLR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Genlokus	4p14	4q32	4q35	9q32-33	1q33.3	4p14	Xp22	Xp22	Xp21.3	4p14

Neben den unterschiedlichen Zellen des Immunsystems, wie beispielsweise T-, B-Lymphozyten, monozytäre, dendritische oder NK-Zellen, werden TLRs auch durch

Parenchymzellen wie z. B. die renalen Tubulusepithelzellen, den glomerulären Zellen oder den Mesangialzellen exprimiert [25, 53, 54]. Nach Aktivierung der TLRs mittels spezifischer Liganden erfolgt eine Signaltransduktion, die relativ einheitlich abläuft, und sich durch 2 große Kaskadenwege beschreiben lässt: MyD88- bzw. TRIF-abhängig (Abbildung 2) [52].

1.3.1 MyD88 abhängiger Weg

Außer von TLR3 wird der MyD88-abhängige Weg von allen anderen TLRs benutzt [52]. Nach Aktivierung erfolgt eine Konformationsänderung des Rezeptors, so dass MyD88 an dessen intrazelluläre Domäne binden kann. Im Weiteren folgt die Aktivierung der Interleukin-Rezeptor assoziierten Kinase (IRAK) und resultiert schließlich in der [52]

- Aktivierung von AP-1 Transkriptionsfaktoren
- Aktivierung des TAK1/TAB-Komplex, der über die I κ B-Kinase eine NF κ B-Translokation aus dem Zytoplasma in den Nukleus bewirkt

1.3.2 TRIF - abhängiger Weg

Neben einer Aktivierung über MyD88, findet bei einer TLR-3 und TLR-4 Stimulation noch eine weitere Möglichkeit der Signaltransduktion statt. Im sog. TRIF-abhängigen Pfad interagiert TRIF mit RIP1 und TRAF6, welche zur Aktivierung von NF κ B und MAPKs führen. Zusätzlich kann TRIF über TRAF3 auch noch TBK1/IKKi aktivieren, wodurch IRF3 und IRF7 transkribiert werden.[55, 56]

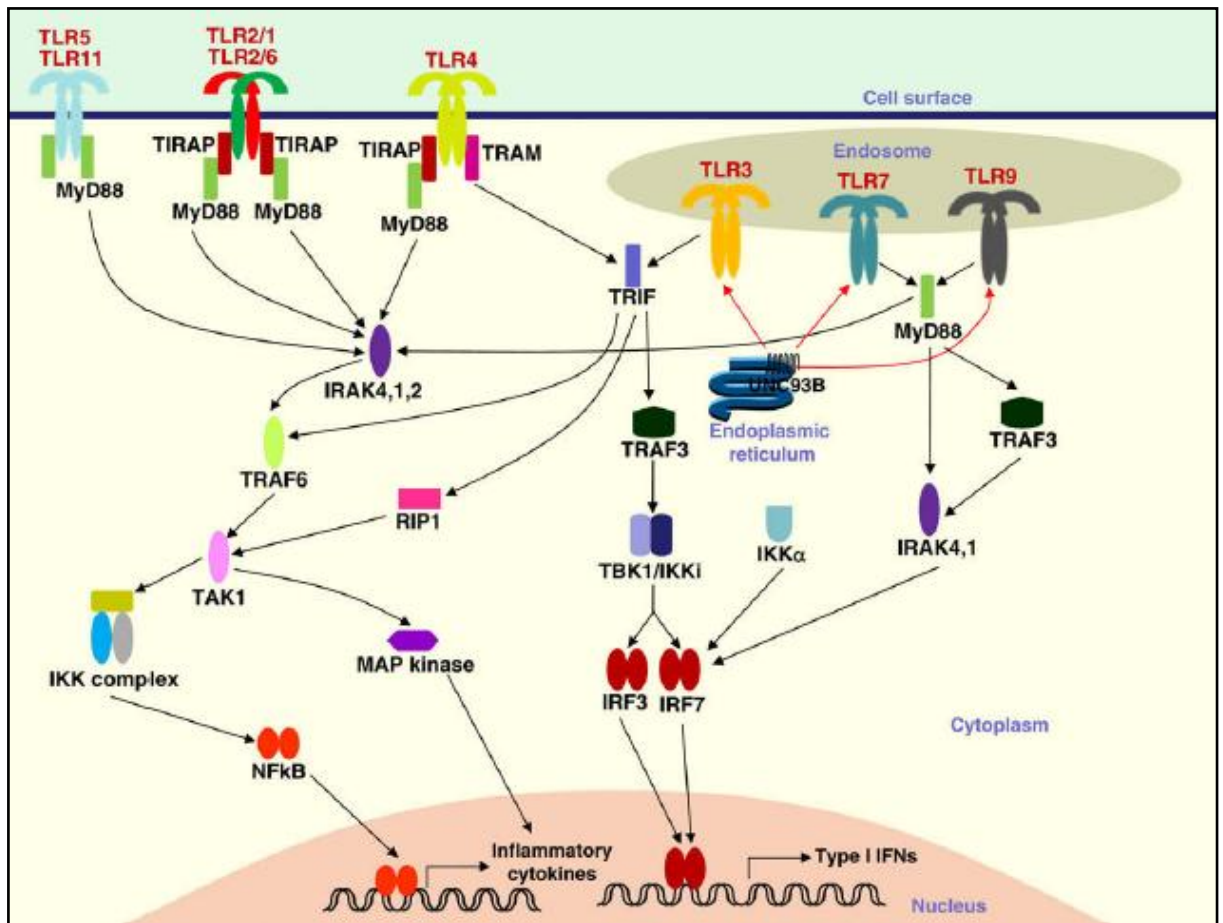


Abbildung 2: TLR-Signaltransduktion in herkömmlichen dendritischen Zellen, Makrophagen und plasmatischen dendritischen Zellen (aus Kumar et al. 2009 [52]).

1.3.3 Gleichzeitige Aktivierung verschiedener TLRs

Die kombinierte Aktivierung von TLRs kann zu synergistischen oder antagonistischen Effekten verschiedener TLRs führen, wodurch die angeborene und erworbene Immunantwort modifiziert wird. Beispielsweise hat die gleichzeitige Aktivierung von TLR2 und TLR4 einen synergistischen Effekt [57].

Synergien treten sowohl bei der MyD88-, als auch der TRIF-assoziierten Signalübertragung auf. Andere Rezeptorkombinationen führen zu einer Herabregulierung der Signalübertragung [57].

1.4 TLR und Transplantation

Neben den klassischen „Spielern“ des adaptiven Immunsystems wurden in den letzten Jahren zunehmend Daten bekannt, die genetische Varianten des angeborenen Immunsystems mit Transplantatmortalität/-morbidity assoziierten [18, 20, 58]. Durch eine detaillierte Erhebung klinischer Merkmale und Verlaufsparemeter ist es zudem möglich, explizite Fragestellungen bzgl. des langfristigen Verlaufs, wie z. B. der kardiovaskulären Morbidity/Mortality zu beantworten.

Das Augenmerk der immunologischen Forschung im Bereich der Transplantation liegt zunehmend auf den Toll-like-Rezeptoren und deren Einfluss auf das Transplantatüberleben und die Transplantatfunktion. Im Speziellen beinhaltet dies das Auftreten von akuten Abstoßungsreaktionen sowie immunologische und kardiovaskuläre Komplikationen nach Transplantation.

Palmer et al. konnte im Falle von TLR4 in Transplantatbiopsien zeigen, dass bei Vorliegen des heterozygoten Polymorphismus im Spenderorgan, d.h. im Spenderorgan war TLR4 heterozygot für die genetischen Varianten Asp299Gly oder Thr399Ile, signifikant weniger akute Transplantatabstoßungen vorkamen [20]. Ein Zusammenhang dieser genetischen Varianten im Empfänger mit akuten Abstoßungen konnte hierbei nicht nachgewiesen werden.

Eine andere Gruppe um Ducloux untersuchte ein Kollektiv von 238 nierentransplantierten Patienten und konnte bei Vorliegen dieses mutierten TLR4-Allels einen Zusammenhang mit einer erniedrigten Abstoßungsrate sowie einem geringeren Risiko arteriosklerotischer Komplikationen nachweisen [18]. Andererseits fand sich bei den Probanden mit einem mutierten TLR4-Allel, das einer loss-of-function Mutation entspricht, ein vermehrtes Auftreten von ernsthaften bakteriellen Infektionen. Das Ergebnis diesbezüglich wird jedoch durch ein höheres Lebensalter der untersuchten Population sowie einer Vorbehandlung mit ATG abgeschwächt, die per se assoziiert ist mit einem erhöhten Infektionsrisiko.

Bei einem anderen vor Kurzem untersuchten Molekül der intrazellulären Signalübertragung von TLRs, konnte der Polymorphismus rs8177374 im MAL-Gen als positiver Faktor für das Erkrankungsrisiko mit Tuberkulose und systemischem Lupus erythematodes (SLE) gezeigt werden [59]. Hierbei führt der Ersatz einer Serin Aminosäure durch Leucin an Position 180 zu einer signifikanten Verminderung des Risikos einer TBC-Infektion oder einer SLE-Erkrankung. Ursache hierfür ist eine reduzierte NFκB Transkription, da die Signalübertragung bei Aktivierung von TLR2, ein wichtiger Rezeptor bei der TBC-Infektion, über MAL vermindert ist.

Wu et al. konnten im Tiermodell eine Assoziation des TLR4/MyD88 Signalweges mit dem Auftreten eines IRS zeigen [60]. Dazu wurde bei Mäusen eine warme Ischämie durch 22-minütige Perfusionsunterbrechung der Nieren mit Mikroklemmen induziert. Anschließend wurden die Klemmen entfernt und die Nieren wieder perfundiert. Die Aktivierung von TLR4 wurde durch Bestimmung der mRNA-Expression sowie die Nierenfunktion im nachfolgenden Verlauf anhand des Serum-Kreatinins dokumentiert. Mäuse mit einer fehlenden Expression von TLR4 oder MyD88 zeigten einen deutlich geringeren Schaden an den Tubulusepithelzellen mit einem niedrigerem Serumkreatinin in den Folgetagen nach Ischämie [60].

Dieses Ergebnis bestätigte sich ebenfalls bei TLR2 Knock-out Mäusen, wobei TLR2 nach warmer Ischämie durch 45 minütige Abklemmung der renalen Arterie eine proinflammatorische Rolle zukam. Dabei sezernierten die Mäuse mit fehlendem TLR2 signifikant weniger Zytokine und Chemokine und das Ausmaß der inflammationsbedingten Organschädigung sowie dessen Fehlfunktion, gemessen durch Harnstoff und Kreatinin, war deutlich geringer [54].

Der Ischämie-/Reperfusionsschaden (IRS) stellt technisch aber auch prognostisch ein bisher nicht vermeidbares Problem in der modernen Transplantation dar. Es liegen signifikante Hinweise für eine Rolle der TLR nach Nierentransplantation vor, die in Verbindung mit einem ischämischen Reperfusionsschaden stehen. So konnten Krüger et al. eine signifikant höhere Expression des TLR4 in der Niere nach Ischämie im

Rahmen der Transplantation zeigen [25]. Dabei wurde nach Kaltkonservierung eines Transplantats, eine erhöhte Sekretion von HMGB1, einem endogenen Liganden von TLR4, durch Tubuluszellen des Donororgans gemessen.

Dies legt eine bedeutende Rolle von TLR4 im Rahmen einer inflammatorischen Antwort nach Transplantation nahe. Somit stehen diese TLRs als Zielmolekül für künftige, präventive Behandlungsoptionen eines IR-Schadens im Zentrum des Interesses.

1.5 Zusammenfassung aktueller Probleme der Nierentransplantation und Hypothese der Arbeit

Wie oben beschrieben, gab es in den letzten drei Jahrzehnten eine deutliche Verbesserung betreffend Transplantatüberleben im ersten Jahr, akuter Rejektion, besserer Kompatibilität von Spenderorgan und Empfänger und der chirurgischen Komplikationen. Jedoch ergeben sich bisher hieraus noch keine verbesserten Langzeitergebnisse nach Nierentransplantation. Dieses bleibt, trotz potenterer immunsuppressiver Therapeutika und besserer chirurgischer Techniken, mit 3-5% jährlichen Organverlusten konstant. Daraus ergab sich letztlich die Frage nach weiteren immunologischen Einflussfaktoren, welche bei einer Nierentransplantation eine Rolle spielen. Hier gab es nach der Entdeckung der sog. TLR durch Medzhitov 1997 [61], die eine Schnittstelle zwischen innatem und adaptivem Immunsystem darstellen, ein besseres Verständnis immunologischer Abläufe, die ursächlich für eine akute Rejektion oder den späten Organverlust sein könnten. Insbesondere konnte eine Assoziation eines Polymorphismus im TLR2 und TLR4 mit dem Outcome nach einer Organtransplantation gezeigt werden [18, 54, 60]. Dabei war die Aktivierung dieser Rezeptoren und die damit einhergehende sterile Inflammation nach kalter Präservierung und Transplantation im Tiermodell sowie beim Menschen Ursache des schlechteren Outcomes [18, 25]. Durch eine bereits sehr früh stattfindende Schädigung des Transplantats, wird im späteren Verlauf eine chronische Dysfunktion oder eine chronische Abstoßung am transplantierten Organ wahrscheinlicher.

Da mittlerweile zehn verschiedene TLRs im humanen Genom nachgewiesen werden konnten, stellt das Screening jedes einzelnen Rezeptors zwar eine mögliche jedoch aufwendige Methode dar, die durch Untersuchung der hauptsächlichlichen Signaltransduktionsmoleküle vereinfacht werden kann.

Das Hauptinteresse unserer Arbeit war es nun, Effekte polymorpher Signaltransduktionsmoleküle im Rahmen einer Nierentransplantation, auf das Organ- und Patientenüberleben zu finden. Dazu eignen sich insbesondere die primären Adaptermoleküle der intrazellulären Signaltransduktion, die mit Ausnahme von TLR3 regelhaft über MyD88 und MAL abläuft. Diese könnten in Zukunft als denkbare therapeutisches Target dienen und so transplantationsassoziierte Schäden durch vorherige Blockierung des TLR2 und TLR4 Signalweges verhindern. Ebenso kann dies zur Entwicklung eines fakultativen Zusatzes zur Organspüllösung führen, der sofort nach Transplantatentnahme zur prophylaktischen Behandlung des Organs eingesetzt die Inflammation unterdrücken könnte

Dies dient zum einen als Verbesserungsmöglichkeit der Organkonditionierung, andererseits besteht die Option einer Risikoevaluation sowie -Reduktion im Langzeitverlauf.

2. Material und Methoden

2.1 Demographie der Studienpopulation

Die Studienpopulation bestand aus 352 nacheinander in die Studie aufgenommener Patienten, die zwischen 1995 und 2006 im Transplantationszentrum des Universitätsklinikums Regensburg ihre erste Nierentransplantation bekamen. Dies entspricht etwa 95,1 % aller, die in diesem Zeitraum transplantiert wurden. Der Zeitraum post transplantationem, in denen sich diese Patienten in unserer ambulanten Beobachtung befanden, erstreckte sich mindestens über 27 Monate, durchschnittlich über 60,3 Monate. In dieser Zeit fanden regelmäßige klinisch-körperliche Untersuchungen sowie laborchemische Kontrollen statt. Die klinischen Datensätze der jeweiligen Teilnehmer wurden prospektiv in unserer Datenbank erhoben, und anschließend retrospektiv überprüft. Dazu zählten das Spender- und Empfängeralter, das Geschlecht, die präformierten reaktiven Antikörper (PRA), die kalte Ischämiezeit (CIT), die Immunsuppression, das Auftreten von Abstoßungsreaktionen, die Laborwerte, klinische Untersuchungsbefunde, Patienten- und Organüberleben. Die Diagnose von Infektionen, insbesondere Harnwegs- und Cytomegalievirusinfekte wurden klinisch bzw. anhand laborchemischer Befunde erhoben. Die standardmäßige Immunsuppression bestand aus einem Calcineurin-Inhibitor (Cyclosporin A oder Tacrolimus), einem Proliferationshemmer (Mycofenolat Mofetil/Mycophenolsäure oder Azathioprin) sowie Steroiden. Akute Rejektionen wurden initial mit einer dreitägigen Steroidbolustherapie behandelt, in steroidresistenten Fällen mit Antithymozytenglobulin (ATG). Alle Patienten wurden vor Aufnahme in die Studie gemäß der „Declaration of Helsinki“ und den nationalen gesetzlichen Bestimmungen aufgeklärt. Ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Regensburg lag zu Beginn der Durchführung der Studie vor.

2.2 Endpunkte

2.2.1 Primäre Endpunkte

Akute Rejektion (AR), verzögerte Organfunktion (DGF), Organüberleben

Die akute Abstoßung, wurde in >95% der Fälle bioptisch gesichert, in den übrigen Fällen definierten wir sie durch eine $\geq 30\%$ ige Erhöhung des Serumkreatinins ohne weitere offensichtliche Ursache, sowie ihren Rückgang auf das Ausgangsniveau nach durchgeführter Steroid-Pulstherapie. In Fällen einer Steroidresistenz erfolgte die Gabe von ATG.

Eine verzögerte Organfunktion wurde als Notwendigkeit einer Dialysebehandlung innerhalb der ersten 7 Tage nach Transplantation festgelegt [62]. Das Überleben des Organs definierte sich durch das Empfängerüberleben mit einem funktionierenden Transplantat und wurde für Tod zensorisiert.

MACE (major adverse cardiovascular events)

MACE wurde als kombinierter Endpunkt, bestehend aus Myokardinfarkt, maligne Arrhythmien, jegliche Form der koronaren Intervention (PTCA mit/ohne Stentimplantation) oder eine chirurgischen Revaskularisation (Bypass-Operation), Apoplex (hämorrhagisch und/oder ischämisch), operative Sanierung peripherer Gefäße oder Amputationen, sowie Tod als Folge einer dieser Erkrankungen definiert.

2.2.2 Sekundäre Endpunkte

Geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (eGFR)

Die Abschätzung der glomerulären Filtrationsrate (eGFR) erfolgt anhand der abgekürzten MDRD – Formel, die durch die K/DOQI Gruppe vorgeschlagen wurde [1].

Schwere Infektionen, Harnwegs- und CMV-Infekte

Schwere Entzündungen wurden angenommen, wenn eine stationäre Behandlung aufgrund eines bakteriellen oder viralen Infektes notwendig war.

Da Harnwegsinfekte (HWI) insbesondere innerhalb des ersten Jahres gehäuft auftreten, wurden diese ebenfalls als „infektiologischer“ Endpunkt definiert. Ein HWI wurde hierbei durch das Vorhandensein einer positiven Urinkultur oder eine signifikante Erhöhung der Leukozytenzahl im Urin definiert, die nach zielgerechter Behandlung in Kontrolluntersuchungen nicht mehr nachweisbar waren.

Der Nachweis von Cytomegalievirus(CMV)-Infektionen erfolgte über den positiven Nachweis einer Viruslast mittels Polymerasekettenreaktion (PCR). Die Messhäufigkeit war von der Zeit post transplantationem abhängig und umfasste wöchentliche Messungen innerhalb der ersten vier Wochen, bis einmal pro Monat oder weniger darüber hinaus. Eine CMV-Infektion lag vor, wenn die CMV-PCR positiv ausfiel (cut-off 10^2 - 10^3 Kopien pro ml). Bei einer sog. CMV-Risikokonstellation, Spender CMV IgG positiv und der Empfänger Spender CMV IgG negativ, erfolgte eine prophylaktische Gabe von Ganciclovir bzw. Valganciclovir über einen Zeitraum von mindestens drei Monaten nach Transplantation.

2.3 DNA – Isolierung

Von allen Probanden wurden dazu EDTA-antikoagulierte Blutproben gewonnen. Daraus wurde DNA wie bei Miller et al (1988) beschrieben extrahiert [63]. Bei dieser Methode werden die anfallenden Proteine mit Hilfe einer gesättigten NaCl – Lösung ausgefällt. Der Buffycoat (Leukozytenfilm und Blutplättchen nach Sedimentation), entstanden im EDTA-antikoaguliertem Blut wird dazu in 15 ml Polypropylenzentrifugengefäßen resuspendiert, die 3 ml Nukleotid-Lyse Puffer (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl and 2 mM Na₂EDTA, pH 8.2) enthalten. Die lysierten Zellen wurden über Nacht bei 37°C mit 0.2 ml 10%iger SDS- und 0.5 ml einer Protease K- Lösung (1 mg Protease K in 1% SDS und 2 mM Na₂EDTA) einem Verdau unterzogen. Nach Abschluss des Verdau wurden der

Suspension 1 ml gesättigte NaCl-Lösung zugeführt und 15 Sekunden geschüttelt. Darauf folgte eine Zentrifugation bei 2500/ min über 15 Minuten. Der Überstand, der die DNA beinhaltet, wurde in ein weiteres 15 ml Gefäß umgefüllt und zwei Volumeneinheiten Ethanol dazugegeben. Dann wurde die Suspension solange geschüttelt, bis die DNA ausfiel. Die präzipitierte DNA wurde anschließend in 100-200 µl TE Puffer (10 mM Tris-HCl, 0.2 mM Na₂EDTA, pH 7.5) resuspendiert.

2.4 Detektion von genetischen Varianten mittels Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)-Analyse

Bei der SSCP-Analyse handelt es sich um eine PCR-gestützte Methode, bei der sich zunutze gemacht wird, dass Einzelstrang-DNA trotz nur geringer (minimal eine Base Unterschied) Sequenzveränderungen unterschiedliche Bandenstrukturen nach elektrophoretischer Auftrennung zeigen. Durch die Verwendung unterschiedlicher Umgebungstemperaturen (Raumtemperatur und 4°C) während der elektrophoretischen Auftrennung kann eine hohe Sensitivität (>96%) erreicht werden [64].

In einem ersten Schritt wird der zu untersuchende Genabschnitt, in unserem Fall MyD88 und MAL, mit überlappenden (jeweils ca. 40-50 Basen) zu amplifizierenden PCR-Sequenzen versehen (Anhang 1A und 1B). Anschließend erfolgt eine Optimierung der einzelnen PCR-Protokolle um Fehlprodukte zu minimieren und die Sensitivität nochmals zu erhöhen. Dies beinhaltet insbesondere die Optimierung der Annealing-Temperatur, was durch eine sog. Gradienten-PCR herausgearbeitet wurde (Anhang 2). Im Anschluss an die Primer-Testung führten wir bei 47 repräsentativen Patienten aus unserem Kollektiv ein Screening nach Polymorphismen durch. Dieses erfolgte mit Hilfe der bereits oben erwähnten SSCP Gelelektrophorese. Die SSCP-Analyse führten wir in einer modifizierten Methode nach Orita et al. durch [64, 65], wobei pro Probenansatz 5 µl DNA (ca. 50 ng), 8 µl Eppendorff MasterMix®, 1 µl Mischung aus forward und reverse Primer (je ca. 10 ng) und 6 µl Wasser vermischt wurden. Daraus ergaben sich 9 Polymorphismen für MAL, von denen acht SNPs waren sowie eine Deletion/Insertion.

Für MyD88 fanden wir eine Variante. Bis auf zwei MAL SNPs waren alle Variationen bekannt (Tabelle 3).

2.5 Taqman Analyse

Im Mutationsscreening fanden sich 9 verschiedene Mutationen für MAL, wobei sieben bereits in der Literatur beschrieben waren, sowie eine genetische Variante im MyD88 Gen (Tabelle 4, Abbildung 4). Diese befinden sich entweder in der kodierenden Region (n=3, Exon), dem Intron (n=2), oder den nicht-kodierenden (n=5) Bereichen am 5'- bzw. 3'-Ende (untranslated region, UTR) des Gens. Nach Verifizierung dieser genetischen Mutationen in der Sequenzierung, wurden hierfür spezifische Taqman-Sonden durch die Firma Applied Biosystems (Darmstadt) synthetisiert. Die Untersuchung des Gesamtkollektivs (n=352) erfolgte dann mit Hilfe des ABI PRISM 7900HT Sequence Detection Systems.

2.6 Rekonstruktion der Haplotypen und Diplotypen des MAL-Gens

Da wir mehrere Polymorphismen im MAL-Gen gefunden hatten, konnten wir mit Hilfe der PHASE Standard Analyse Software Version 2.1 Haplotypen bilden [66, 67]. Das heißt wir reihten die gefundenen Variationen im MAL-Gen, unter Berücksichtigung populationsgenetischer Daten, auf einem DNA-Strang aneinander. Vor Erstellung der Haplotypen testeten wir, welche der SNPs zueinander im „Linkage“ stehen, d. h. Analyse der Beziehung einzelner Polymorphismen untereinander. Dazu verwendeten wir die Linkage Disequilibrium Analyzer Software 1.0 (Chinese National Human Genome Center, Beijing). Durch Zusammenlegung der in starker Abhängigkeit stehenden Polymorphismen verringerte sich die Anzahl der Variationen für die weitere statistische Auswertung auf sechs. Schließlich erhielten wir sechs unterschiedliche Haplotypen für das MAL-Gen in unserem Patientenkollektiv. Entsprechend des populationsgenetischen Auftretens wurden anhand der Haplotypen sogenannte Diplotypen berechnet, d.h. es wurde für jeden Patienten ein Haplotypenpaar gebildet, wobei einer von der Mutter und einer vom Vater vererbt wird. Insgesamt traten 14 Diplotypen auf. Vor einer weiteren

statistischen Auswertung reduzierten wir sie nochmals anhand der Häufigkeit auf drei Gruppen.

2.7 Statistik

Die Ergebnisse werden, falls nicht anders vermerkt, als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Kontinuierliche Variablen wurden mittels nicht-parametrischer, kategorisierte Variablen mittels 2-seitigen χ^2 oder Fisher-Exact Test verglichen. Überlebenskurven mit Beginn am ersten Tag nach Transplantation, wurden durch das COX-Regressionsmodell oder die Kaplan-Meier Methode, die unter Zuhilfenahme des log-rank Tests Gruppen vergleicht, abgeschätzt. Zur Anpassung verschiedener Störvariablen korrigierten wir folgende Kovariaten: Akute Abstoßung, verspäteter Funktionsbeginn (DGF), Empfänger- und Spenderalter, Geschlecht, Lebendspender, kalte Ischämiezeit (CIT), humanes Leukozytenantigen – Mismatch (HLA-MM), präformierte reaktive Antikörper (PRA) und Dialysedauer. Auch Diabetes mellitus, Hypertension, Hypercholesterinämie, eine Vorgeschichte als Raucher vor Transplantation und vorher stattgefundene kardiovaskuläre Ereignisse, wurde von uns statistisch erfasst. Ein p-Wert (Irrtumswahrscheinlichkeit) $<0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Datenerfassung erfolgte mit Hilfe einer Datenbank (Microsoft Access[®]). Für die Analysen sowie zur Erstellung der Grafiken, wurde SPSS[®] (Version 17.0, SPSS Inc., Chicago IL, USA) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Demographische Daten der Studienpopulation

Der Zeitraum der Datenerhebung erstreckte sich von 1995 bis 2006. In dieser Zeit konnten 352 konsekutiv nierentransplantierte Probanden in unsere Studie eingeschlossen werden, entsprechend >95 % aller Patienten, die in diesem Zeitraum am Universitätsklinikum Regensburg transplantiert wurden (Tabelle 2).

Die mittlere Beobachtungsdauer betrug 43,8 Monate, mindestens jedoch 27 Monate. Insgesamt erhielten 82 Patienten (23,3%) das Transplantat eines Lebendspenders. Betrachtet man das Kollektiv, so überleben im ersten Jahr post transplantationem 186 Organe in Gruppe A (96,4 %), 123 in Gruppe B (95,3 %) und 29 in Gruppe C (96,7 %) ($p=0,99$). Bei 123 Patienten (34,9 %) kam es im Verlauf zu einer Abstoßungsreaktion (Rejektion) und in 60 Fällen (17,0 %) zu einer verzögerten Organfunktion (DGF).

Über den gesamten Beobachtungszeitraum verloren 58 Patienten (16,5 %) ihr Transplantat, wobei 22 (6,25 %) Empfänger mit funktionierendem Organ verstarben. 42 Patienten (12,2 %) erlitten ein kardiovaskuläres Ereignis und 9 (2,6 %) verstarben nachfolgend daran. Es gab jedoch keine Assoziation dieser Ereignisse mit einer Diplotypgruppe. Die demographischen Daten unseres Kollektivs unterscheiden sich abhängig vom Geschlecht der Patienten. Männliche Transplantatempfänger haben im Durchschnitt mehr kardiovaskuläre Ereignisse vor und nach Transplantation sowie eine kürzere Zeitspanne bis zum Auftreten eines kardiovaskulären Ereignisses nach Transplantation. Zudem leiden sie häufiger an einem Diabetes mellitus vor Transplantation und sind häufiger Raucher. Das Kreatinin im Serum nach 3 und 6 Monaten post transplantationem ist ebenfalls höher. Frauen hingegen erkranken signifikant öfter an Harnwegsinfekten.

Tabelle 2: Demografische Daten des Patientenkollektivs

n=352	weiblich (n=111)	männlich (n=241)	gesamt (n=352)	p-Wert!
Empfängeralter [Jahre]	49,2 ± 14,2	51,1 ± 13,6	50,5 ± 13,8	0,23
Spenderalter [Jahre]	50,8 ± 15,1	50,2 ± 16,1	50,4 ± 15,8	0,74
Lebendspende [n]	26 (23,4 %)	56 (23,2 %)	82 (23,2 %)	0,97
Dialysedauer [Monate]	49,3 ± 33,8	47,8 ± 33,0	48,3 ± 33,2	0,68
Kalte Ischämiezeit [Stunden]	11,7 ± 7,3	12,1 ± 7,7	12 ± 7,6	0,62
HLA-MM [n]	2,5 (0-6)	2,8 (0-6)	2,6 ± 1,7	0,73
PRA [%]	2,5 ± 12,0	1,0 ± 6,8	1,5 ± 8,8	0,14
ARE [n]	39 (35,1 %)	85 (35,3 %)	124 (35,2 %)	0,98
DGF [n]	16 (14,4 %)	44 (18,3 %)	60 (17,0 %)	0,37
BMI [kg/m²]	25,5 ± 4,9	25,9 ± 3,9	25,8 ± 4,2	0,35
MACE (vor NTx) [n]	26 (23,4%)	111 (46,1%)	137 (38,9 %)	<0,0001
Nikotin (vor NTx) [n]	25 (22,5 %)	94 (39,0 %)	119 (33,8 %)	0,0024
DM (vor NTx) [n]	8 (7,2 %)	52 (21,6 %)	60 (17,0 %)	0,0009
Arterielle Hypertonie vor NTx [n]	105 (94,6 %)	231 (95,9 %)	336 (95,5 %)	0,60
CMV infection [n]	44 (39,6%)	87 (36,1%)	131 (37,2 %)	0,52
HWI neu [n]	2,1 ± 1,5	1,5 ± 0,8	1,8	0,0005
CRP nach 3 Monaten [mg/dl]	5,9 ± 9,4	7,7 ± 17,7	7,1 ± 15,6	0,84
CRP nach 6 Monaten [mg/dl]	8,3 ± 18,2	6,7 ± 11,9	7,2 ± 14,2	0,75
Kreatinin nach 3 Monaten [mg/dl]	1,6 ± 0,7 (n=108)	1,9 ± 0,8 (n=232)	1,8 ± 0,9 (n=340)	<0,0001
Kreatinin nach 6 Monaten [mg/dl]	1,6 ± 0,7 (n=105)	2,0 ± 0,9 (n=226)	1,9 ± 0,9 (n=331)	<0,0001

HLA-MM: Humanes Leukozyten Antigen Mismatch, PRA: Präformierte reaktive Antikörper, DGF: Verzögerte Organfunktion, ARE: Akute Rejektions Episoden, MACE: Major Adverse Cardiovascular Event, (schweres kardiovaskuläres Ereignis), BMI: Body-Mass-Index, HWI: Harnwegsinfekt, DM: Diabetes mellitus, Hyperchol: Hypercholesterinämie, CMV: Cytomegalievirus, CRP: C-reaktives Protein, NTx: Nierentransplantation

3.2 Screening nach genetischen Variationen

Im Mutationsscreening fanden sich 9 verschiedene Mutationen für MAL, wobei sieben bereits in der Literatur beschrieben waren, sowie eine genetische Variante im MyD88 Gen (Tabelle 3). Diese befinden sich entweder in der kodierenden Region (n=3) (Exon), dem Intron (n=2), oder den nicht-kodierenden (n=5) Bereichen (untranslated region, UTR) am 5'- bzw. 3'-Ende des Gens (Abbildung 4).

Tabelle 3: Allelverteilung der einzelnen genetischen Varianten, interner Name, rs-Nummer, Funktion und Hardy-Weinberg-Equilibrium. Außer MAL-19 sind alle genetischen Varianten in der Studienpopulation normal verteilt.

	MAL-2 neu	MAL-6/1 Neu	MAL-6/2 rs8177399	MAL-11 rs7932766	MAL-11a rs8177374	MAL-12 rs8177375	MAL-13 rs8177376	MAL-14 rs611953	MAL-19 rs625413	MyD88 – 23 rs7744
Major	337 (GTTT)	334(G)	346 (C)	189 (C)	238 (C)	282 (A)	189 (T)	219 (A)	220 (C)	257 (A)
Heterozygot	11(del/GTTT)	17 (A/G)	0	102 (C/T)	92 (C/T)	68 (A/G)	141 (T/G)	120 (A/G)	123 (C/T)	86 (A/G)
Minor	0	0	6 (T)	60 (T)	15 (T)	2 (G)	22 (G)	7 (G)	6 (T)	9 (G)
Minor Allel	1,6	2,4	1,7	31,6	17,7	10,2	26,3	19,4	19,3	14,8
HWE	0,27	1,0	1,0	0,137	0,127	0,228	0,584	0,056	0,015	0,52
Funktion	Intron	5'UTR	Arg13Trp	Ala186Ala	Ser180Leu	Intron/3'UTR?	3'UTR	3'UTR	3'UTR	3'UTR

HWE: Hardy-Weinberg Equilibrium, A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin, UTR: Untranslatierte Region, Arg: Arginin, Trp: Tryptophan, Ala: Alanin, Ser: Serin, Leu: Leucin,

MAL-2 und MAL-6/1, sind nach der aktuellen Datenlage noch nicht vorbeschrieben. So befindet sich zum einen im Intron an Position - 1245 eine Insertion von vier Basen, zum anderen in der 5'UTR an Position - 32 ein SNP mit Austausch der Base G zu A. Acht dieser Mutationen entsprechen SNPs.

MyD88, das zuerst entdeckte Signaltransduktionsmolekül des TLR-Systems ergab nur einen SNP, wobei an Position 2358 entweder Adenin oder Guanin als mögliche Base gefunden wurde. Studien für die immunologischen/klinischen Auswirkungen dieser Varianten liegen bisher nicht vor. Alle dargestellten genetischen Variationen außer rs625413 innerhalb des MyD88- und MAL-Gens befanden sich im Hardy-Weinberg Equilibrium und sind somit normal verteilt (Tabelle 3).

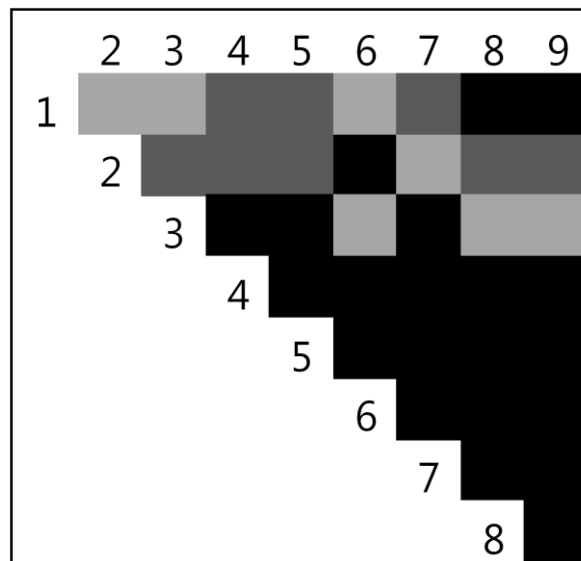
3.3 Kopplungs (Linkage-)-Analyse und Auftreten der Haplotypen

Nach Abschluß der SSCP-Analyse, wurden die gefundenen genetischen Varianten (8 SNPs und 1 Insertion/Deletion im MAL-Gen, 1 SNP im MyD88-Gen. (Siehe auch Abbildung 4) in unserem Gesamtkollektiv mit 352 nierentransplantierten Patienten untersucht. Einige dieser SNPs sowie die Insertion standen im so genannten „Linkage“, wobei einzelne SNPs stets gemeinsam auftreten (Abbildung 3). Durch Zusammenfassen aller im Linkage stehenden SNPs reduzierten wir die Zahl der weiter zu untersuchenden genetischen Varianten auf 6. Die Linkage Analyse wurde mit der Linkage Disequilibrium Analyzer Software 1.0 des Chinese Human National Genome Center durchgeführt.

Mit den verbleibenden 6 SNPs wurden mit der PHASE Standard Analyse Software Version 2.1 25 Haplotypen errechnet, wovon in unserer Population 17 aufgetreten sind. Die übrigen 8 Haplotypen (delCGCCATGT, delCGCTGTGC, delCACCATAT, delCACCATGC, delCATTATGC, delTACCGTGC, GTTTCGCTATAT, GTTTCGTCAGAT) traten wie erwartet in unserem Kollektiv nicht auf.

Tabelle 4: Haplotypenrekonstruktion unter Ausschluss der im Linkage stehenden Varianten. Mal-2 und Mal-6 sind bisher nicht in der Literatur beschrieben.

	MAL-2	MAL-6/2	MAL-6	MAL-11	MAL-11a	MAL-12	MAL-13	MAL-14	MAL-19	geschätzte Häufigkeit	Standard Fehler	Beobachtet (n)
	del/GTT	C/T	G/A	C/T	C/T	A/G	T/G	G/A	C/T			
	neu	rs817739	neu	rs793276	rs817737	rs817737	rs817737	rs61195	rs62541			
1	-	C	G	C	C	A	T	A	T	0,239823	0,001277	0,24006 (363)
2	-	C	G	C	C	A	T	A	C	0,005710	0,000199	0,00568 (4)
3	-	C	G	C	C	A	T	G	C	0,19826	0,002016	0,19886 (135)
4	-	C	G	C	C	G	T	A	T	0,021307	0,000009	0,02131 (179)
5	-	C	G	C	C	G	T	A	C	0,00142	0	0,00142 (6)
6	-	C	G	C	C	G	T	G	C	0,052486	0,001031	0,05256 (17)



■ : $0 \leq \chi^2 \leq 0,0010$

■ : $0,0010 < \chi^2 \leq 0,05$

■ : $0,05 \leq \chi^2 \leq 1,0$

Abbildung 3: Paarweises Linkage Disequilibrium der neun genetischen Varianten (8 SNPs, eine Deletion/Insertion) im MAL-Gen. Kombinationen mit $p \leq 0,05$ befinden sich im Linkage.

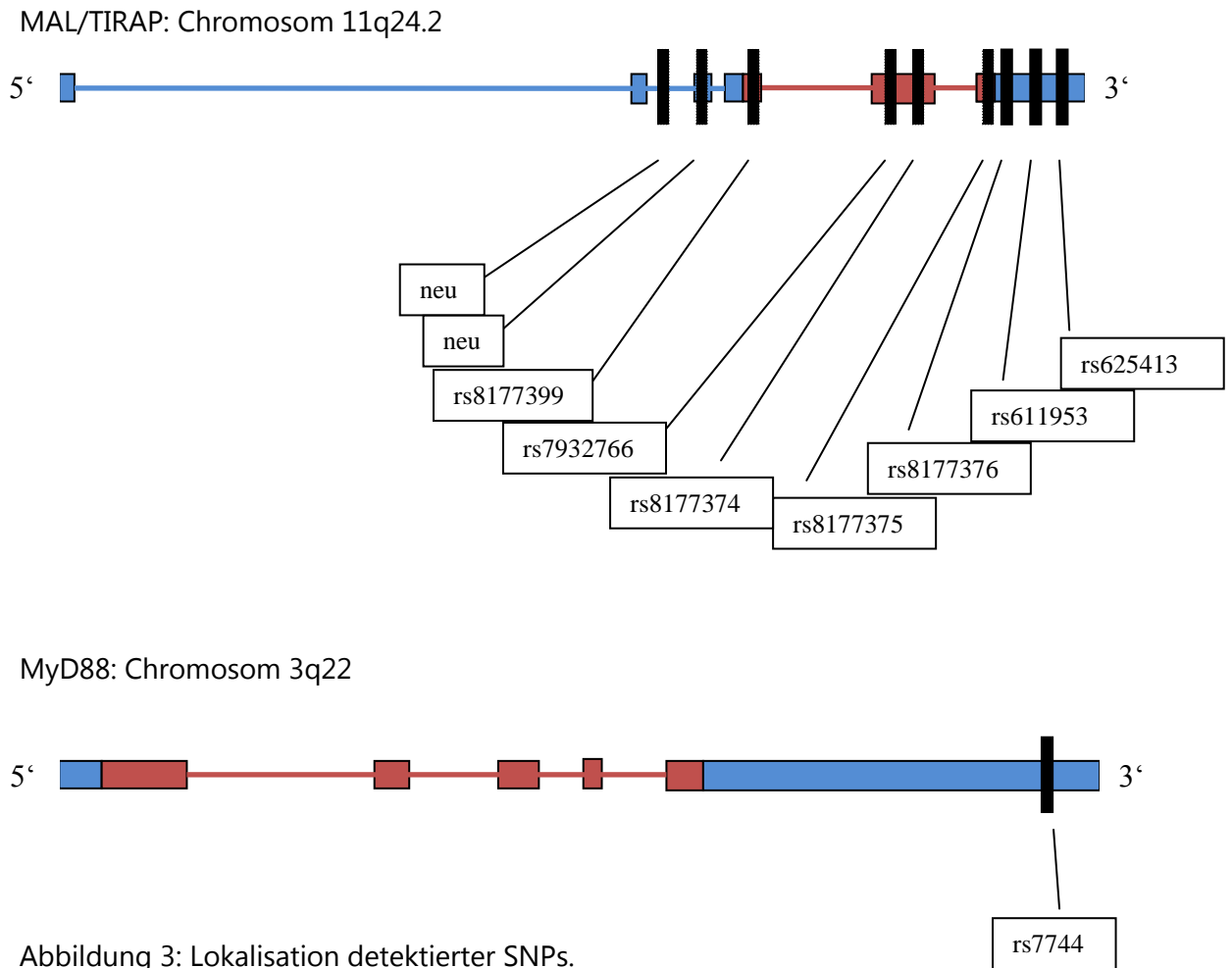


Abbildung 3: Lokalisation detektierter SNPs.

kodierende Region ■

nicht translatierte Region ■

SNP |

Abbildung 4: Genstruktur von MAL/TIRAP und MyD88. Schematische Darstellung der physikalischen Lokalisation von SNPs im MAL- und MyD88-Gen.

Nach Linkage Analyse und Haplotyprekonstruktion der SNPs, reduzierte sich die Zahl der für die weitere Auswertung verwendeten genetischen Varianten auf 6 (Tabelle 4). Da es logisch erscheint die Auswertung der Daten nicht nach Geschlecht sondern nach der genetischen Konstellation vorzunehmen, rekonstruierten wir mit Hilfe der beiden Haplotypen eines jeden Patienten dessen Diplotypen und teilten diese nach ihrer Kombination und Häufigkeit in drei Gruppen ein. In Gruppe A sind alle Kombinationen mit dem Haplotypen 1 zusammengefasst (n=198) In der gleichen Weise in Gruppe B alle Kombinationen mit Haplotyp 3, wobei 1,3 zu Gruppe B gezählt wurde (n=139). In Gruppe C befinden sich alle übrigen Diplotypen (n=30) (Tabelle 5). Innerhalb dieser Gruppen gab es keine Unterschiede bzgl. der Demographie.

Tabelle 5: Häufigkeit der Diplotypen und Gruppierung

Haplo-Kombi	Häufigkeit	Diplotyp-Gruppe
1,1	89	A
1,2	2	
1,4	92	
1,5	3	
1,6	7	
1,3	81	B
3,3	6	
3,4	37	
3,5	2	
3,6	3	
2,2	1	C
4,4	22	
4,6	6	
5,6	1	

3.4 Auswirkung von MAL-Haplotypen auf die Transplantatfunktion

Ein besondere Auffälligkeit der TLR liegt möglicherweise in den Signaltransduktionsproteinen, da viele Signalwege über MyD88 laufen. Polymorphismen oder Mutationen im MyD88 Molekül könnten deshalb schwere Folgen auf die Funktionalität des TLR-Systems haben. Hierbei wurde bereits in Tierversuchen ein positiver Effekt einer TLR4-Hemmung auf den Ischämie/Reperfusionsschaden, die akute Rejektion und den nephrotoxischen Gewebeschaden gezeigt, was eine mögliche Behandlungsmethode des post-ischämischen akuten Nierenschadens und somit der langfristigen Organfunktion darstellen könnte [18, 25, 60].

3.5 Auswirkung von MAL-Diplotypen auf die Transplantatfunktion

3.5.1 Verzögerte Organfunktion (DGF)

Eine verzögerte Organfunktion trat bei insgesamt 17 % aller Studienteilnehmer auf. Es gab jedoch keinen Zusammenhang zwischen der individuellen Diplotypgruppe und dem Auftreten einer verspäteten Nierenfunktion nach Transplantation (Tabelle 6).

Tabelle 6: Auftreten einer verzögerten Organfunktion innerhalb des Gesamtkollektives

DGF	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gesamt	
ja	36 (18,7 %)	21 (16,3 %)	3 (10 %)	60 (17 %)	0,48
nein	157 (81,3 %)	108 (83,7 %)	27 (90 %)	292 (83 %)	

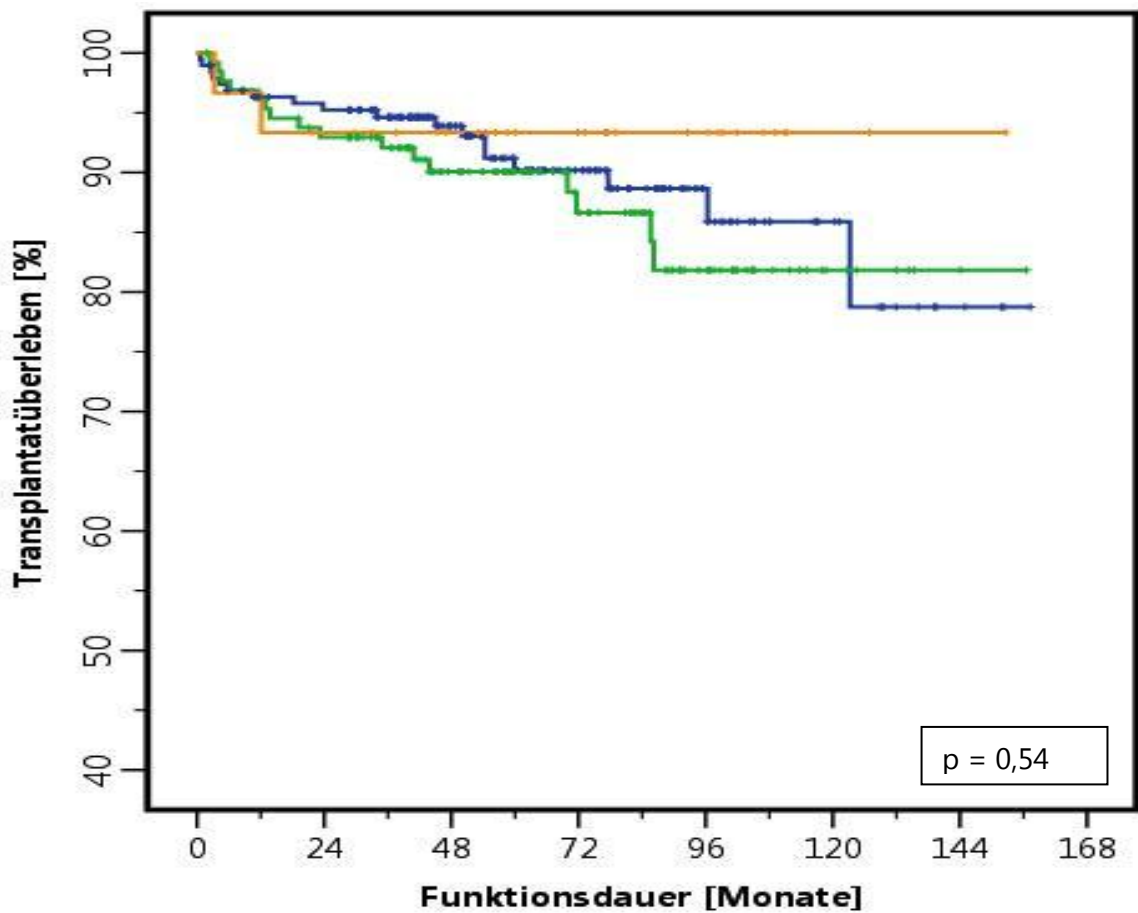
3.5.2 Transplantatüberleben

Betrachtet man das gesamte Kollektiv (n = 352), so liegt das Transplantatüberleben nach zwei Jahren, unabhängig von der Diplotypkonstellation, bei über 90 % (siehe Tabelle 7: relatives Überleben), ist jedoch unabhängig von der Diplotypgruppe ($p=0,54$). Bei 10,2 % aller Patienten kam es zum Tod mit intakter Nierenfunktion.

Tabelle 7: Überleben (%) der Transplantate in den ersten zwei Jahren nach Transplantation, geordnet nach Diplotypgruppen.

Organüberleben	A (n=193)	B (n=129)	C (n=30)	p-Wert
6 Monate	187 (96,9 %)	125 (96,9 %)	29 (96,7 %)	0,46
12 Monate	186 (96,4 %)	123 (95,3 %)	29 (96,7 %)	0,99
18 Monate	186 (96,4 %)	121 (93,8 %)	28 (93,3 %)	0,63
24 Monate	184 (95,3 %)	119 (92,2 %)	28 (93,3 %)	0,65

Wir untersuchten die Häufigkeit eines Organverlustes entsprechend der drei Diplotypgruppen. Im Verlauf der zweijährigen Mindestbeobachtungszeit verloren 21 Patienten (6,0 %) ihr Transplantat, jedoch fand sich keine Assoziation zwischen einem Organverlust und der zugehörigen Diplotypgruppe. Abbildung 4 zeigt das Transplantatüberleben der einzelnen Gruppen sowie die Patienten mit Risiko für ein Ereignis.



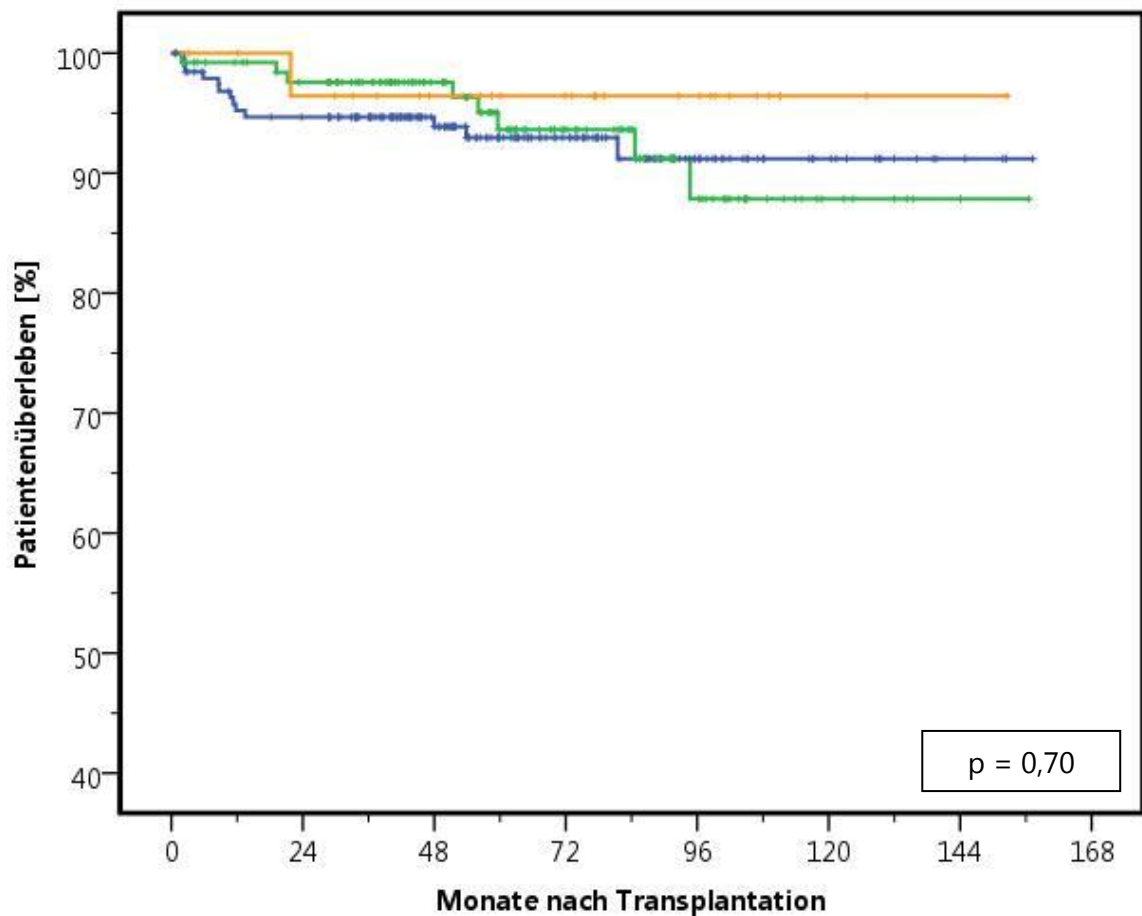
Gruppe	0	12	24	48	72	96	120	144
A	193	177	174	118	70	32	14	4
B	129	123	117	82	50	26	7	2
C	30	29	27	22	16	10	2	1

- Diplotypgruppe A
- Diplotypgruppe B
- Diplotypgruppe C

Abbildung 4: Transplantatüberleben der einzelnen Gruppen. Es zeigte sich keine Assoziation der Diplotypgruppen A (blaue Linie), B (grüne Linie) und C (orange Linie) mit dem Transplantatüberleben ($p=0,54$).

3.5.3 Patientenüberleben

Es gab keinen Hinweis für einen kausalen Zusammenhang zwischen der Diplotypgruppe und dem Überleben der Patienten innerhalb der ersten zwei Jahre nach Transplantation, was in den letzten Jahren zunehmend als Ursache für den Verlust eines Transplantats verantwortlich ist. Das Patientenüberleben beträgt im Mittel 147 Monate und zeigt in der Kaplan-Meier Analyse keine Assoziation mit einer der drei Diplotypgruppen ($p=0,70$).



Gruppe	0	12	24	48	72	96	120	144
A	193	177	174	118	70	32	14	4
B	129	123	117	82	50	26	7	2
C	30	29	27	22	16	10	2	1

- Diplotypgruppe A
- Diplotypgruppe B
- Diplotypgruppe C

Abbildung 5: Kaplan-Meier Kurven für das Patientenüberleben. Es zeigte sich keine Assoziation der Diplotypgruppen A (blaue Linie), B (grüne Linie) und C (orange Linie) mit dem Patientenüberleben ($p=0,70$).

3.5.4 Akute Abstoßung (ARE)

Die akute Abstoßung trat insgesamt bei 34,9 % der Transplantatempfänger auf, zeigte jedoch keinen Zusammenhang mit der Zugehörigkeit zu einer der Diplotypgruppen. So kam es bei 33,6 % in Gruppe A, 35,7 % in Gruppe B und 40 % der Patienten in Gruppe C zu einer Abstoßungsreaktion (Tabelle 8).

Tabelle 8: Absolute und relative Häufigkeit einer Abstoßung

Abstoßung	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C
ja	65 (33,6 %)	46 (35,7 %)	12 (40 %)
nein	128 (66,4 %)	83 (64,3 %)	18 (60 %)
gesamt	193 (100 %)	129 (100 %)	30 (100 %)

Tabelle 9: Auftreten einer akuten Rejektion (AR) nach 1, 6, 12, 18 und 24 Monaten.

ARE	A	B	C	p-Wert
28 Tage	42	29	8	0,90
180 Tage	57	43	12	0,55
365 Tage	59	44	12	0,61
18 Monate	61	44	12	0,64
24 Monate	61	44	12	0,64

Da die Mindestbeobachtungsdauer 24 Monate entspricht, ist eine Auswertung aller Patienten über diesen Zeitraum zulässig. Hierbei ergab sich kein signifikanter Einfluss auf die Häufigkeit einer akuten Rejektion entsprechend der Diplotypgruppe (Tabelle 9).

3.6 Häufigkeit kardiovaskulärer Ereignisse (CV-Ereignis)

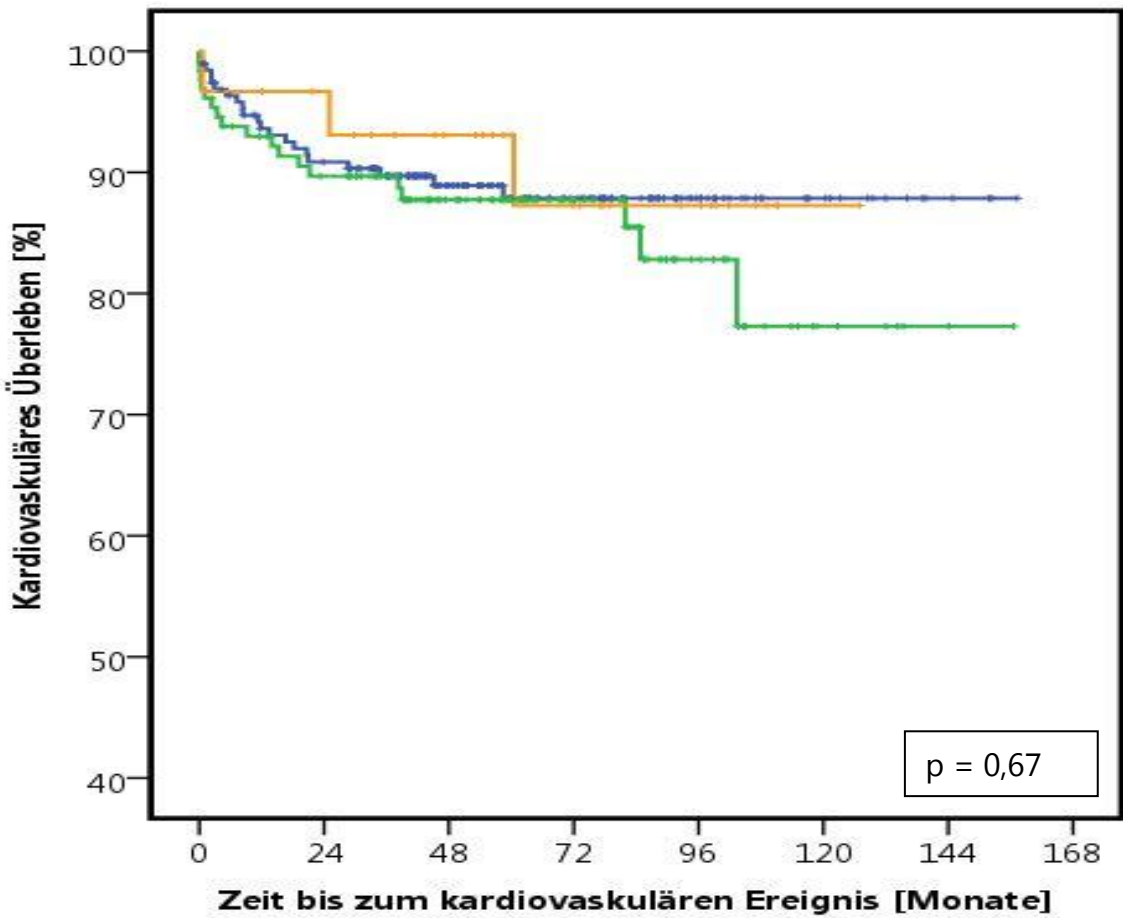
Bei 11,9 % aller untersuchten Patienten kam es zu einem kardiovaskulären Ereignis innerhalb von zwei Jahren nach Transplantation (Tabelle 10). In Gruppe A erlitten 10,9 %, in Gruppe B 14 % und in Gruppe C 10 % ein kardiovaskuläres Ereignis, was zu

keinem signifikanten Zusammenhang führte (Abbildung 6) und es gab keine Assoziation mit der Diplotypgruppe.

Tabelle 10: Häufigkeit kardiovaskulärer Ereignisse innerhalb der ersten zwei Jahre Beobachtungszeit, aufgetragen nach der Diplotypgruppe;

CV-Ereignis	A	B	C	p-Wert
6 Monate	7	8	1	0,52
12 Monate	12	9	1	0,76
18 Monate	14	11	1	0,62
24 Monate	17	13	1	0,50

Abbildung 6: Kardiovaskuläre Ereignisse nach NTx



Gruppe	0	12	24	48	72	96	120	144
A	193	177	174	118	70	32	14	4
B	129	123	117	82	50	26	7	2
C	30	29	27	22	16	10	2	1

- Diplotypgruppe A
- Diplotypgruppe B
- Diplotypgruppe C

Abbildung 5: Kaplan-Meier Kurven für das Auftreten eines kardiovaskulären Ereignisses. Es zeigte sich keine Assoziation der Diplotypgruppen A (blaue Linie), B (grüne Linie) und C (orange Linie) mit dem Risiko eines kardiovaskulären Ereignisses ($p=0,67$).

4. Diskussion

In den wichtigsten Adaptorproteinen der TLR-Signalkaskade, MyD88 und MAL, fanden sich in einem Mutationsscreening insgesamt 9 verschiedene Varianten. Davon waren 8 Varianten sog. single nucleotide polymorphisms (SNP) sowie eine weitere Variante eine Deletion/Insertion von 4 Basenpaaren. Im Gegensatz zum MAL-Gen, in dem sich insgesamt 8 verschiedene Varianten fanden (7 SNPs, 1 Deletion/Insertion), zeigte sich das MyD88-Gen hochkonserviert, mit nur einer einzigen genetischen Variation (1 SNP). Anhand dieser einzelnen genetischen Varianten wurden sog. Haplotypen und daraus nachfolgend Diplotypen gebildet, die jedoch keinen Einfluss bzgl. des Auftretens von akuten Rejektionen, verzögerter Transplantatfunktion oder Transplantat-/Patientenüberleben zeigten. Ein Effekt auf das vermehrte oder verminderte Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse, wie in anderen Populationen für Variationen von Toll-like Rezeptoren, konnte ebenfalls nicht gesehen werden. Möglicherweise führen die hier untersuchten SNPs zu keinen Funktionsveränderungen in der Reaktion des angeborenen Immunsystems bzw. führen sie zu keiner Funktionsabschwächung oder „loss-of-function“ Mutation der Signaltransduktionsmoleküle.

Bisher liegen keine Daten vor, die sich mit dem Einfluss genetischer Varianten der Toll-like Rezeptor Signaltransduktionsmoleküle auf das Outcome von Patienten nach Nierentransplantation beschäftigten. Es gibt jedoch evidente Hinweise darauf, dass Polymorphismen verschiedener Toll-like Rezeptoren eine Auswirkung auf die Funktion eines Nierentransplantats haben sowie das Überleben der Patienten beeinflussen. Zudem konnte eine Beziehung von Polymorphismen im TLR-Signaltransduktionsweg mit infektiologischen Erkrankungen gezeigt werden [59].

Zu den wichtigsten Endpunkten von Studien über den Langzeitverlauf nach Nierentransplantation zählen das Patientenüberleben, das Transplantatüberleben und die Morbidität. Daten über das Patientenüberleben werden genutzt, um Transplantation mit anderen Behandlungsoptionen der terminalen Niereninsuffizienz oder um Transplantatempfänger mit der Normalbevölkerung, das Outcome

verschiedener Zentren sowie unterschiedliche immunsuppressive Therapieschemata zu vergleichen.

Die Ursachen des Transplantatverlustes sind häufig schwer definierbar. Mögliche Ursachen sind eine Abstoßung, rezidivierende Grunderkrankungen, technische Verluste, primäre Nichtfunktion und der Tod mit funktionierendem Organ. Eine exakte Aussage über den Langzeitverlauf benötigt jedoch beides, Integration und Ausschluss dieser Kriterien, zumal der Tod mit funktionierendem Organ ein immer wichtigerer Grund für Transplantatverluste ist.

4.1 Akute Rejektion und mikrobielle Infektionen

Die Toll-Like Rezeptoren sind die Hauptklasse der „Pattern-Recognition Rezeptoren“ (PRRs) und erkennen pathogene Mikroorganismen [2]. Bekannte genetische Varianten des TLR4 haben eine verminderte Antwort auf inhaliertes Endotoxin oder LPS zur Folge und erhöhen das Risiko für schwere Infektionen [18], zudem konnte eine andere Gruppe einen Zusammenhang zwischen einer funktionellen Variante von MAL mit einem protektiven Effekt für eine invasive Pneumokokkenerkrankung, Bakteriämie, Malaria und Tuberkulose zeigen [68]. Ducloux et al. konnten zeigen, dass nierentransplantierte Patienten mit einem D299G (A/G)- und/oder Thr399Ile (C/T)-Polymorphismus signifikant weniger akute Rejektionen aufweisen. Andererseits kam es bei Transplantatempfängern mit diesen Polymorphismen vermehrt zu schweren bakteriellen Infekten, CMV Erkrankungen und Infekte durch opportunistische Pathogene [18]. Dadurch zeigt sich der enorme Anteil von TLR an der Immunkompetenz bei bakteriellen und viralen Erregern, die im Rahmen der Transplantation zusätzlich durch eine immunsuppressive medikamentöse Therapie vermindert wird [18].

In den demographischen Daten unseres Kollektivs erfassten wir CMV- und bakterielle Harnwegsinfekte, wobei diese keine Assoziation mit einer Diplotypgruppe zeigten.

Ebenso zeigten Palmer et al. signifikant verminderte akute Abstoßungsereignisse bei Patienten, deren Spenderorgan heterozygot für die Asp299Gly und Thr399Ile Allele waren, verglichen mit dem Wildtyp [20]. Jedoch bestand kein Zusammenhang mit den Empfänger TLR4 Allelen. Diese Ergebnisse lassen auf eine TLR4 vermittelte Aktivierung des angeborenen Immunsystems in der gespendeten Niere schließen [20]. In unserer Arbeit, in der wir die Signaltransduktionsmoleküle des Organempfängers untersuchten, bestand kein Zusammenhang zwischen einem einzelnen Polymorphismus oder einer unserer Diplotypgruppen und einem verstärkten Auftreten von akuten Rejektionsepisoden. Dies könnte darauf beruhen, dass die Aktivierung in diesem Fall über die TRIF-abhängige Signalkaskade zur Aktivierung von Interferon regulatory factor 3 (IRF3) führt.

4.2 Transplantatüberleben

Anders als bei Müller-Steinhardt et al., der einen signifikanten Zusammenhang zwischen einem Polymorphismus im IL-6 Gen und dem Transplantatüberleben fand, konnten wir für Interleukin-6 „low producer“ kein besseres Langzeitüberleben in unserer Population zeigen [69-71]. Dabei war die Zahl der Studienteilnehmer in unserer Untersuchung gut doppelt so groß und es wurden hier auch keine Patienten ausgeschlossen, wie dies bei Müller-Steinhardt et al. der Fall war [69-71]. In unserer Arbeit konnte keine kausale Verknüpfung einer individuellen genetischen Variante und dem Transplantatüberleben gezeigt werden, was auf das Vorliegen eines MyD88- und MAL- unabhängigen Aktivierungswegs hindeutet, wie oben beschrieben.

Bei TLR3 und TLR4 wurde eine intrazelluläre Signalübertragung durch die beiden Moleküle TRAM und TRIF nachgewiesen. Ein endogener Ligand bei TLR3 ist mRNA, bei TLR4 HSP60, HSP70, Heparansulfat, Hyaluronsäure und weitere. Da diese während der inflammatorischen Reaktion bei Nierentransplantation auftreten, ist diese Variante der TLR-Signalübertragung gut vorstellbar [72]. Zudem erklärt dies auch, warum in unserem Versuchsetting keine Assoziation bestand, in dem wir nur den MyD88-abhängigen Teil der TLR-Signalkaskade untersuchten.

4.3 Verzögerte Organfunktion (Delayed graft function, DGF) und Ischämie-Reperfusionsschaden (IRS)

Der Ischämie-Reperfusionsschaden ist ein Hauptgrund für die verzögerte Organfunktion und induziert die akute sowie chronische Transplantatdysfunktion [1, 58, 62]. Durch Freisetzung endogener Liganden bei IRS werden nach Reperfusion TLR2 und TLR4 aktiviert sowie eine Inflammation initiiert und verstärkt [3].

So wiesen TLR4^{-/-} oder MyD88^{-/-} Mäuse keine Nierenfunktionsverschlechterung sowie keinen tubulären Schaden auf und zeigten einen verminderten Einstrom von Neutrophilen und Makrophagen sowie weniger Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen. Dieser Einfluss auf den Ischämie/Reperfusionsschaden war nachweislich durch Fehlen von TLR4 und MyD88 kausal bedingt [25, 60]. Da hier TLR4 untersucht wurde, von dem wie oben genannt ein zweiter, MyD88-unabhängiger Signalweg existiert, ist es denkbar, dass die Signaltransduktion über diesen erfolgt. Dies würde ebenfalls den fehlenden Einfluss in unserer Studie erklären, in der lediglich die MyD88-abhängige Signalübertragung überprüft wurde.

Leemans et al. untersuchten die Rolle von TLR2 beim Ischämie/Reperfusionsschaden, indem sie eine verminderte inflammatorische Antwort auf IRS bei TLR2^{-/-} Mäusen in vivo zeigen konnte. Außerdem konnte diese Gruppe durch eine anschließende „antisense oligonucleotides“-Blockierung von TLR2 einen Schutz vor renaler Dysfunktion, der Einwanderung von Neutrophilen sowie der Apoptose tubulärer Zellen nach Reperfusion nachweisen [54]. Analog hierzu zeigten Wu et al. im Mausmodell eine vermehrte Freisetzung endogener Liganden und eine verstärkte Expression von TLR4 auf Tubulusepithelzellen, nach einem Ischämie/Reperfusionsschaden [60]. Sie fanden auch den Nachweis für eine MyD88-abhängige Signalübertragung innerhalb dieser Rezeptoren. Dem zur Folge waren Mäuse ohne TLR4 bzw. seinem Adaptermolekül MyD88 vor einer schlechten Nierenfunktion und einem zellulären Schaden geschützt.

In beiden Arbeiten wurden die Nieren durch zeitlich begrenzte simulierte Ischämie mit Abklemmung der A. renalis der Versuchstiere, einem IRS unterzogen und anschließend

nach Reperfusion die Organe untersucht. Dieser Versuchsaufbau unterscheidet sich von unserem dadurch, dass in unserer Arbeit die Empfänger und nicht die „gespendeten“ Organe, wie bei Leemanns und Wu, untersucht wurden [54, 60]. Dies zeigt den starken Einfluss des organeigenen angeborenen Immunsystems und die starke Expression endogener Liganden nach einem IRS.

Zusätzlich konnten Krüger et al. den Einfluss von TLR4 im Spenderorgan in Verbindung mit dem Ischämie/Reperfusionsschaden und der damit verbundenen verzögerten Transplantatfunktion nachweisen [25]. Dazu untersuchte diese Gruppe Transplantatnieren durch Biopsie auf die Expression von TLR4 vor und nach Organanastomose bei Lebend- und Leichennierenspenden. Die untersuchten „Loss-of-function“ Mutationen im TLR4-Gen (Asp299Gly, Thr399Ile), weisen, wie vorher bereits von anderen Gruppen gezeigt, eine geringere Expression proinflammatorischer Gene sowie eine sofortige Organfunktion auf [25].

Diese in vitro sowie in vivo erzielten Ergebnisse zeigen eine enge Verbindung zwischen den TLRs und der Transplantatfunktion, wodurch sich eine mögliche Behandlungsmöglichkeit und Prävention eines Ischämie/Reperfusionsschadens in der Zukunft durchführen ließe. Da nur vier Signaltransduktionsproteine im humanen Immunsystem nachgewiesen wurden, hätten diese eine spezifische Zielstruktur einer möglichen inhibierenden pharmakologischen Therapie ergeben, ohne dass aufwendig für jeden TLR ein individuelles Therapeutikum notwendig gewesen wäre. Im Unterschied zu den hier zitierten Studien, die das Transplantat-/Spenderimmunsystem untersuchten, war in unserer Studie das angeborene Immunsystems des Organempfängers Gegenstand der Untersuchung. Dabei bestand jedoch kein signifikanter Unterschied von polymorphen Signaltransduktionsmolekülen innerhalb der TLR und dem Transplantatüberleben.

4.4 Arteriosklerotische Ereignisse

Ducloux zeigte für nierentransplantierte Patienten mit einem TLR4 Polymorphismus ein niedrigeres Risiko für ein arteriosklerotisches Ereignis nach Transplantation und

Transplantat-Abstoßung, jedoch weisen sie eine höhere Zahl schwerer Infektionen auf [18]. Diese Patientengruppe könnte von einer geringeren medikamentösen Immunsuppression profitieren, wodurch der Infektionsschutz ebenso verbessert würde. In diesem Zusammenhang zeigten diese eine verminderte Inflammation in Verbindung mit den bekannten Polymorphismen in TLR4 Asp299Gly und Thr399Ile, wobei weniger proinflammatorische Zytokine, Akute-Phase Proteine und lösliche Adhäsionsmoleküle gebildet werden [73]. Verbindet man diese Ergebnisse mit denen von Krüger et al., der einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem CRP als Inflammationsmarker und arteriosklerotischen Ereignissen herstellte [74], so stellen die polymorphen TLR einen Schutz vor kardiovaskulären Ereignissen dar. Analog hierzu zeigten Corr et al. für den Asp-299Gly Polymorphismus erniedrigte Serum-Werte für die Inflammationsmarker IL-6, interzelluläres Zell-Adhäsions-Molekül 1 (ICAM1), vaskuläres Zell-Adhäsions-Molekül 1 (VCAM1) und E-Selektin [75]. Das Risiko einer bakteriellen Infektion war bei diesen Patienten höher, jedoch trugen sie durch den TLR-Polymorphismus einen Schutz vor arteriosklerotischen Ereignissen in sich [73, 76].

Diese Ergebnisse ließen sich nicht auf die gefundenen genetischen Varianten des Mal- oder MyD88-Genes übertragen. Keine der untersuchten SNPs zeigte eine Assoziation mit kardiovaskulären Ereignissen oder bakteriellen Infekten.

4.5 Die Rolle der Toll-like Rezeptoren und ihre Signaltransduktionsmoleküle als pharmakologische Zielstrukturen zur Eindämmung von Infektionen und sterilen Inflammationen bei NTX

Die mit dem IL-1R strukturverwandten TLRs sind Ziele natürlicher Agonisten und Antagonisten sowie synthetischer Moleküle, welche eine stärkere Wirkung oder eine Blockade des Rezeptors hervorrufen. Das „Toll-interacting“ Protein (Tollip) inhibiert die IL-1 sowie TLR-2- und TLR-4-induzierte Signalübertragung. Außerdem hat der IL-1R-Antagonist Kineret™ (Anakinra) einen Vorteil bei der Behandlung der Rheumatoiden Arthritis gezeigt [77]. Die medikamentöse Beeinflussung der TLR lässt sich auch auf die Ebene des Signaltransduktionsweges und seiner Moleküle anwenden. Da die

unterschiedlichen TLR nach dem derzeitigen Kenntnisstand nur über vier primäre Signaltransduktionsmoleküle verfügen, ist es denkbar diese als medikamentöse Zielstrukturen zu nutzen.

Durch den Nachweis einer Beziehung zwischen polymorphen Signaltransduktionsmolekülen und dem Verlauf der Organfunktion nach Transplantation, ließe sich eine einfache Methode entwickeln, diese Moleküle als Angriffspunkt einer pharmakologischen Therapie zu verwenden, wie bei der rheumatoiden Arthritis bereits im Blickpunkt experimenteller medizinischer Forschung geschehen [77].

Bowie et al. konnten nachweisen, dass die Transkription von NF κ B, die durch TLR4 und den MyD88-abhängigen Signalweg aktiviert wird, durch das virale Molekül A46R inhibiert werden kann. Ebenso zeigte er für A52R eine Blockade der IL-1 und TLR4 assoziierten NF κ B-Aktivierung über den MyD88 Signaltransduktionsweg, wobei der MyD88 – unabhängige Weg nicht beeinflusst wird [78].

Zusätzlich konnte in einer anderen Arbeit eine negative Regulierung von MAP-Kinase und NF κ B, durch Blockierung der TIR-Domänen von MyD88, MAL, TRIF und TRAM als Zielstrukturen von A46R kausal nachgewiesen werden [79].

1995 konnten Beato et al. einen intrazellulären Glukokortikoidrezeptor (GR) als Zielstruktur von Glukokortikoiden nachweisen [80]. Dadurch induzieren diese die Expression anti-inflammatorischer Proteine wie Lipokortin, Interleukin-1 Rezeptorantagonist und Interleukin-10. Darüber hinaus kommt es unter Glukokortikoideinfluss zu einer vermehrten Expression von I κ B- α , einem Inhibitor von NF κ B. Dies ist ein Zelltypen-spezifisches Phänomen, jedoch konnte in I κ B- α aktivierten Zellen ein negativer Einfluss auf die TLR Signalübertragung gezeigt werden [80, 81]. Die TLR bilden eine Schnittstelle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem und so ist die Unterbrechung der TLR-Signaltransduktion eine wichtige Ursache für die enorme immunsuppressive Wirkung von Glukokortikoiden [82].

Dadurch könnte sich eine interessante Möglichkeit ergeben, Krankheiten mit nachgewiesener Beteiligung des TLR-Systems mit Glukokortikoiden zu behandeln, jedoch ist dies eine bloße Hypothese, die es durch weitere Studien zu beweisen gilt.

4.6 Hardy-Weinberg Equilibrium

Der SNP MAL19 (rs625413) befand sich nicht im Hardy Weinberg Equilibrium und ist somit nicht normal verteilt. Unabhängig davon ist es möglich, die Gewichtung unterschiedlicher genetischer Varianten sowie einzelner Polymorphismen zu bewerten.

Unsere Studienpopulation hat denselben genetischen Ursprung und deshalb sollten alle SNPs im Hardy-Weinberg Equilibrium verteilt sein, jedoch ist diese Annahme, wie von Lee diskutiert, nicht immer zutreffend [83]. So ist es denkbar, dass SNPs, abhängig vom individuellen Alter, einem natürlichen Abnutzungsprozess unterliegen. Diese Relation zum Alter ist eventuell bei Genen der Fall, die für grundlegende Prozesse, wie Immunfunktion, Embryonalentwicklung, Apoptose und DNA-Reperatur verantwortlich sind [84].

Xu ging von der Möglichkeit einer fehlerhaften Genotypisierung, als Ursache einer Abweichung vom Hardy-Weinberg Equilibrium aus. In seiner Literaturrecherche, die 75 Artikel mit insgesamt 133 SNPs untersuchte, befanden sich 12 % der gefundenen SNPs nicht im Hardy-Weinberg Equilibrium. Dies konnte auf Fehlklassifizierungen zurückgeführt werden [85].

Da die meisten Erkrankungen wahrscheinlich eine genetische Komponente haben, ist es wohl zu einfach einen SNP, der sich nicht im Hardy-Weinberg Equilibrium befindet, als technischen Fehler in der Versuchsdurchführung zu klassifizieren, vor allem wenn dabei Umwelteinflüsse und chromosomale Alterungsprozesse vernachlässigt werden.

4.7 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit untersuchten wir den möglichen Einfluss mehrerer Polymorphismen im TLR-Signaltransduktionssystem und seine potentiellen Effekte auf den Verlauf post

transplantatonem. Hierbei zeigte keiner der definierten Endpunkte eine Assoziation mit einer Diplotypgruppe. Da hier nur der MyD88-abhängige Signaltransduktionsweg Gegenstand der Studie war, gilt es im Weiteren auch den TRIF-abhängigen Pfad und seinen möglichen Einfluss auf das Transplantat- sowie Patientenüberleben zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Der „Goldstandard“ der Therapie einer terminalen Niereninsuffizienz stellt die allogene Transplantation dar. In den letzten Jahren konnten vielerlei Probleme, insbesondere innerhalb des ersten Jahres, zunehmend besser beherrscht werden, resultierend in akuten Rejektionsraten von 10-15 % und weniger in klinischen Studien bei der Nierentransplantation. Der Langzeitverlauf konnte bisher jedoch kaum durch die Erfolge in der Frühphase beeinflusst werden. Neben „klassischen“ spender- und empfangerspezifischen Einflussgrößen wie z.B. Hirntod, kalter Ischämiezeit oder präformierter reaktiver Antikörper (PRA), fanden sich in den letzten Jahren zunehmend Faktoren die durch genetische Variationen determiniert sind. Hierbei konnte in zahlreichen Publikationen die allgemeine Bedeutung von Polymorphismen für die Transplantat- und/oder Patientenmortalität/morbidität dargestellt werden.

Unsere Aufmerksamkeit gilt in dieser Arbeit den Toll-like Rezeptoren (TLR), insbesondere dem MyD88-abhängigen, intrazellulären Signalübertragungsweg. TLR werden einerseits durch Zellen des Immunsystems, andererseits auch durch Parenchymzellen wie z.B. den renalen Tubulus-, den Glomerulus- oder den Mesangialzellen exprimiert. In unterschiedlichen Studiendesigns konnten Assoziationen mit der Morbidität/Mortalität nach Transplantation gefunden werden (Leberstudien). Neben exogenen Liganden, etwa bakterielle Bestandteile, können auch endogene Liganden, wie z.B. das HMGB1, Fibrinogen oder Hyaluronsäure, eine Aktivierung der TLRs bewirken und so letztendlich zu einer sterilen Inflammation führen. Die Signaltransduktion erfolgt dabei über die 4 wichtigsten, im humanen Genom kodierten intrazellulären Adaptorproteine der TLRs: MyD88, MAL (TIRAP), Tram (TICAM-2) und TRIF (TICAM-1).

Diese Arbeit soll die Interaktion von Polymorphismen im Signaltransduktionsweg, auf Ebene ihrer beiden wichtigsten Adaptorproteine MyD88 und MAL, zwischen Donor und Empfänger evaluieren. Dabei konnte bereits in unterschiedlichen Projekten ein Zusammenhang von Polymorphismen innerhalb TLR2 und TLR4 und dem Verlauf nach

NTx gezeigt werden. Es gibt jedoch noch keine Arbeiten über den Einfluss von Polymorphismen der Signaltransduktionsmoleküle MyD88 und MAL auf das Outcome. Da alle TLRs, außer TLR3, für die Signaltransduktion MyD88 und MAL benötigen, wählten wir diese beiden aus, um die meisten TLRs in unserem Setting abzudecken. Mögliche genetische Variationen der Signaltransduktionsmoleküle tragen zum einen zu einem besseren Verständnis des innatalen Immunsystems bei, zu anderen könnten sie künftig eine gute Möglichkeit darstellen, die immunologische Antwort im Rahmen einer Nierentransplantation pharmakologisch zu blockieren.

Anfangs suchten wir mögliche Polymorphismen mit Hilfe einer PCR Methode (s.o.). Dadurch erhielten wir sieben SNPs und eine Deletion/Insertion für MAL sowie einen SNP für MyD88. Anschließend musste eine Lösung für die große Anzahl an möglichen Haplotypkonstellationen gefunden werden, da sonst trotz ausreichender Kollektivgröße keine adäquate/handhabbare Gruppengröße erreicht werden konnte. Deshalb führten wir in einem weiteren Schritt eine Linkageuntersuchung der Haplotypen durch, um die hohe Zahl der SNPs durch die Zusammenfassung zueinander in Beziehung stehender SNPs zu minimieren. Danach bildeten wir drei unterschiedliche Gruppen von Diplotypen, deren SNPs in einer hohen Abhängigkeit zueinander standen. Dies ermöglicht neben einer Reduktion der generierten Haplotypen ein besseres Verständnis der zentralen Bereiche einzelner Gene, sowie eine Reduktion der tatsächlichen Bestimmung genetischer Variationen, das wiederum einen entscheidenden Einfluss auf Bearbeitungskosten und –zeit mit sich bringt. Nach der Definition der entsprechenden Haplotypen/Diplotypen, respektive genetischen Variationen, stand uns ein Patientenkollektiv von 352 konsekutiv eingeschlossenen Patienten mit einer erstmaligen Nierentransplantation zur Verfügung

In dieser Arbeit konnte keine Assoziation genetischer Varianten in zwei Signaltransduktionsmolekülen des TLR-Systems, nämlich MyD88 und MAL, bei erstmalig nierentransplantierten Patienten mit deren Outcome gezeigt werden. Es fanden sich keine geschlechtsabhängigen Unterschiede sowie Unterschiede nach Aufteilung der Studienpopulation in Haplotypen und Diplotypen. Weiterhin fanden wir

keinen Zusammenhang eines Haplotypen oder Diplotypen mit der Häufigkeit einer akuten Rejektion, einer verzögerten Transplantatfunktion, dem Patienten- und Organüberleben sowie dem Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen oder Todesursachen nach Nierentransplantation.

Bei der Untersuchung eines möglichen Einflusses von Polymorphismen im TLR-Signaltransduktionssystem und seine potentiellen Effekte auf den Verlauf post transplantatonem zeigte keiner der definierten Endpunkte eine Assoziation mit einer Diplotypgruppe. Da hier nur der MyD88-abhängige Signaltransduktionsweg Gegenstand der Studie war, gilt es im Weiteren auch den TRIF-abhängigen Pfad und seinen möglichen Einfluss auf das Transplantat zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

1. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification, **Am J Kidney Dis**, 2002, 39: S1-266.
2. Akira, S., Takeda, K. und Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity, **Nat Immunol**, 2001, 2: 675-680.
3. Alegre, M. L., Leemans, J., Le Moine, A., Florquin, S., De Wilde, V., Chong, A. und Goldman, M. The multiple facets of toll-like receptors in transplantation biology, **Transplantation**, 2008, 86: 1-9.
4. Anders, H. J., Banas, B. und Schlöndorff, D. Signaling danger: toll-like receptors and their potential roles in kidney disease, **J Am Soc Nephrol**, 2004, 15: 854-867.
5. Krämer, B. K., Del Castillo, D., Margreiter, R., Sperschneider, H., Olbricht, C. J., Ortuno, J., Sester, U., Kunzendorf, U., Dietl, K. H., Bonomini, V., Rigotti, P., Ronco, C., Taberner, J. M., Rivero, M., Banas, B., Mühlbacher, F., Arias, M. und Montagnino, G. Efficacy and safety of tacrolimus compared with ciclosporin A in renal transplantation: three-year observational results, **Nephrol Dial Transplant**, 2008, 23: 2386-2392.
6. Meier-Kriesche, H. U., Schold, J. D., Srinivas, T. R. und Kaplan, B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era, **Am J Transplant**, 2004, 4: 378-383.
7. Kaplan, B. und Meier-Kriesche, H. U. Renal transplantation: a half century of success and the long road ahead, **J Am Soc Nephrol**, 2004, 15: 3270-3271.
8. Vitko, S., Klinger, M., Salmela, K., Wlodarczyk, Z., Tyden, G., Senatorski, G., Ostrowski, M., Fauchald, P., Kokot, F., Stefoni, S., Perner, F., Claesson, K., Castagneto, M., Heemann, U., Carmellini, M., Squifflet, J. P., Weber, M., Segoloni, G., Backman, L., Sperschneider, H. und Krämer, B. K. Two corticosteroid-free regimens-tacrolimus monotherapy after basiliximab administration and

- tacrolimus/mycophenolate mofetil-in comparison with a standard triple regimen in renal transplantation: results of the Atlas study, *Transplantation*, 2005, 80: 1734-1741.
9. Hariharan, S., Johnson, C. P., Bresnahan, B. A., Taranto, S. E., McIntosh, M. J. und Stablein, D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996, *N Engl J Med*, 2000, 342: 605-612.
 10. Aull, M. J. Chronic allograft nephropathy: pathogenesis and management of an important posttransplant complication, *Prog Transplant*, 2004, 14: 82-88.
 11. Pascual, M., Theruvath, T., Kawai, T., Tolkoff-Rubin, N. und Cosimi, A. B. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation, *N Engl J Med*, 2002, 346: 580-590.
 12. Halloran, P. F., Melk, A. und Barth, C. Rethinking chronic allograft nephropathy: the concept of accelerated senescence, *J Am Soc Nephrol*, 1999, 10: 167-181.
 13. Jindal, R. M. und Hariharan, S. Chronic rejection in kidney transplants. An in-depth review, *Nephron*, 1999, 83: 13-24.
 14. Seron, D., Arns, W. und Chapman, J. R. Chronic allograft nephropathy--clinical guidance for early detection and early intervention strategies, *Nephrol Dial Transplant*, 2008, 23: 2467-2473.
 15. Solez, K., Colvin, R. B., Racusen, L. C., Haas, M., Sis, B., Mengel, M., Halloran, P. F., Baldwin, W., Banfi, G., Collins, A. B., Cosio, F., David, D. S., Drachenberg, C., Einecke, G., Fogo, A. B., Gibson, I. W., Glotz, D., Iskandar, S. S., Kraus, E., Lerut, E., Mannon, R. B., Mihatsch, M., Nankivell, B. J., Nickleit, V., Papadimitriou, J. C., Randhawa, P., Regele, H., Renaudin, K., Roberts, I., Seron, D., Smith, R. N. und Valente, M. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions, *Am J Transplant*, 2008, 8: 753-760.
 16. Nankivell, B. J., Borrows, R. J., Fung, C. L., O'Connell, P. J., Allen, R. D. und Chapman, J. R. The natural history of chronic allograft nephropathy, *N Engl J Med*, 2003, 349: 2326-2333.

17. Schwarz, A., Mengel, M., Gwinner, W., Radermacher, J., Hiss, M., Kreipe, H. und Haller, H. Risk factors for chronic allograft nephropathy after renal transplantation: a protocol biopsy study, ***Kidney Int***, 2005, 67: 341-348.
18. Ducloux, D., Deschamps, M., Yannarakis, M., Ferrand, C., Bamoulid, J., Saas, P., Kazory, A., Chalopin, J. M. und Tiberghien, P. Relevance of Toll-like receptor-4 polymorphisms in renal transplantation, ***Kidney Int***, 2005, 67: 2454-2461.
19. Krüger, B., Böger, C. A., Schröppel, B., Obed, A., Hoffmann, U., Murphy, B. T., Fischereder, M., Holler, E., Banas, B. und Krämer, B. K. Impact of NOD2/CARD15 haplotypes on the outcome after kidney transplantation, ***Transpl Int***, 2007, 20: 600-607.
20. Palmer, S. M., Burch, L. H., Mir, S., Smith, S. R., Kuo, P. C., Herczyk, W. F., Reinsmoen, N. L. und Schwartz, D. A. Donor polymorphisms in Toll-like receptor-4 influence the development of rejection after renal transplantation, ***Clin Transplant***, 2006, 20: 30-36.
21. Akalin, E., Ganeshan, S. V., Winston, J. und Muntner, P. Hyperuricemia is associated with the development of the composite outcomes of new cardiovascular events and chronic allograft nephropathy, ***Transplantation***, 2008, 86: 652-658.
22. Barklin, A. Systemic inflammation in the brain-dead organ donor, ***Acta Anaesthesiol Scand***, 2009, 53: 425-435.
23. Avihingsanon, Y., Ma, N., Pavlakis, M., Chon, W. J., Uknis, M. E., Monaco, A. P., Ferran, C., Stillman, I., Schachter, A. D., Mottley, C., Zheng, X. X. und Strom, T. B. On the intraoperative molecular status of renal allografts after vascular reperfusion and clinical outcomes, ***J Am Soc Nephrol***, 2005, 16: 1542-1548.
24. Nijboer, W. N., Schuurs, T. A., van der Hoeven, J. A., Fekken, S., Wiersema-Buist, J., Leuvenink, H. G., Hofker, S., Homan van der Heide, J. J., van Son, W. J. und Ploeg, R. J. Effect of brain death on gene expression and tissue activation in human donor kidneys, ***Transplantation***, 2004, 78: 978-986.

25. Krüger, B., Krick, S., Dhillon, N., Lerner, S. M., Ames, S., Bromberg, J. S., Lin, M., Walsh, L., Vella, J., Fischereder, M., Krämer, B. K., Colvin, R. B., Heeger, P. S., Murphy, B. T. und Schröppel, B. Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation, ***Proc Natl Acad Sci U S A***, 2009, 106: 3390-3395.
26. El-Zoghby, Z. M., Stegall, M. D., Lager, D. J., Kremers, W. K., Amer, H., Gloor, J. M. und Cosio, F. G. Identifying specific causes of kidney allograft loss, ***Am J Transplant***, 2009, 9: 527-535.
27. Howard, R. J., Patton, P. R., Reed, A. I., Hemming, A. W., Van der Werf, W. J., Pfaff, W. W., Srinivas, T. R. und Scornik, J. C. The changing causes of graft loss and death after kidney transplantation, ***Transplantation***, 2002, 73: 1923-1928.
28. Frei, U., Noeldeke, J., Machold-Fabrizii, V., Arbogast, H., Margreiter, R., Fricke, L., Voiculescu, A., Kliem, V., Ebel, H., Albert, U., Lopau, K., Schnuelle, P., Nonnast-Daniel, B., Pietruck, F., Offermann, R., Persijn, G. und Bernasconi, C. Prospective age-matching in elderly kidney transplant recipients--a 5-year analysis of the Eurotransplant Senior Program, ***Am J Transplant***, 2008, 8: 50-57.
29. Knoll, G. A. Is kidney transplantation for everyone? The example of the older dialysis patient, ***Clin J Am Soc Nephrol***, 2009, 4: 2040-2044.
30. Krüger, B., Zülke, C., Fischereder, M., Leingartner, T., Kammerl, M., Fürst, A., Graeb, C., Anthuber, M., Jauch, K. W. und Krämer, B. K. Early experience with the ET Senior Program "Old For Old"; better to be number one?, ***Transpl Int***, 2002, 15: 541-545.
31. Merion, R. M., Ashby, V. B., Wolfe, R. A., Distant, D. A., Hulbert-Shearon, T. E., Metzger, R. A., Ojo, A. O. und Port, F. K. Deceased-donor characteristics and the survival benefit of kidney transplantation, ***Jama***, 2005, 294: 2726-2733.
32. Fraser, S. M., Rajasundaram, R., Aldouri, A., Farid, S., Morris-Stiff, G., Baker, R., Newstead, C. G., Toogood, G. J., Menon, K. V. und Ahmad, N. Acceptable outcome after kidney transplantation using "expanded criteria donor" grafts, ***Transplantation***, 89: 88-96.

33. Haffner, S. M., Lehto, S., Ronnema, T., Pyorala, K. und Laakso, M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction, ***N Engl J Med***, 1998, 339: 229-234.
34. Molitch, M. E., DeFronzo, R. A., Franz, M. J., Keane, W. F., Mogensen, C. E. und Parving, H. H. Diabetic nephropathy, ***Diabetes Care***, 2003, 26 Suppl 1: S94-98.
35. Krämer, B. K., Böger, C., Krüger, B., Marienhagen, J., Pietrzyk, M., Obed, A., Paczek, L., Mack, M. und Banas, B. Cardiovascular risk estimates and risk factors in renal transplant recipients, ***Transplant Proc***, 2005, 37: 1868-1870.
36. Fishman, J. A. Infection in solid-organ transplant recipients, ***N Engl J Med***, 2007, 357: 2601-2614.
37. Fishman, J. A. und Issa, N. C. Infection in organ transplantation: risk factors and evolving patterns of infection, ***Infect Dis Clin North Am***, 2010, 24: 273-283.
38. Fischereder, M. Cancer in patients on dialysis and after renal transplantation, ***Nephrol Dial Transplant***, 2008, 23: 2457-2460.
39. Gallagher, M. P., Kelly, P. J., Jardine, M., Perkovic, V., Cass, A., Craig, J. C., Eris, J. und Webster, A. C. Long-term cancer risk of immunosuppressive regimens after kidney transplantation, ***J Am Soc Nephrol***, 2010, 21: 852-858.
40. Fischereder, M. und Jauch, K. W. Prevalence of cancer history prior to renal transplantation, ***Transpl Int***, 2005, 18: 779-784.
41. Guba, M., Graeb, C., Jauch, K. W. und Geissler, E. K. Pro- and anti-cancer effects of immunosuppressive agents used in organ transplantation, ***Transplantation***, 2004, 77: 1777-1782.
42. Kabelitz, D. und Medzhitov, R. Innate immunity--cross-talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines, ***Curr Opin Immunol***, 2007, 19: 1-3.
43. Medzhitov, R. und Janeway, C., Jr. Innate immunity, ***N Engl J Med***, 2000, 343: 338-344.

44. Stemberger, C., Neuenhahn, M., Buchholz, V. R. und Busch, D. H. Origin of CD8+ effector and memory T cell subsets, ***Cell Mol Immunol***, 2007, 4: 399-405.
45. Schroeder, H. W., Jr. und Cavacini, L. Structure and function of immunoglobulins, ***J Allergy Clin Immunol***, 2010, 125: S41-52.
46. Foell, D., Kane, D., Bresnihan, B., Vogl, T., Nacken, W., Sorg, C., Fitzgerald, O. und Roth, J. Expression of the pro-inflammatory protein S100A12 (EN-RAGE) in rheumatoid and psoriatic arthritis, ***Rheumatology (Oxford)***, 2003, 42: 1383-1389.
47. Foell, D., Wittkowski, H., Vogl, T. und Roth, J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules, ***J Leukoc Biol***, 2007, 81: 28-37.
48. Gill, R., Tsung, A. und Billiar, T. Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors, ***Free Radic Biol Med***, 2010, 48: 1121-1132.
49. Land, W. G. Injury to allografts: innate immune pathways to acute and chronic rejection, ***Saudi J Kidney Dis Transpl***, 2005, 16: 520-539.
50. Barton, G. M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system, ***J Clin Invest***, 2008, 118: 413-420.
51. Takeda, K. und Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity, ***Int Immunol***, 2005, 17: 1-14.
52. Kumar, H., Kawai, T. und Akira, S. Toll-like receptors and innate immunity, ***Biochem Biophys Res Commun***, 2009, 388: 621-625.
53. Banas, M. C., Banas, B., Hudkins, K. L., Wietecha, T. A., Iyoda, M., Bock, E., Hauser, P., Pippin, J. W., Shankland, S. J., Smith, K. D., Stoelcker, B., Liu, G., Grone, H. J., Kramer, B. K. und Alpers, C. E. TLR4 links podocytes with the innate immune system to mediate glomerular injury, ***J Am Soc Nephrol***, 2008, 19: 704-713.
54. Leemans, J. C., Stokman, G., Claessen, N., Rouschop, K. M., Teske, G. J., Kirschning, C. J., Akira, S., van der Poll, T., Weening, J. J. und Florquin, S. Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney, ***J Clin Invest***, 2005, 115: 2894-2903.

55. Fischereeder, M., Luckow, B., Hocher, B., Wuthrich, R. P., Rothenpieler, U., Schneeberger, H., Panzer, U., Stahl, R. A., Hauser, I. A., Budde, K., Neumayer, H., Krämer, B. K., Land, W. und Schlöndorff, D. CC chemokine receptor 5 and renal-transplant survival, **Lancet**, 2001, 357: 1758-1761.
56. Fitzgerald, K. A., McWhirter, S. M., Faia, K. L., Rowe, D. C., Latz, E., Golenbock, D. T., Coyle, A. J., Liao, S. M. und Maniatis, T. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway, **Nat Immunol**, 2003, 4: 491-496.
57. Trinchieri, G. und Sher, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence, **Nat Rev Immunol**, 2007, 7: 179-190.
58. Krüger, B., Schröppel, B. und Murphy, B. T. Genetic polymorphisms and the fate of the transplanted organ, **Transplant Rev (Orlando)**, 2008, 22: 131-140.
59. Castiblanco, J., Varela, D. C., Castano-Rodriguez, N., Rojas-Villarraga, A., Hincapie, M. E. und Anaya, J. M. TIRAP (MAL) S180L polymorphism is a common protective factor against developing tuberculosis and systemic lupus erythematosus, **Infect Genet Evol**, 2008, 8: 541-544.
60. Wu, H., Chen, G., Wyburn, K. R., Yin, J., Bertolino, P., Eris, J. M., Alexander, S. I., Sharland, A. F. und Chadban, S. J. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury, **J Clin Invest**, 2007, 117: 2847-2859.
61. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. und Janeway, C. A., Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity, **Nature**, 1997, 388: 394-397.
62. Perico, N., Cattaneo, D., Sayegh, M. H. und Remuzzi, G. Delayed graft function in kidney transplantation, **Lancet**, 2004, 364: 1814-1827.
63. Miller A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, **Nucleic Acids Research**, 1988, 16: 1215.
64. Erdmann, J., Shimron-Abarbanell, D., Rietschel, M., Albus, M., Maier, W., Korner, J., Bondy, B., Chen, K., Shih, J. C., Knapp, M., Propping, P. und Nothen, M. M. Systematic screening for mutations in the human serotonin-2A (5-HT2A)

- receptor gene: identification of two naturally occurring receptor variants and association analysis in schizophrenia, *Hum Genet*, 1996, 97: 614-619.
65. Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. und Sekiya, T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86: 2766-2770.
66. Stephens, M. und Donnelly, P. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data, *Am J Hum Genet*, 2003, 73: 1162-1169.
67. Stephens, M., Smith, N. J. und Donnelly, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data, *Am J Hum Genet*, 2001, 68: 978-989.
68. Khor, C. C., Chapman, S. J., Vannberg, F. O., Dunne, A., Murphy, C., Ling, E. Y., Frodsham, A. J., Walley, A. J., Kyrialeis, O., Khan, A., Aucan, C., Segal, S., Moore, C. E., Knox, K., Campbell, S. J., Lienhardt, C., Scott, A., Aaby, P., Sow, O. Y., Grignani, R. T., Sillah, J., Sirugo, G., Peshu, N., Williams, T. N., Maitland, K., Davies, R. J., Kwiatkowski, D. P., Day, N. P., Yala, D., Crook, D. W., Marsh, K., Berkley, J. A., O'Neill, L. A. und Hill, A. V. A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis, *Nat Genet*, 2007, 39: 523-528.
69. Krüger, B., Walberer, A., Farkas, S., Tokmak, F., Obed, A., Schenker, P., Henning, B., Schlitt, H. J., Krämer, B. K. und Banas, B. The impact of "high-producer" interleukin-6 haplotypes on cardiovascular morbidity and mortality in a kidney transplant population, *Transplant Proc*, 2009, 41: 2539-2543.
70. Müller-Steinhardt, M., Fricke, L., Müller, B., Ebel, B., Kirchner, H. und Hartel, C. Cooperative influence of the interleukin-6 promoter polymorphisms -597, -572 and -174 on long-term kidney allograft survival, *Am J Transplant*, 2004, 4: 402-406.

71. Müller-Steinhardt, M., Hartel, C., Müller, B., Kirchner, H. und Fricke, L. The interleukin-6 -174promoter polymorphism is associated with long-term kidney allograft survival, ***Kidney Int***, 2002, 62: 1824-1827.
72. Robson, M. G. Toll-like receptors and renal disease, ***Nephron Exp Nephrol***, 2009, 113: e1-7.
73. Kiechl, S., Lorenz, E., Reindl, M., Wiedermann, C. J., Oberhollenzer, F., Bonora, E., Willeit, J. und Schwartz, D. A. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis, ***N Engl J Med***, 2002, 347: 185-192.
74. Krüger, B., Walberer, A., Debler, J., Böger, C. A., Farkas, S., Obed, A., Schlitt, H. J., Banas, B. und Krämer, B. K. Is inflammation prior to renal transplantation predictive for cardiovascular and renal outcomes?, ***Transplantationsmedizin***, 2008, Suppl
75. Corr, S. C. und O'Neill, L. A. Genetic variation in Toll-like receptor signalling and the risk of inflammatory and immune diseases, ***J Innate Immun***, 2009, 1: 350-357.
76. Ballantyne, C. M. und Entman, M. L. Soluble adhesion molecules and the search for biomarkers for atherosclerosis, ***Circulation***, 2002, 106: 766-767.
77. Conti, B., Davis, C. N., Behrens, M. M., Rebeck, J. und Bartfai, T., Toll-like receptors as pharmacological targets, In: O'Neill, L. A. J. und Brint, E. (eds), *TLRs in Inflammation*, Basel, Boston, Birkhäuser Verlag, 2006: 223-240.
78. Bowie, A., Kiss-Toth, E., Symons, J. A., Smith, G. L., Dower, S. K. und O'Neill, L. A. A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling, ***Proc Natl Acad Sci U S A***, 2000, 97: 10162-10167.
79. Stack, J., Haga, I. R., Schroder, M., Bartlett, N. W., Maloney, G., Reading, P. C., Fitzgerald, K. A., Smith, G. L. und Bowie, A. G. Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence, ***J Exp Med***, 2005, 201: 1007-1018.
80. Beato, M., Herrlich, P. und Schutz, G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot, ***Cell***, 1995, 83: 851-857.

81. Tanaka, Y. [Immunosuppressive effects of glucocorticoid], ***Nippon Rinsho***, 2008, 66: 83-88.
82. Moynagh, P. N. Toll-like receptor signalling pathways as key targets for mediating the anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, ***J Endocrinol***, 2003, 179: 139-144.
83. Lee, W. C. Searching for disease-susceptibility loci by testing for Hardy-Weinberg disequilibrium in a gene bank of affected individuals, ***Am J Epidemiol***, 2003, 158: 397-400.
84. Weinberg, C. R. und Morris, R. W. Invited commentary: Testing for Hardy-Weinberg disequilibrium using a genome single-nucleotide polymorphism scan based on cases only, ***Am J Epidemiol***, 2003, 158: 401-403; discussion 404-405.
85. Xu, J., Turner, A., Little, J., Bleecker, E. R. und Meyers, D. A. Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: hint for genotyping error?, ***Hum Genet***, 2002, 111: 573-574.

7 Anhang

Anhang 1A: MAL Primerpaare

	forward	reverse
MAL - 1	5'-GTC TCC CGG GTC TGG ACT-3'	5'-TCG GTG GGG CCG GGA CTC T-3'
MAL - 2	5'-GAT TAC AGG CGT GAG CCA TT-3'	5'-GAT GGC GGA CAC TCT TTC AG-3'
MAL - 3	5'-CCA GCC TTT CAC AGG AGA AG-3'	5'-GGG AGG TTG TCA GAC TGC TT-3'
MAL - 4	5'-CGA TGG GTC TAT GGA TGG AG-3'	5'-ATA TTC GGG ATC TGG GGA AG-3'
MAL - 5	5'-CCT TCT TCT GCC ATT TCA GG-3'	5'-GAG ATT AGG GCC AGA CAC GA-3'
MAL - 6	5'-ACT TCG CAG AGC TCA TCC AT-3'	5'-GTT CCA CTC ACC AGC CAT CT-3'
MAL - 7	5'-GTC TCA CGG GGC TAG TTT TG-3'	5'-TGC GTC TCT CTG AGT TTG GA-3'
MAL - 8	5'-AGT GAG AGG GCA CCT GGT AA-3'	5'-CTC CAG CGA CTA CTG CCA CT-3'
MAL - 9	5'-GCT GAA GAA GCC CAA GAA GA-3'	5'-GCT GCC TTC CAA GTA GGA GA-3'
MAL - 10	5'-ACT ATG ACG TCT GCG TGT GC-3'	5'-CTG CAG CAT CTG GTA CTT GC-3'
MAL - 11	5'-GCC AGG CAC TGA GCA GTA GT-3'	5'-ACT TGA CGA AAG CCA CCA TC-3'
MAL - 12	5'-AGC TGC CTA CCC ACC TGA G-3'	5'-AAT AAG TGC AGG AGC CAG GA-3'
MAL - 13	5'-GAC CTG TTG GGG AAA ACA GA-3'	5'-CAA AGC GCT GTG ACT CAC TC-3'
MAL - 14	5'-CCC GGA AAT TGG AGT GAA G-3'	5'-AGC TTC CTC ATG GCT TTC CT-3'
MAL - 15	5'-CCA TTA CTG TGG GCT CCC TA-3'	5'-CCT GTC CAG TTA GGC AGG AG-3'
MAL - 16	5'-GCC AGA AAT TGG AGG TGG TA-3'	5'-CTT TCT CCT GAT GCC CAT TC-3'
MAL - 17	5'-GCA CTG GCG TAC ACT GGT AT-3'	5'-CAG TGC TGA CTG CAT CTT CC-3'
MAL - 18	5'-GAA TGG GCA TCA GGA GAA AG-3'	

Anhang 1B: MyD88 Primerpaare

	forward	reverse
MyD88-1	5'-CCT CGA GAC CTC AAG GGT AG-3'	5'-AGG GAG GAT GTG GAG GAG AC-3'
MyD88-2	5'-CCG CAG GAG AAA GAG GAA G-3'	5'-CGC ACG TTC AAG AAC AGA GA-3'
MyD88-3	5'-TCC TCC ACA TCC TCC CTT C-3'	5'-GCA GTC GGC CTA CAG AGG-3'
MyD88-4	5'-TAC TTG GAG ATC CGG CAA C-3'	5'-TCT CCA TGG GAG ACA GGA T-3'
MyD88-5	5'-AGG AGG CTG AGA AGC CTT T-3'	5'-CAG CCC ATC TGC TTC AAA C-3'
MyD88-6	5'-AGA ACA ACC CAG CCA GAG G-3'	5'-AGG GGG TCA TCA AGT GTG-3'
MyD88-7	5'-AGG GCA CTT TCT CTG AGG AG-3'	5'-CTC CTG CAC AAA CTG GAT G-3'
MyD88-8	5'-CAG TTT GTG CAG GAG ATG A-3'	5'-CAC AGC TAG GAG GAG ATG-3'
MyD88-9	5'-GCC CTT CCT GAA GCT ATT CC-3'	5'-GGA AGG CTG ACA ATC CAG AG-3'
MyD88-10	5'-TGC CAG GGG TAC TTA GAT GG-3'	5'-GGT TGG TGT AGT CGC AGA CA-3'
MyD88-11	5'-TGA TCC CCA TCA AGT ACA AGG-3'	5'-GCA CAG ATT CCT CCT ACA ACG-3'
MyD88-12	5'-TGC CCT GAA GAC TGT TCT GA-3'	5'-TCA CAG CCA CTG GTT CCA T-3'
MyD88-13	5'-TGC CAG GGG TAC TTA GAT GG-3'	5'-CTG TTC TTC CCA TCC CAC T-3'
MyD88-14	5'-TGC CTC CTC CTT TCG TTG TA-3'	5'-GGC TCT GCT GGT CCT TCT TA-3'
MyD88-15	5'-GCA TGT CCA CTT GCT GGA TT-3'	5'-ACC CAG AGCTAT GCT TCA CC-3'
MyD88-16	5'-CAG CTC TGA GCC ATT CAC AC-3'	5'-GGC ATC ACT GTG GAA GAA GC-3'
MyD88-17	5'-CTG GCT GTT GCT GGA CTA CA-3'	5'-AAG CTG GGA GGT GTG AAA GA-3'
MyD88-18	5'-CCA TTC CAC TTC CTC CTT CC-3'	5'-GAA ATG AAA AGC AGC CCA AG-3'
MyD88-19	5'-CCT AAT GGG TCC ACC TCT CA-3'	5'-TGA CTC ATC CCC AGA ACT CA-3'
MyD88-20	5'-CTT GGG CTG CTT TTC ATT TC-3'	5'-GGC AGG AGG CTT TTA TAT GG-3'
MyD88-21	5'-CAG AGA GCT TTC CCA CCA AC-3'	5'-GAC ATG GTT AGG CTC CCT CA-3'
MyD88-22	5'-ACA CAG GCA CCA GCA TAC AC-3'	5'-TCC TCC TCT CTC TGT GCT TCA-3'
MyD88-23	5'-TGA ACA AAA ATT GGG CAC TC-3'	5'-TTG CTC TGG GAA AAG GAG AG-3'
MyD88-24	5'-AGC ACA GAG AGA GGA AGA GAG C-3'	5'-GGC TGA AAG TGG AGC AAA GA-3'
MyD88-25	5'-TAC CCT CAG GCT GTC CTC TG-3'	5'-ATG GCA GCT AAA TGC CTC AA-3'
MyD88-26	5'-CCA GGA TGG AGC AAG GTA -3'	5'-TGG CAA ATA TCG GCT TTT CT-3'

Anhang 2: MAL- und MyD88-Primer mit Ergebnis der Gradienten-PCR

Primer	Temp in °C	Primer	Temp in °C
MAL-1	51	MyD88-1	59
MAL-2	61	MyD88-2	55
MAL-3	51	MyD88-3	55
MAL-4	55	MyD88-4	55
MAL-5	58	MyD88-5	57
MAL-6	56	MyD88-6	57
MAL-7	55	MyD88-7	51-58
MAL-8	51	MyD88-8	51-56
MAL-9	58	MyD88-9	51-62
MAL-10	55	MyD88-10	51-62
MAL-11	56	MyD88-11	51-58
MAL-12	56	MyD88-12	51-58
MAL-13	55	MyD88-13	53-62
MAL-14	56	MyD88-14	51-60
MAL-15	55	MyD88-15	51-60
MAL-16	56	MyD88-16	51-60
MAL-17	61	MyD88-17	57
MAL-18	55	MyD88-18	50
MAL-19	56	MyD88-19	51
MAL-20	51	MyD88-20	51
		MyD88-21	53-58
		MyD88-22	50
		MyD88-23	55
		MyD88-24	57
		MyD88-25	53-62
		MyD88-26	51-58

Anhang 3: Temperaturprofil der real-time PCR

Zyklus	Temperatur	Zeit
Denaturierung/Aktivierung		
1	95 °C	4 Minuten
Amplifikation		
30 -40 Denaturierung	95 °C	30 Sekunden
Annealing	45 bis 65 °C	30 Sekunden
Elongation	72 °C	45 Sekunden – 3 Minuten
Schlusszyklus		
1	72 °C	7 Minuten

8 Danksagung

Ganz besonders, und daher an erster Stelle gilt mein Dank *Herrn PD Dr. med. Bernd Krüger*, der diese Arbeit betreute und mich durch sachliche, konstruktive und zugleich freundliche Kritik immer wieder auf den rechten Weg brachte und motivieren konnte. Durch seine umfangreiche Expertise hat er großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit und beeinflusste meine persönliche und berufliche Entwicklung in äußerst nachhaltiger Art und Weise. Außerdem entstand in dieser langen Zeit des gemeinsamen klinischen Werdegangs eine Freundschaft, aus der ich Kraft schöpfen konnte die Hürden des Alltags zu meistern.

Im weiteren danke ich *Herrn Prof. Dr. Bernhard K. Krämer*, der mir die Zeit zur Durchführung meiner Dissertation im Labor sowie später für die Ausarbeitung meiner Ergebnisse und die schriftliche Ausführung einräumte, diese aufmerksam begleitete und mir als Mentor zur Seite stand.

Dank gilt auch den Mitarbeitern im Labor, insbesondere *Herrn Georg Gebhard*, die mich bei der technischen Durchführung der SSCP- und SNP-Analysen tatkräftig unterstützten und meinen Fragen stets hilfreich und aufgeschlossen begegneten.

Zuletzt danke ich von ganzem Herzen meinen Eltern, *Georg und Ingrid Walberer*, für die uneingeschränkte und selbstlose Unterstützung, nicht nur während meines Studiums, sondern weit darüber hinaus, indem sie stets in allen Lebenslagen hilfreich an meiner Seite stehen und mir auf meinem Lebensweg die nötige moralische Kraft geben, meine Ziele weiter zu verfolgen und zu erreichen. Vielen herzlichen Dank dafür!

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Andreas Walberer
Geburtsdatum 20.11.1977
Geburtsort Regensburg
Familienstand ledig

Schulbildung

09.1984 – 09.1998
Grundschule und Gymnasium in Burglengenfeld
Abschluss Abitur

Hochschulbildung

10.2001 – 06.2008
25.03.2004
Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
Physikum, Gesamtnote „befriedigend“

Famulaturen

01.08.2004 – 31.08.2004
Dr. Leicht, PD Dr. Orth, Praxis für Nieren und
Hochdruckkrankheiten, Schwandorf
24.02.2005 – 25.03.2005
Prof. Dr. Neugebauer, Abteilung für Unfallchirurgie,
Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, Regensburg
13.02.2006 – 26.03.2006
Prof. Dr. Krämer, Klinik und Poliklinik für
Innere Medizin II, Fachbereich Nephrologie, Regensburg
27.03.2006 – 16.04.2006
Dr. Kellner, Abteilung für Anaesthesiologie und
Intensivmedizin, Krankenhaus Burglengenfeld

Praktisches Jahr

26.02.2007 – 17.06.2007
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I und II,
Universitätsklinikum Regensburg (Direktoren Prof. Dr. med.
Jürgen Schölmerich und Prof. Dr. med. Günter Riegger)
18.06.2007 – 07.10.2007
Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Regensburg,
(Direktor Prof. Dr. med. Kai Träger)
Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Krankenhaus der
Barmherzigen Brüder Regensburg (Chefarzt Priv.-Doz.
Bernd Sido)

Vorherige berufliche Erfahrung

10.1998 – 09.2001
Ausbildung zum Beruf des Krankenpflegers, Bezirksklinikum
Regensburg

Assistenzarzt

01.07.2008-30.06.2010
Stiftung Katholisches Krankenhaus
Marienhospital Herne, Klinikum der Ruhr-Universität
Bochum, Medizinische Klinik I, Nephrologie und Allgemeine
Innere (Direktor Prof. Dr. Bernhard K. Krämer)
Ab 01.07.2010
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II, Fachbereich
Nephrologie, Regensburg (Prof. Dr. med. Günter Riegger)

10 Publikationen

Originalarbeiten

1. Henning, B. F., Kuchlbauer, S., Böger, C. A., Farkas, S., Zülke, C., Scherer, M. N., **Walberer, A.**, Banas, M. C., Krüger, B., Schlitt, H. J., Banas, B. und Krämer, B. K. Percutaneous transluminal angioplasty as first-line treatment of transplant renal artery stenosis. **Clin Nephrol**, 2009;71(5):543-549.
2. Krüger B., **Walberer A.**, Farkas S., Tokmak F., Obed A., Schenker P., Henning B., Schlitt H. J., Krämer B. K., Banas B. The impact of 'high-producer" interleukin-6 haplotypes on cardiovascular morbidity and mortality in a kidney transplant population. **Transplant Proc** 2009;41(6):2539-2543.
3. Krüger, B.* , **Walberer, A.***, Debler J., Böger, C. A., Farkas, S., Reinhold, S., Obed, A., Schlitt, H. J., Fischereeder, M., Banas, B. und Krämer, B. K. Is inflammation prior to renal transplantation predictive for cardiovascular and renal outcomes? **Atherosclerosis** 2010, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.01.004. *both authors contributed equally.
4. Nguyen Quang, M., Krüger, B., Krüger, C. D., **Walberer, A.**, Schenck, B., Kisters, K., Wenning, M. und Krämer, B. K. [A 58-year-old hypertensive patient with primary hyperaldosteronism and renal artery stenosis] 58-jähriger Patient mit primärem Hyperaldosteronismus und Nierenarterienstenose bei arterieller Hypertonie. **Med Klin (Munich)** 2010;105(4):276-80.

Buchbeiträge

1. Krüger, B., **Walberer, A.** und Krämer B. K. Hypertension after Renal Transplantation. In International Transplantation Updates: Metabolic abnormalities in organ transplantation (2009).

Vorträge auf wissenschaftlichen Kongressen

1. Krüger B., **Walberer A.**, Debler J., Böger C. A., Farkas S., Schlitt H. J., Riegger G. A. J., Banas B., Krämer B. K. Is inflammation prior to renal transplantation predictive for cardiovascular and renal outcomes? *Kongress der Deutschen Transplantationsgesellschaft, 2008.*
2. **Walberer A.**, Krüger B., Fischereder M., Banas B., Krämer B. K. Screening for genetic variations in the key molecule of Toll like receptor signaling – implications for renal transplant outcomes. *Meeting of the European Society of Organ Transplantation, 2009.*
3. **Walberer A.**, Krüger B., Fischereder M., Banas B., Krämer B. K. Genetic variations in the Toll like receptor signaling molecule MAL – impact on the outcome of renal transplant recipients. *Kongress der Deutschen Transplantationsgesellschaft, 2009.*

Poster auf wissenschaftlichen Kongressen

1. Krüger B., **Walberer A.**, Farkas S., Obed A., Henning B., Schlitt H. J., Banas B., Krämer B. K. The impact of “high-producer” interleukin-6 haplotypes on cardiovascular morbidity and mortality in a kidney transplant population. *Kongress der Deutschen Transplantationsgesellschaft, 2008.*
2. Krüger B., **Walberer A.**, Debler J., Böger C. A., Farkas S., Obed A., Schlitt H. J., Banas B., Krämer B. K. Is inflammation prior to renal transplantation predictive for cardiovascular and renal outcomes? *Meeting of the American Society of Transplantation, 2009.*

3. Krüger B., **Walberer A.**, Debler J., Böger C. A., Farkas S., Obed A., Schlitt H. J., Fischereder M., Banas B., Krämer B. K. Prediction of cardiovascular and renal outcomes after kidney transplantation through inflammation markers prior to transplant. *Meeting of the European Society of Organ Transplantation, 2009.*
4. Krüger B., **Walberer A.**, Farkas S., Obed A., Schlitt H. J., Banas B., Krämer B. K. The role of Interleukin-6 haplotypes on cardiovascular outcome in a kidney transplant cohort. *Meeting of the European Society of Organ Transplantation, 2009.*
5. Krüger B., **Walberer A.**, Debler J., Böger C. A., Farkas S., Obed A., Schlitt H. J., Fischereder M., Banas B., Krämer B. K. Is inflammation prior to renal transplantation predictive for cardiovascular and renal outcomes? *Kongress der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, 2009.*
6. **Walberer A.**, Krüger B., Fischereder M., Banas B., Krämer B. K. Genetische Varianten in MAL - ein Schlüsselmolekül der TLR – Signalkaskade. *Kongress der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, 2009.*
7. **Walberer A.**, Krüger B., Debler J., Böger C. A., Farkas S., Obed A., Schlitt H. J., Fischereder M., Banas B., Krämer B. K. Stellen erhöhte Infektzeichen vor Transplantation einen Risikofaktor für kardiovaskuläre oder renale Ereignisse dar? *116. Kongress für Innere Medizin der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, 2010.*
8. **Walberer A.**, Krüger B., Fischereder M., Banas B., Krämer B. K. Genetic Variations in the MAL- and MyD88-Gene – Key molecules of the TLR – Signaltransduction. *Meeting of the American Society of Transplantation, 2010.*
9. **Walberer A.**, Krüger B., Fischereder M., Banas B., Krämer B. K. Genetic variations in the toll-like receptor signaling molecules MAL and MyD88 – impact on the outcome of renal transplant recipients. *XLVII ERA-EDTA Congress, 2010.*
10. **Walberer A.**, Krüger B., Fischereder M., Banas B., Krämer B. K. Genetic variations in the toll-like receptor signaling molecules MAL and MyD88 – impact on the

outcome of renal transplant recipients. *XXIII. International Congress of The Transplantation Society, 2010.*

Preise

Vortragspreis der Deutschen Transplantationsgesellschaft (DTG) anlässlich der Präsentation „Genetische Variationen des TLR-Signalmoleküls MAL – Einfluss auf das Überleben nach Nierentransplantation“ bei der Jahrestagung der DTG 2009 in Berlin.

Travel Grant der **Deutschen Transplantationsgesellschaft (DTG)** anlässlich der Jahrestagung 2009 in Berlin.