

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

II. Medizinische Klinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar  
Abteilung für Nephrologie

*Nachweis des extrazellulären Matrix Metalloproteinaseinducer  
EMMPRIN im Verlauf des chronischen Transplantatschadens der Niere*

Hans Christian Schulte

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen  
Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ-Prof. Dr. D. Neumeier  
Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. J. E. H. Lutz (schriftliche  
Beurteilung)  
1. Priv.-Doz. Dr. M. Baumann (mündliche  
Prüfung)  
2. Univ-Prof. Dr. Dr. h.c. U. Heemann.

Die Dissertation wurde am 09.02.2011 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 28.09.2011  
angenommen.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>5</b>
1.1	Chronischer Transplantatschaden .....	5
1.2	Interstitielle Fibrose und chronischer Transplantatschaden .....	9
1.3	Homöostase der extrazellulären Matrix und Fibrose .....	11
1.4	Der extrazelluläre Matrix Metalloproteinaseinducer EMMPRIN .....	13
1.5	Fragestellung .....	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
2.1	Patientenkollektiv .....	17
2.2	Histologische Einteilung des chronischen Transplantatschadens – Fibrose, Atrophie .....	19
2.3	Immunhistochemie .....	23
2.4	Statistische Auswertung .....	25
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>26</b>
3.1	EMMPRIIN Expression im Patientenkollektiv .....	26
3.2	EMMPRIIN Expression im Verlauf des chronischen Transplantatschadens .....	31
3.3	EMMPRIIN und klinische Parameter .....	35
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>38</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>48</b>

## Abkürzungen

Ak	Antikörper
APAAP	Alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase
CAD	Chronischer Transplantatschaden, chronic allograft dysfunction
CAN	Chronic allograft nephropathy
CD	Cluster of differentiation
CMV	Zytomegalievirus
dl	Deziliter
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
ECM	Extrazelluläre Matrix
EMMPRIN	Extrazellulärer Matrix Metalloproteinaseninducer
f	Weiblich
g	Gramm
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GN	Glomerulonephritis
h	Stunde
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HLA	Humanes Leukozytenantigen
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilo Dalton
l	liter
M	Molar
m	Männlich
MCT	Monocarboxylat-Transporter
min	Minute
mg	Milligramm
MMP	Matrix Metalloproteinase(n)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RF	Risikofaktor
$\Sigma$	Summe
s	siehe

SD	Standardabweichung
TBS	Tris-buffered saline
TEC	Tubuloepitheliale Zellen
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
TIMP	Tissue inhibitor(s) of MMP

# 1 Einleitung

## 1.1 Chronischer Transplantatschaden

Die Transplantation einer Niere ist nach wie vor die Methode der Wahl zur Behandlung einer terminalen Niereninsuffizienz. In den letzten 30 Jahren verbesserten sich die 1-Jahres-Überlebensraten der Organe sowohl bei Lebendnierenspenden als auch bei Kadaverspenden (95% vs. 50% bzw. 90% vs. 50%, (Cecka 2001)). Dies ist unter anderem auf den Einsatz neuer und potenterer Immunsuppressiva und damit einem verminderten Auftreten akuter Abstoßungsreaktionen zurückzuführen, außerdem ferner auf verbesserte Organkonservierung und verkürzte Ischämie/Reperfusionzeiten, sowie die Möglichkeiten der Gewebetypisierung und moderner standardisierter Operationsverfahren (Waller and Nicholson 2001). Obwohl der Schweregrad und die Häufigkeit akuter Abstoßungen reduziert werden konnten (Vincenti, Kirkman et al. 1998), verbesserte sich das Langzeitüberleben der Nierentransplantate kaum. Aktuelle Daten der Deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO) weisen eine 5-Jahres Funktionsrate bei Lebendspenden von ca. 84%, bei Kadaverspenden von ca. 70% auf (DSO).

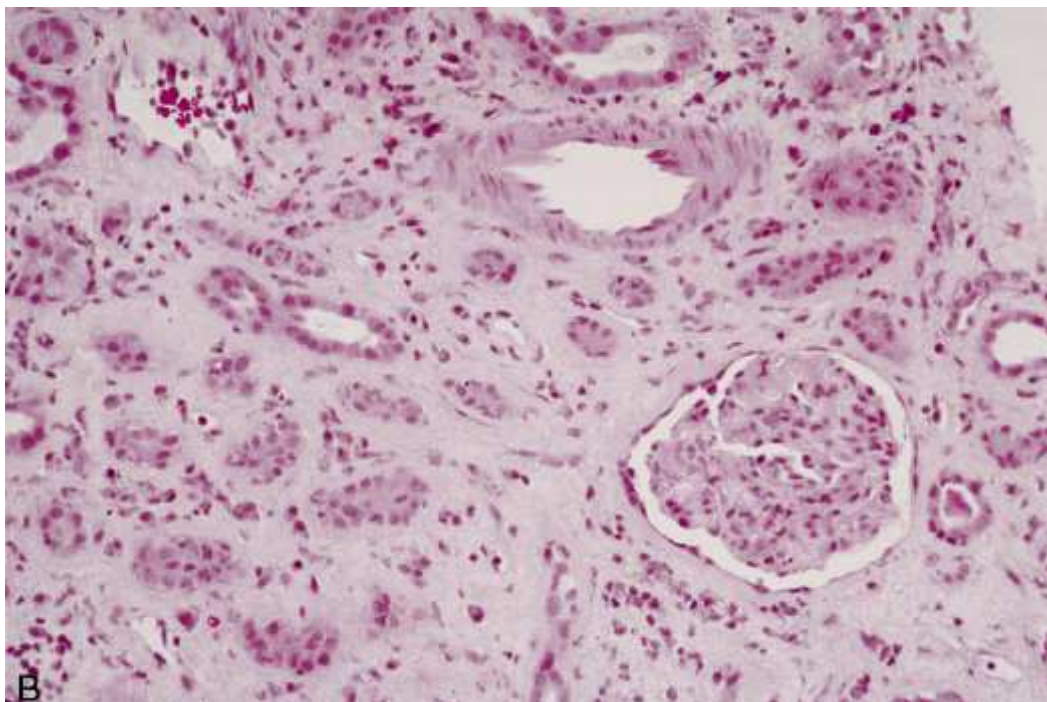
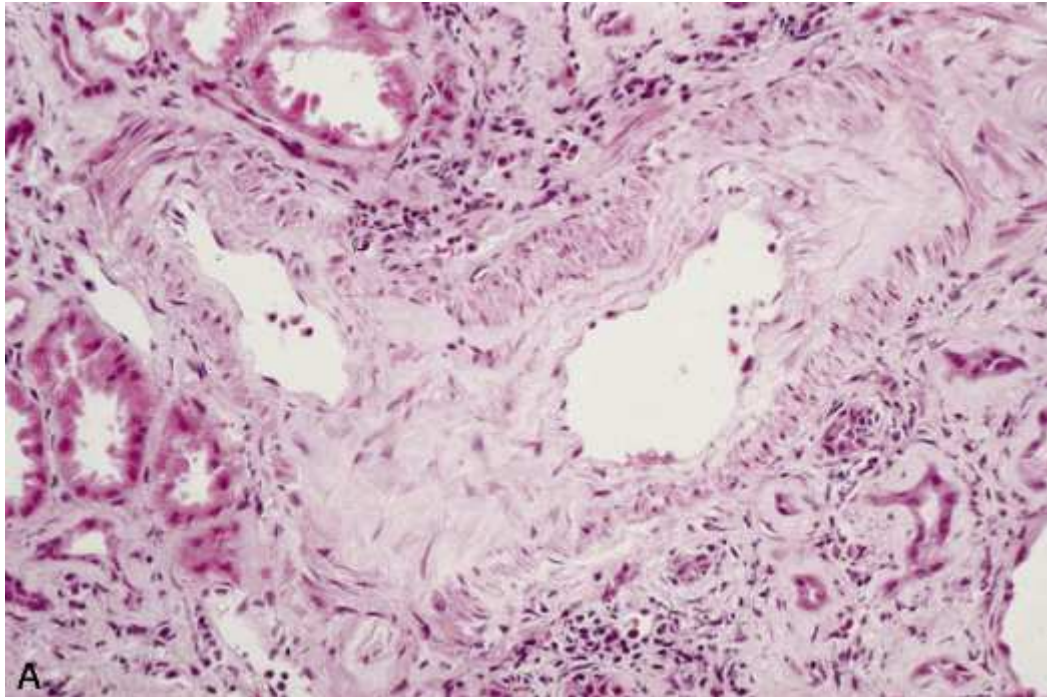
Der weitaus häufigste Grund für chronisches Transplantatversagen ist die sogenannte chronische Allograftnephropathie, kurz CAN (chronic allograft nephropathy). Diese ist histopathologisch gekennzeichnet durch interstitielle Fibrose, tubuläre Atrophie, Glomerulopathie und Vaskulopathie. Die Kriterien für die histologische Diagnose einer chronischen Allograftnephropathie sind in der Banff 97 Klassifikation international standardisiert und bereits mehrfach modifiziert worden, zuletzt 2007. (Racusen, Solez et al. 1999; Solez, Colvin et al. 2008). Da die histopathologischen Veränderungen jedoch nicht spezifisch für eine chronische Allograftnephropathie sind, verließ die Banff 2007 Klassifikation den Begriff CAN und ersetzte ihn durch den Terminus „tubuläre Atrophie und interstitielle Fibrose ohne Anhalt für spezifische Ätiologie“ (Li and Yang 2009). In dieser Arbeit wird der Begriff chronischer Transplantatschaden (CAD) verwendet.

Dieser Terminus beschreibt das klinische Bild einer fortschreitenden Niereninsuffizienz frühestens drei Monate nach Transplantation, die nicht zurückzuführen ist auf eine akute

Abstoßung, offensichtliche medikamentöse Nebenwirkungen oder neu aufgetretene bzw. rezidivierende spezifische Nierenerkrankungen (Baluja, Haragsim et al. 2006; Li and Yang 2009). Somit präsentiert sich ein chronischer Transplantatschaden als langsam fortschreitende Abnahme der glomerulären Filtrationsleistung, teilweise verbunden mit Proteinurie und arteriellem Hypertonus (Modena, Hostetter et al. 1991; Cosio, Pelletier et al. 1999). Klinische Zeichen sind nicht spezifisch, so dass andere Gründe für eine Funktionsbeeinträchtigung des Transplantats wie akute Abstoßungsepisoden, medikamentöse Toxizität, ein Rezidiv der Grunderkrankung oder postrenale Hindernisse ausgeschlossen werden müssen, bevor ein chronischer Transplantatschaden diagnostiziert werden kann (Paul 1999).

Eine Grundlage für die Diagnose des chronischen Transplantatschadens ist die Transplantatbiopsie. Die histopathologischen Charakteristika des chronischen Transplantatschadens umfassen interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie. Oft wird dies von vaskulären Schäden beziehungsweise einer Glomerulosklerose begleitet (Kasiske, Kalil et al. 1991). Die Vaskulopathie als chronisch T-Zell-vermittelte Abstoßung äußert sich als subintimale Anhäufung von Bindegewebe, was zu einer fibrösen Verbreiterung der Tunica intima und konsekutiven Verschmälerung des Lumens führt und Interlobulärarterien und -arteriolen betrifft (Baluja, Haragsim et al. 2006). Glomeruläre Veränderungen schließen verdickte Wände der glomerulären Kapillaren mit Verdopplung der Basalmembranen ein, außerdem stark vergrößerte Glomerula aufgrund überschießender mesangialer Matrixproduktion und zellulärer Proliferation. Dies führt letztendlich zur Glomerulosklerose. Interstitielle Fibrose umfasst in unterschiedlichem Maße das Interstitium mit oder ohne fokale Infiltration von Entzündungszellen (s. Abbildung 1.1) (Baluja, Haragsim et al. 2006).

Abbildung 1.1: Histopathologie der CAD: (A) Fibröse Verdickung der Tunica intima; (B) tubuläre Atrophie und interstitielle Fibrose (Racusen, Solez et al. 1999)



Faktoren, die zur Entwicklung und zum Fortschreiten des chronischen Transplantatschadens beitragen, können in alloantigenabhängige und alloantigenunabhängige unterteilt werden. Ein wichtiger alloantigenabhängiger

Risikofaktor sind abgelaufene akute Abstoßungsreaktionen. So ist die mittlere Überlebenszeit von Nieren von Patienten mit Episoden akuter Abstoßungen mit 6,6 Jahren wesentlich kürzer als bei den Patienten, die nie eine akute Abstoßung hatten (12,5 Jahre) (Lindholm, Ohlman et al. 1993). Langzeitstudien belegen ferner, dass bei Patienten, die nie eine akute Abstoßung erlitten, die Inzidenz für einen chronischen Transplantatschaden bei weniger als einem Prozent liegt. Weitere alloantigenabhängige Risikofaktoren sind bereits bestehende Sensibilisierungen mit humanem Leukozyten-Antigen (HL-Antigen) (Inkinen, Soots et al.) nach vorhergegangener Exposition, zum Beispiel nach Bluttransfusionen oder einem bereits erlittenen Transplantatverlust, sowie eine mangelhafte Übereinstimmung zwischen den HL-Antigenen des Spenders und des Empfängers (Takemoto, Terasaki et al. 2000; Meier-Kriesche, Ojo et al. 2001; Opelz 2001). Ferner spielt eine inadäquate Immunsuppression infolge zu geringer Dosierung, einer variablen oralen Bioverfügbarkeit, sowie infolge mangelnder Compliance des Patienten bei der Medikamenteneinnahme eine Rolle (Joosten, Sijpkens et al. 2005; Baluja, Haragsim et al. 2006). Darüber hinaus tragen alloantigenunabhängige Faktoren zum Fortschritt der Krankheit bei. Hierzu gehören die Ischämie-/Reperusionszeit bei der Transplantation, der arterielle Hypertonus, eine Hyperfiltration der Transplantatniere, Proteinurie, Hyperlipidämie, Medikamententoxizität und Infektionen, sowie Alter, Geschlecht und ethnische Herkunft des Spenders bzw. des Empfängers (s. Tabelle 1.1) (Joosten, Sijpkens et al. 2005).

*Tabelle 1.1: Zusammenfassung der Risikofaktoren für chronischen Transplantatschaden*

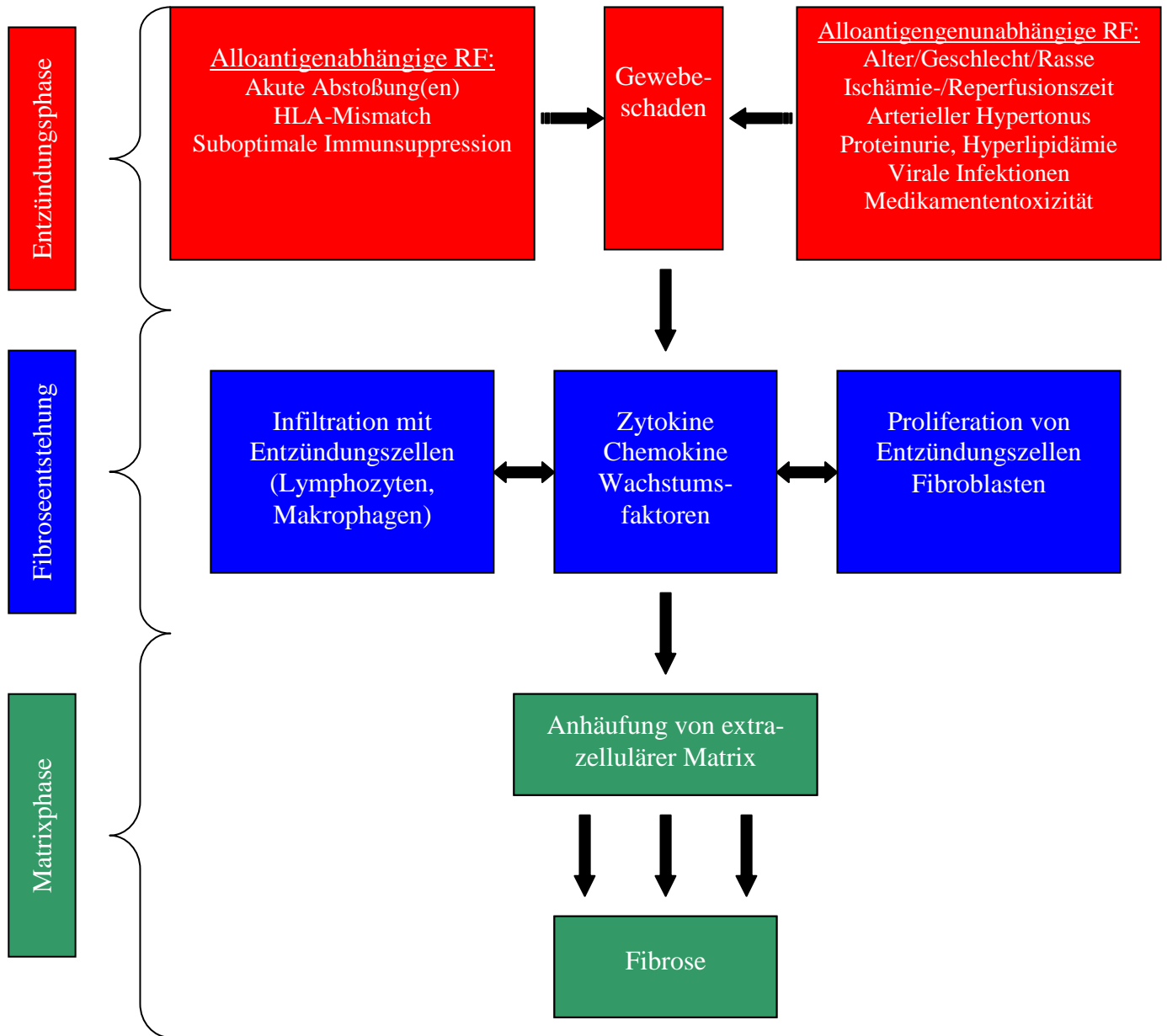
<b>alloantigenabhängige Risikofaktoren</b>	<b>alloantigenunabhängige Risikofaktoren</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Akute Abstoßung(en)</li> <li>• HLA-Mismatch</li> <li>• Suboptimale Immunsuppression</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alter, Geschlecht und Rasse des Spenders/Empfängers</li> <li>• Ischämie-/Reperfusionsschaden</li> <li>• Arterieller Hypertonus</li> <li>• Proteinurie, Hyperlipidämie</li> <li>• CMV - und andere Infektionen</li> <li>• Medikamententoxizität</li> </ul>



## 1.2 Interstitielle Fibrose und chronischer Transplantatschaden

Die interstitielle Fibrose ist in Transplantaten auf überschießende Anhäufung von extrazellulärer Matrix zurückzuführen, welche schließlich zum Funktionsverlust der Niere beiträgt. Der Großteil der Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) besteht aus Kollagenen. Die wichtigsten Kollagene in der Niere sind die fibrillären Proteine Kollagen I und Kollagen III, sowie das nicht fibrilläre Kollagen IV, das hauptsächlich Bestandteil der Basalmembran ist. Das Tubulointerstitium enthält alle drei Kollagene, die Glomeruli hingegen nur Kollagen III und IV. Daneben kommen weitere, nicht-kollagenöse Matrix-Proteine vor wie die Glykoproteine Laminin, Fibronectin und Tenascin oder die Proteoglykane Decorin und Biglycan (Racusen, Solez et al. 1999). Die extrazelluläre Matrix ist dabei einem ständigen dynamischen Umbauprozess unterworfen. Unter physiologischen Bedingungen besteht eine Balance zwischen Matrixsynthese und Matrixabbau. In pathologischen Situationen führt vermehrte Synthese oder verminderter Abbau bzw. eine Kombination aus beiden zur Anhäufung von Matrix und schließlich zu einer Organfibrose (Waller and Nicholson 2001). Der zeitliche Verlauf der Ereignisse, die bei einem chronischen Transplantatschaden zur Fibrose führen, kann in unterschiedliche Phasen unterteilt werden (s. Abbildung 1.2). In der Initial- oder Entzündungsphase führen die oben bereits aufgeführten alloantigenabhängigen und –unabhängigen Faktoren zu Gewebeschäden in der Niere. Im weiteren Verlauf kommt es zur Einwanderung und Proliferation von Makrophagen und Lymphozyten, sowie zur Proliferation von Fibroblasten und tubuloepithelialen Zellen (TEC). Eine Vielzahl von Mediatoren spielt dabei eine wichtige Rolle, indem sie die Entzündungsantwort des Organismus vermitteln. Synthetisiert und sezerniert werden diese Mediatoren sowohl von den einwandernden Entzündungszellen als auch von den Parenchymzellen der Spenderniere. Schließlich mündet dieser Prozess in einer Akkumulation von extrazellulärer Matrix und der Entwicklung einer Fibrose (Paul 1999; Solez, Colvin et al. 2008). Für die Akkumulation von Matrix spielt ein Überwiegen von Hemmern des Matrixabbaus bzw. eine verminderte Expression von Matrix abbauenden Enzymen eine wesentliche Rolle. Wesentliche Matrix abbauende Enzyme sind die Matrix Metalloproteinasen (MMP). Diese werden durch entsprechende Hemmer blockiert. Das Protein EMMPRIN spielt dabei eine wichtige Rolle, da es sowohl die Aktivität als auch die Expression von MMP steigern kann.

Abbildung 1.2: Zusammenfassung: Schematische Darstellung der Entwicklung des chronischen Transplantatschadens (nach Solez, Colvin et al. 2008)



### 1.3 Homöostase der extrazellulären Matrix und Fibrose

Matrix Metalloproteinasen (MMP) sind eine große Gruppe von Enzymen, die in der Lage sind, verschiedenste extrazelluläre Matrixproteine abzubauen. Inzwischen sind über 15 verschiedene MMP identifiziert, die in verschiedene Gruppen unterteilt werden können: in die Gruppe der interstitiellen Kollagenasen, der Gelatinasen, der Stromelysine, der Elastinasen, sowie der membranständigen MMP. Jede MMP kann einer dieser Gruppen zugeordnet werden und ist spezifisch für eines oder mehrere Substrate. Mit Ausnahme der membranständigen MMP werden MMP als inaktive Vorstufen sezerniert (Zymogene). Sie müssen somit erst von anderen extrazellulären Peptidasen proteolytisch aktiviert werden. Mit Ausnahme von MMP-9 werden MMP konstitutiv in einer gesunden Niere produziert, sie können aber auch von profibrotischen Zytokinen wie Interleukin 1 oder Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$  induziert werden. (Carmeliet, Moons et al. 1997; Waller and Nicholson 2001). Im Sinne einer physiologischen Balance zwischen ECM-Synthese und -Abbau in einer gesunden Niere wird den MMP die tragende Rolle beim Abbau der Extrazellulärmatrix zugeschrieben. (Southgate, Davies et al. 1992; Eddy 2000).

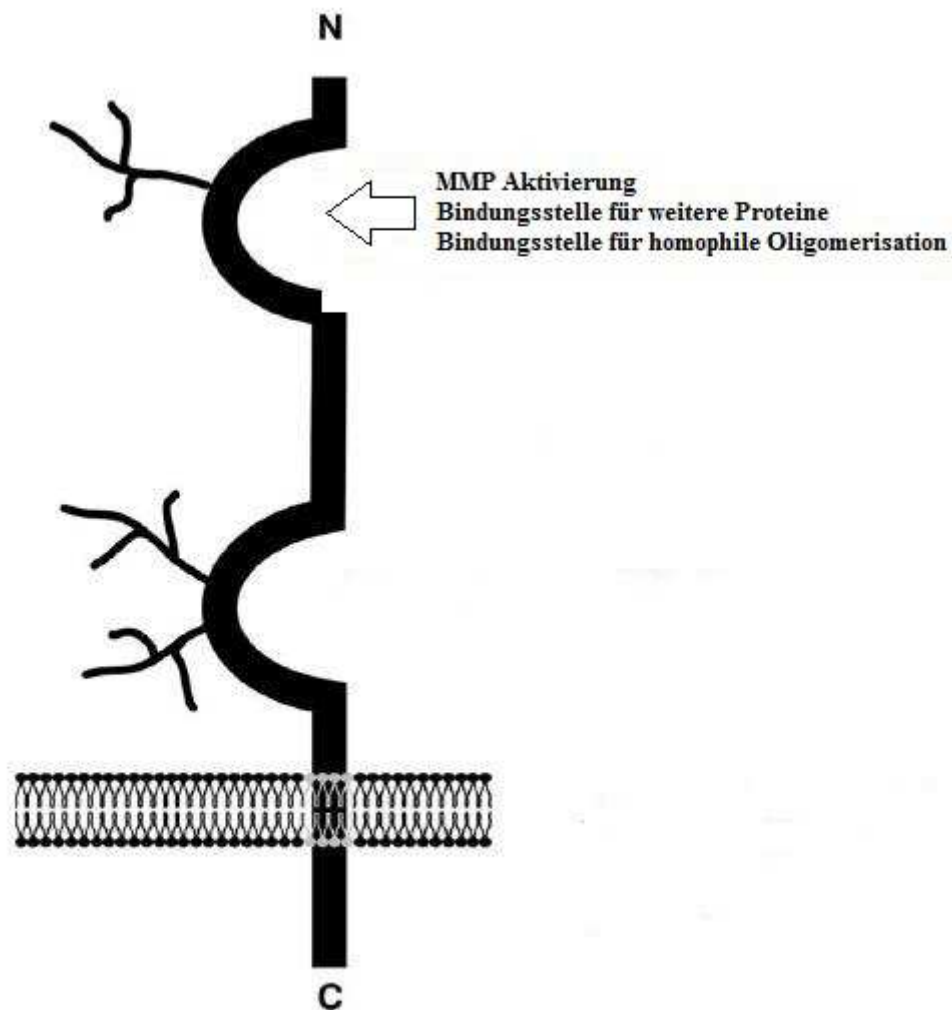
Es wurden bereits einige Studien durchgeführt, die den Zusammenhang zwischen MMP und chronischem Transplantatschaden untersuchten: Palomar et al. zeigten, dass Biopsien aus einer Gruppe von Patienten, die ihr Organ aufgrund eines chronischen Transplantatschadens verloren hatten, im Vergleich zu solchen aus einer Gruppe mit noch funktionierender Transplantatfunktion eine erniedrigte Expression von MMP aufwiesen. (Palomar, Mayorga et al. 2005). Im Tiermodell führte eine Hemmung von MMP in den ersten zehn Tagen nach Transplantation zu einer Reduzierung der Entwicklung eines chronischen Transplantatschadens im Vergleich zur Kontrollgruppe; eine Hemmung der MMP in den Wochen zwölf bis 20 jedoch führte zu signifikant höherer Proteinurie und einer größeren Ausprägung des Transplantatschadens (Lutz, Yao et al. 2005). MMP könnten somit in der Frühphase nach Transplantation als Promotoren einer fortschreitenden Transplantatdysfunktion fungieren. Erklärt wird das durch die Effekte der MMP an der tubulointerstitiellen Matrix und der Basalmembran der tubuloepithelialen Zellen: deren Fragmentierung und Abbau könnte Entzündungszellen anlocken und den Fortschritt der Fibrose somit fördern. Spätere Hemmung der MMP hingegen wirkte fibrosefördernd, da der protektive Abbau der extrazellulären Matrix

durch MMP in diesem fortgeschrittenen Stadium verhindert wird. In einem Mausmodell, bei dem in den proximalen Tubuluszellen MMP überexprimiert wird, entwickelt sich das ganze Spektrum eines chronischen Transplantatschadens mit tubulärer Atrophie, Glomerulosklerose und tubulointerstitieller Fibrose, was ebenfalls die wichtige Rolle von MMP für die Entstehung eines chronischen Transplantatschadens belegt (Cheng, Pollock et al. 2006). Es existieren ferner physiologische Inhibitoren der MMP, die sogenannten TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases). Die TIMP bilden mit den MMP 1:1-Komplexe und inhibieren sowohl die aktiven als auch die inaktiven Vorstufen (Gomez, Alonso et al. 1997).

## 1.4 Der extrazelluläre Matrix Metalloproteinaseninducer EMMPRIN

In der Tumorbiologie beobachtete man schon lange sehr hohe Aktivitäten von Matrix Metalloproteinasen an der Grenzfläche von Tumorgewebe zu gesundem Bindegewebe. Auf der Suche nach einem übergeordneten Regulationsmechanismus für diese ausgeprägte MMP Aktivität und Expression stieß man auf ein hochgradig glykosyliertes transmembranöses Oberflächenprotein auf Tumorzellen, das EMMPRIN, auch unter den Bezeichnungen CD 147, Neurothelin oder Basigin bekannt (Gabison, Hoang-Xuan et al. 2005).

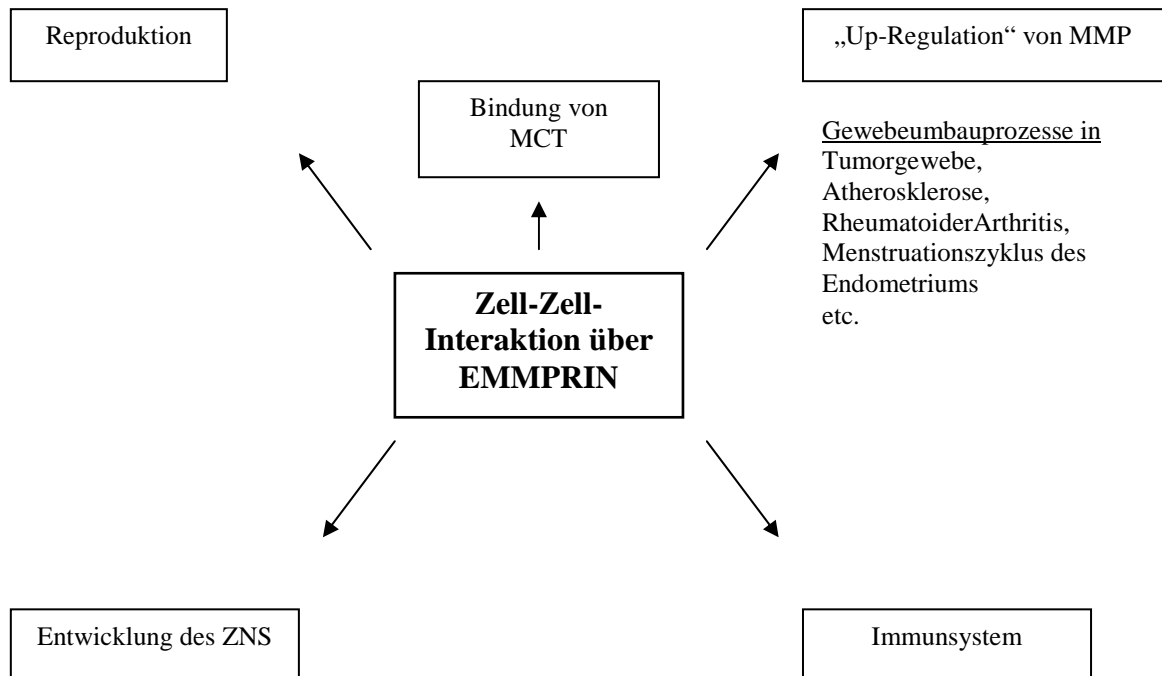
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des EMMPRIN Moleküls (Gabison, Hoang-Xuan et al. 2005)



EMMPRIN gehört zur Immunglobulin Superfamilie und besteht aus zwei Immunglobulin-Domänen (Ig loops) im Extrazellulärraum, einer einfachen transmembranösen Domäne und einem kurzen zytoplasmatischen Abschnitt (s. Abbildung 1.3). EMMPRIN ist extrazellulär in unterschiedlichem Maße an drei verschiedenen Aminosäureresten glykosyliert, was ungefähr die Hälfte des Molekulargewichts des 44-66 kDa schweren Glykoproteins ausmacht. Diese Glykosylierung ist essentiell, um die MMP zu aktivieren (Gabison, Hoang-Xuan et al. 2005; Nabeshima, Iwasaki et al. 2006). EMMPRIN kann die Synthese vieler verschiedener MMP induzieren. (Li and Yang 2009). Es hat allerdings keinen Effekt auf ihre physiologischen Inhibitoren, verschiebt also das Gleichgewicht in Richtung MMP Produktion und Aktivierung (Gabison, Hoang-Xuan et al. 2005). In menschlichen Tumoren produzieren Fibroblasten den Großteil der MMP, viel mehr als die Tumorzellen selbst (Basset, Bellocq et al. 1990; MacDougall and Matrisian 1995; Hewitt and Dano 1996). EMMPRIN hingegen wird auf der Oberfläche von Tumorzellen exprimiert und stimuliert benachbarte Fibroblasten und Endothelzellen zur Produktion dieser MMP und ermöglicht so die Invasion der Tumorzellen in die umliegenden Gewebe (Biswas, Zhang et al. 1995; Caudroy, Polette et al. 2002). Wenngleich EMMPRIN in der Tumorforschung entdeckt und dort bisher am besten untersucht wurde, spielt es auch eine wichtige Rolle in anderen pathologischen Prozessen (s. Abbildung 1.4). Nachdem bereits bekannt war, dass in koronaren atherosklerotischen Plaques die MMP Expression signifikant erhöht ist, konnte in solchen Plaques EMMPRIN auf Makrophagen nachgewiesen werden und dieses spielt dort möglicherweise eine Rolle beim Fortschreiten der atherosklerotischen Läsion und mag für die Instabilität von Plaques verantwortlich sein (Major, Liang et al. 2002; Haug, Lenz et al. 2004; Schmidt, Bultmann et al. 2006). Bei Patienten mit akuten Abstoßungen nach Herztransplantation konnten ebenfalls erhöhte Aktivitäten von MMP und EMMPRIN nachgewiesen werden (Yamani, Starling et al. 2002). Auch in Studien zu rheumatoider Arthritis konnte in der Synovia erhöhte MMP und EMMPRIN Aktivitäten nachgewiesen werden, was als wichtiger Faktor für das Fortschreiten der Entzündung diskutiert wird (Konttinen, Li et al. 2000; Tomita, Nakase et al. 2002). Ferner spielt EMMPRIN auch in physiologischen Situationen eine wichtige Rolle: im Menstruationszyklus konnten je nach Phase verschiedene Expressionsmuster von EMMPRIN und MMP, sowie deren Regulation durch Progesteron und den Glykosylierungsgrad von EMMPRIN nachgewiesen werden (Noguchi, Sato et al. 2003). Vielfältige weitere physiologische Aufgaben für EMMPRIN wurden bereits beschrieben.

Embryos von Knockout-Mäusen für EMMPRIN konnten sich zumeist nicht im Uterus implantieren, diejenigen Tiere, die überlebten, waren steril, zeigten Defizite in ihrer Spermio-genese, Fertilisation, sowie Funktionen der Sensorik und des Gedächtnis (Igakura, Kadomatsu et al. 1996; Igakura, Kadomatsu et al. 1998). EMMPRIN soll an der Interaktion und Aktivierung von Immunzellen, am Eindringen von Viren in ihre Wirtszellen, Zell-Zell Interaktionen bei der Entwicklung des Zentralnervensystems oder der Entwicklung und Erhaltung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sein. Als Chaperone Molekül für Monocarboxylat-Transporter (MCT) der Zellmembran spielt es zum Beispiel in der Retina eine wichtige Rolle. Ein einheitlicher Mechanismus für all diese Funktionen bleibt noch aufzuklären, ob und inwieweit sie mit MMP in Zusammenhang stehen, ist ebenfalls zu zeigen (Nabeshima, Iwasaki et al. 2006; Li and Yang 2009). Insgesamt könnte EMMPRIN ein übergeordneter Regulator bzw. Aktivator von MMP sein. Daher könnte die Expression von EMMPRIN im Verlauf der Entwicklung des chronischen Transplantatschadens bei zunehmender interstitieller Fibrose abnehmen.

Abbildung 1.4: Übersicht über die vielfältigen Funktionen von EMMPRIN



## 1.5 Fragestellung

1. Kann EMMPRIN in Nieren mit chronischem Transplantatschaden nachgewiesen werden?
2. Nimmt das Ausmaß der EMMPRIN Expression mit zunehmendem Transplantatschaden der Nieren ab?
3. Existieren Korrelationen zwischen der Expression von EMMPRIN und laborchemischen Markern der Transplantatfunktion wie der Kreatininserumkonzentration oder der glomerulären Filtrationsrate?



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patientenkollektiv

In die Studie wurden 50 Patienten (Alter 49,00 Jahre; SD  $\pm$  13,30, davon weiblich n = 16 Alter 43,13 Jahre, SD  $\pm$  14,71; männlich n = 34 Alter 51,65; SD  $\pm$  11,62) eingeschlossen, denen zwischen 1986 und 2002 am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München eine Niere transplantiert wurde. Von 38 dieser Patienten wurde jeweils eine bioptische Probe untersucht, bei zwölf Patienten lag ein Nephrektomiepräparat vor. Patienten wurden in die Studie eingeschlossen, wenn ihre Biopsien frühestens zwölf Monate nach Transplantation gewonnen wurden, um chronische Veränderungen im Sinne eines chronischen Transplantatschadens zu untersuchen. Die Proben stammen aus dem Pathologischen Institut des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München.

Bei 42 der untersuchten Transplantatnieren handelte es sich um Kadaverspenden (kalte Ischämiezeit: 23,4 h, SD  $\pm$  7,5 h; warme Ischämiezeit: 35,8 min, SD  $\pm$  6,8 min), acht Transplantate waren im Rahmen einer Lebendspende transplantiert (kalte Ischämiezeit: 2,6 h, SD  $\pm$  0,9 h; warme Ischämiezeit: 28,6 min, SD  $\pm$  9,7 min).

Ferner wurden aus den Patientenakten klinische Daten zu jedem Patienten erhoben. Dazu gehörten Alter und Geschlecht des Patienten, Zeitpunkt der Nierentransplantation, Zeitpunkt der Biopsieentnahme beziehungsweise Zeitpunkt der Nephrektomie, sowie die Grunderkrankung, die zur terminalen Niereninsuffizienz geführt hatte. Ferner wurden laborchemische Daten erhoben: Kreatininserumkonzentration und Harnstoffserumkonzentration zum Zeitpunkt der Biopsie beziehungsweise letzter Kreatininserumkonzentration vor erneuter Dialysepflicht bei den nephrektomierten Patienten. Außerdem wurde eine Basiskreatininkonzentration erfasst, die als beste stabile Kreatininkonzentration des Patienten nach Transplantation definiert wurde. Aus Kreatinin- und Basiskreatininserumkonzentration wurde die Differenz als Parameter über das im Verlauf ansteigende Kreatinin gebildet, dieser wird im Folgenden als  $\Delta$ -Krea bezeichnet.

Zusätzlich wurden die glomerulären Filtrationsraten nach der Cockcroft-Gault-Formel aus Kreatininkonzentration, Gewicht und Geschlecht der Patienten errechnet:

$$GFR = \frac{(140 - \text{Alter}) \times \text{Gewicht}}{72 \times \text{Krea}} \quad (\times 0,85, \text{ falls weiblich}) \quad (\text{Formel 2.1})$$

Alter: Alter in Jahren

Krea: Serumkreatinin in mg/dl

Gewicht: Gewicht in kg

Aus dem Patientenkollektiv der 50 Patienten wurden fünf Patienten ausgewählt, von denen neben der untersuchten Biopsie noch mindestens vier weitere Biopsien zu unterschiedlichen Zeitpunkten vorhanden waren, um den Verlauf der Expression von EMMPRIN zu untersuchen. Zu allen Biopsien des jeweiligen Patienten wurden ebenfalls die oben aufgeführten klinischen und laborchemischen Daten erfasst (s. Tabellen 2.1- 2.5, Anhang).

## 2.2 Histologische Einteilung des chronischen Transplantatschadens – Fibrose, Atrophie

Zur Feststellung des Ausmaßes des chronischen Transplantatschadens wurden histologische Schnitte der Biopsien bzw. Nephrektomien aller Patienten untersucht. Dazu wurden die mit Hämatoxylin-Eosin (H.E.) gefärbten Schnitte nach den Kriterien der Banff 97 Klassifikation in drei Gruppen eingestuft (Racusen, Solez et al. 1999): Grad 1: milde interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie ( $\leq 25\%$ ), Grad 2: mäßige interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie (26-50%), Grad 3: schwere interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie mit Verlust von Tubuli ( $> 50\%$ ). Grad 0 wurde hier als fehlende interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie definiert. Grad 0 hatten acht, Grad 1 elf, Grad 2 14 und Grad 3 17 Präparate (s. Tabelle 2.1).

Die Einteilung in die Gruppen erfolgte durch einen Pathologen aus dem Pathologischen Institut der Technischen Universität München. Die H.E. gefärbten Schnitte stammen ebenfalls aus dem Archiv des Pathologischen Instituts der Technischen Universität München.

Tabelle 2.1: Zusammenfassung der laborchemischen Daten der Patienten geordnet nach Grad des chronischen Transplantatschadens: Laborparameter in Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung

CAD Grad	Anzahl Patienten	Krea (mg/dl): Mittelwert, SD	Glomeruläre Filtrationsrate (ml/min): Mittelwert, SD	$\Delta$ -Krea (mg/dl): Mittelwert, SD	Harnstoff (mg/dl): Mittelwert, SD
0	8	3,5; $\pm$ 1,7	30,3; $\pm$ 19,4	1,85; $\pm$ 1,32	50,0; $\pm$ 22,8
1	11	2,6; $\pm$ 0,8	34,0; $\pm$ 11,2	1,32; $\pm$ 0,81	38,4; $\pm$ 12,9
2	14	3,6; $\pm$ 1,8	29,7; $\pm$ 15,9	1,92; $\pm$ 1,25	59,7; $\pm$ 45,1
3	17	5,8; $\pm$ 1,9	19,8; $\pm$ 13,8	4,54; $\pm$ 3,07	79,9; $\pm$ 39,8
$\Sigma$	50	4,1; $\pm$ 2,3	27,7; $\pm$ 16,0	2,55; $\pm$ 2,34	60,0; $\pm$ 38,5

Tabelle 2.2: Zusammenfassung klinischer Daten der Patienten. Alle Angaben in Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung

CAD Grad	Alter der Patienten: Mittelwert, SD	Gewicht der Patienten (kg): Mittelwert, SD	Monate seit Transplantation: Mittelwert, SD
0	46,38; $\pm$ 18,19	66,20; $\pm$ 14,98	42,6; $\pm$ 21,6
1	56,27; $\pm$ 5,31	72,05; $\pm$ 10,48	42,6; $\pm$ 19,9
2	45,71; $\pm$ 12,71	72,86; $\pm$ 19,84	44,4; $\pm$ 27,7
3	48,00; $\pm$ 12,87	66,87; $\pm$ 12,03	64,5; $\pm$ 35,5
$\Sigma$	48,92; $\pm$ 13,30	69,69; $\pm$ 15,21	50,6; $\pm$ 30,1

Tabelle 2.3: Übersicht über die nephrologischen Grunderkrankungen der Patienten

<b>Grunderkrankung, die zur Transplantationsbedürftigkeit geführt hat</b>	<b>Anzahl der betroffenen Patienten</b>
<b>Schrumpfnieren unbekannter Genese / chronische Glomerulonephritis ohne histologische Sicherung</b>	<b>18</b>
<b>Diabetische Nephropathie</b>	<b>6</b>
<b>Polyzystische Nierenerkrankung</b>	<b>6</b>
<b>IgA-Nephritis</b>	<b>4</b>
<b>Mesangioproliferative Glomerulonephritis</b>	<b>4</b>
<b>Chronische Pyelonephritis</b>	<b>3</b>
<b>Vesiko-uretrale Refluxkrankheit</b>	<b>2</b>
<b>Fokal sklerosierende Glomerulonephritis</b>	<b>2</b>
<b>Oxalose</b>	<b>1</b>
<b>Interstitielle Nephritis</b>	<b>1</b>
<b>Radiogene Nephritis</b>	<b>1</b>
<b>Analgetika Nephropathie</b>	<b>1</b>
<b>Hämolytisch-urämisches Syndrom</b>	<b>1</b>
<b>Σ</b>	<b>50</b>

Tabelle 2.4: Allgemeine Daten zu den fünf Verlaufspatienten :

<b>Patienten Nr.</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Anzahl der Biopsien</b>	<b>Alter des Patienten bei der ersten Biopsie</b>	<b>Zeitspanne zwischen erster und letzter Biopsie (Jahre)</b>	<b>Grunderkrankung</b>
<b>1</b>	<b>m</b>	<b>5</b>	<b>53</b>	<b>2,8</b>	<b>diabetische Nephropathie</b>
<b>2</b>	<b>f</b>	<b>5</b>	<b>30</b>	<b>3,3</b>	<b>Chronische GN</b>
<b>3</b>	<b>f</b>	<b>6</b>	<b>55</b>	<b>3,4</b>	<b>Chronische GN</b>
<b>4</b>	<b>m</b>	<b>5</b>	<b>57</b>	<b>6,9</b>	<b>Chronische GN</b>
<b>5</b>	<b>f</b>	<b>5</b>	<b>50</b>	<b>2,0</b>	<b>Chronische GN</b>

Chronische GN: chronische Glomerulonephritis unklarer Ätiologie

Tabelle 2.5: Allgemeine Daten zu den fünf Verlaufspatienten:

<b>Patienten Nr.</b>	<b>Spendertyp</b>	<b>Ischämiezeit kalt (Stunden)</b>	<b>Ischämiezeit warm (Minuten)</b>	<b>Anzahl der Nierentransplantationen</b>
<b>1</b>	<b>Kadaver</b>	<b>19</b>	<b>30</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Kadaver</b>	<b>27</b>	<b>30</b>	<b>1</b>
<b>3</b>	<b>Kadaver</b>	<b>26</b>	<b>50</b>	<b>1</b>
<b>4</b>	<b>Kadaver</b>	<b>18</b>	<b>45</b>	<b>1</b>
<b>5</b>	<b>Kadaver</b>	<b>27,5</b>	<b>30</b>	<b>2</b>

## 2.3 Immunhistochemie

Das Prinzip der Immunhistochemie besteht darin, ein Antigen durch spezifische Antikörper zu markieren und für den Untersucher unter dem Mikroskop sichtbar zu machen. Hierzu stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung, im Folgenden wird kurz die so genannte APAAP- Methode (Alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase) skizziert, die in der vorliegenden Studie angewandt wurde.

Bei der APAAP-Methode werden drei Reagenzien benötigt: Primärantikörper, Sekundärantikörper und der APAAP-Komplex, bestehend aus dem Enzym alkalische Phosphatase und einem Antikörper gegen alkalische Phosphatase. Der Primärantikörper ist spezifisch gegen das zu untersuchende Antigen gerichtet, hier EMMPRIN. Der Sekundär- oder Brückenantikörper kann sowohl den Primärantikörper als auch den APAAP-Komplex binden, da beide in derselben Tierspezies hergestellt wurden. Dieser wird im Überschuss zugefügt, so dass jeweils nur ein Arm seines Fab-Fragments an den Primärantikörper bindet und der andere für die Bindung des APAAP-Komplexes frei bleibt. Das Enzym alkalische Phosphatase wird durch eine Substrat-Chromogenreaktion sichtbar gemacht (s. Abbildung 2.1).

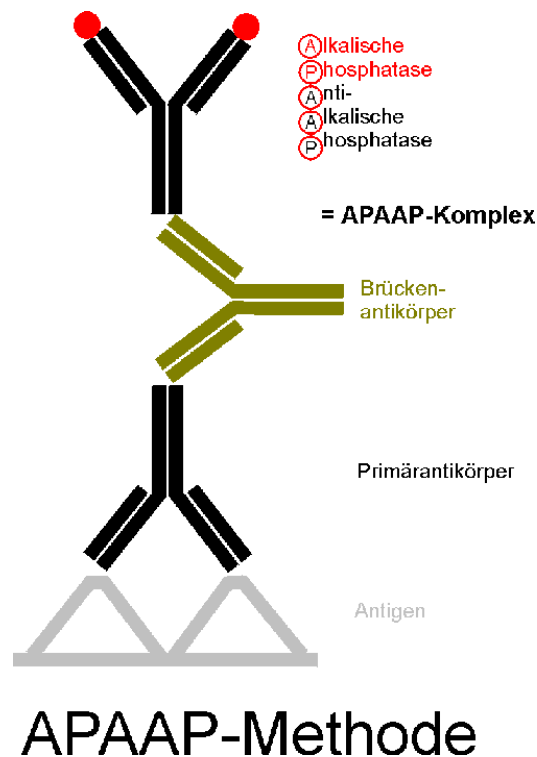


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der APAAP-Methode

In der vorliegenden Arbeit wurde die EMMPRIN Expression an 3µm dünnen Schnitten untersucht. Diese wurden aus den in Paraffin eingebetteten Gewebeblöcken gewonnen.

Nach Deparaffinierung und Hydrierung der Proben wurden diese in einem Bad mit Zitratpuffer Lösung (21,01g Zitronensäure 0,1M, 29,41g Natriumzitat 0,1M, verdünnt auf 1l mit aqua destillata) für zweimal zehn Minuten in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend 30-minütiges Abkühlen und dreimal fünf Minuten Waschen in Pufferlösung (TBS, pH 7,6); danach wurden die Proben für zehn Minuten in 6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (verdünnt in Methanol) eingetaucht, gefolgt von weiteren dreimal fünf Minuten Waschen in Pufferlösung. Nach Inkubation mit dem Primärantikörper (CD147, clone HIM6, BD Pharmingen™) (Verdünnung 1:50) über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer wurden die Schnitte nach Waschen in Pufferlösung für 30 Minuten mit dem Brückenantikörper inkubiert (Rabbit-anti-mouse Ak, DAKO®, Verdünnung 1:100). Es folgte erneutes Waschen in Pufferlösung, sowie 30 minütiges Inkubieren mit dem PAP-Komplex (DAKO®, Verdünnung 1:200). Das Antigen wurde durch 15-minütige Behandlung mit dem Chromogen (DAKO® Fast Red Substrate System) angefärbt, und anschließend wurden die Proben mit Mayer's Hämalaun (Merck, Darmstadt, Deutschland) gegengefärbt. Alle Präparate inklusive Negativkontrollen wurden im gleichen Arbeitsablauf angefertigt, bei den Negativkontrollen wurde statt des Primärantikörpers mit Pufferlösung inkubiert.



## 2.4 Statistische Auswertung

Alle Biopsien und Nephrektomien wurden sowohl unter qualitativen als auch quantitativen Gesichtspunkten ausgewertet. Bei der qualitativen Analyse wurde berücksichtigt, welche Strukturen positive Anfärbung zeigten, und der Färbeintensität jedes Schnittes wurde ein Wert zwischen null (= keine Anfärbung) und drei (= starke Anfärbung) zugeordnet. Zur quantitativen Analyse wurden die im Präparat positiv gefärbten Tubuli erfasst und durch die im gesamten Präparat vorhandenen Tubuli geteilt, woraus sich jeweils ein Wert zwischen null und eins ergab. Dieser Wert wurde als EMMPRIN-Score bezeichnet. Außerdem wurde jeder Probe ein weiterer Parameter für die EMMPRIN Färbung zugeordnet, der sich aus dem Produkt von EMMPRIN-Score und Färbeintensität zusammensetzt. In diesem Score wurden somit sowohl die qualitativen als auch quantitativen Färbereigenschaften der Biopsien/Nephrektomien berücksichtigt. Dieser Score wird im Folgenden als EMMPRIN-Score x Färbeintensität bezeichnet.

Zur Testung von Korrelationen zwischen stetigen Daten wurde der Spearman-rho-Korrelationskoeffizient berechnet. Analysen über den Zusammenhang von stetigen und ordinal verteilten Merkmalen wurden mit dem ANOVA-Test (Varianzanalyse) für parametrische Daten beziehungsweise für nicht-parametrische Daten mit dem Mann-Whitney-Test für  $k=2$  Einflussgrößen oder dem Kruskal-Wallis-Test für  $k>2$  Einflussgrößen durchgeführt. Zusammenhänge zwischen qualitativen Daten, sei es zwischen ordinal skalierten oder nominal skalierten, wurden mit dem  $\chi^2$  - Test geprüft. Ein p-Wert von  $\leq 0,05$  wurde als signifikant angenommen gemäß einem  $\alpha$ -Fehler von 5 %.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 EMMPRIN Expression im Patientenkollektiv

Von den 38 Biopsien zeigten 24 (63,16%) eine immunhistochemische Anfärbung von EMMPRIN, die restlichen 14 zeigten keine spezifische Anfärbung. Die zwölf Nephrektomiepräparate zeigten allesamt keine spezifische Färbung. Insgesamt färbten sich somit 48 % der untersuchten Proben spezifisch an. Bei den 24 positiven Proben fand sich siebenmal Färbegrad drei, achtmal Grad zwei und neunmal Grad eins. Der Anteil der gefärbten Tubuli lag zwischen 0,00 und 0,50 (Mittelwert: 0,1; SD:  $\pm 0,14$ ). Betrachtet man den Parameter EMMPRIN-Score x Färbeintensität, bewegte sich dieser zwischen den Werten 0,00 und 1,50 (Mittelwert: 0,21; SD:  $\pm 0,35$ ) (s. Tabelle 3.1).

*Tabelle 3.1: Übersicht über die Eigenschaften der Biopsien, die zwölf Nephrektomiepräparate wurden hier nicht berücksichtigt. Alle Angaben in Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung*

CAD	Anzahl der Glomeruli	Anzahl der Tubuli	Anzahl der angefärbten Tubuli	EMMPRIN-Score	EMMPRIN-Score x Färbeintensität
0	6,6; $\pm 6,1$	387,5; $\pm 257,1$	100,1; $\pm 123,6$	0,21; $\pm 0,13$	0,41; $\pm 0,32$
1	4,8; $\pm 3,1$	457,3; $\pm 306,0$	61,8; $\pm 71,2$	0,17; $\pm 0,16$	0,43; $\pm 0,54$
2	4,1; $\pm 3,4$	311,8; $\pm 219,4$	23,8; $\pm 24,4$	0,09; $\pm 0,11$	0,18; $\pm 0,25$
3	3,0; $\pm 1,5$	114,2; $\pm 70,4$	0,0; $\pm 0,0$	0,00; $\pm 0,00$	0,00; $\pm 0,00$
$\Sigma$	4,6; $\pm 4,0$	337,9; $\pm 265,5$	47,1; $\pm 78,0$	0,10; $\pm 0,14$	0,21; $\pm 0,35$

Bei den positiven Biopsien färbten sich ausschließlich die Zellen der Nierentubuli an, diese besonders an der basolateralen Seite. Matrixgewebe, infiltrierende Entzündungszellen, sowie die Glomeruli zeigten in keiner Probe eine spezifische Anfärbung (s. Abbildungen 3.1 – 3.6).

*Abbildung 3.1 CAD Grad 1 Emmprin-Score: 0,5 Färbeintensität: 3 Vergrößerung 20x*

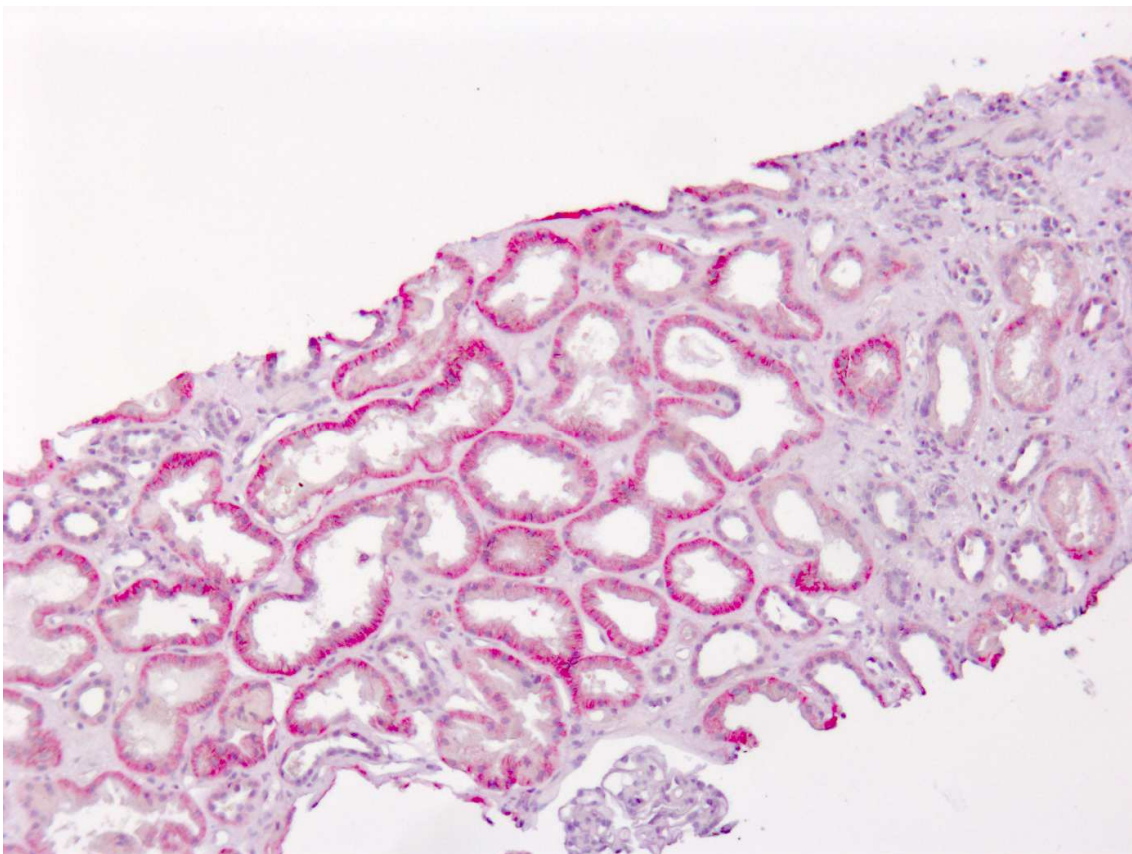


Abbildung 3.2 CAD Grad 1 Emmprin-Score: 0,5 Färbeintensität: 3 Vergrößerung: 40x

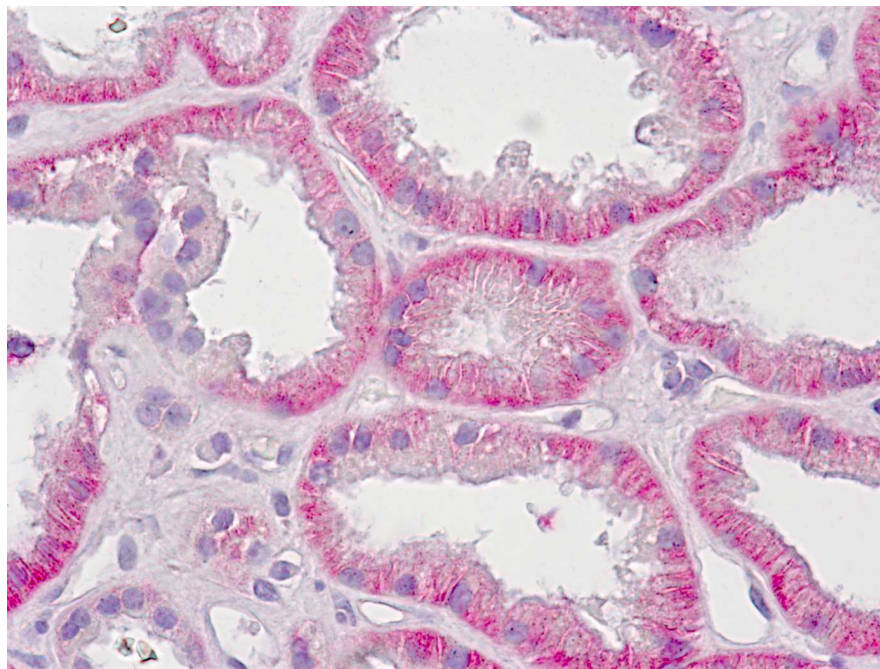


Abbildung 3.3: CAD Grad 1 Emmprin-Score: 0,13 Färbeintensität: 2 Vergrößerung: 40x

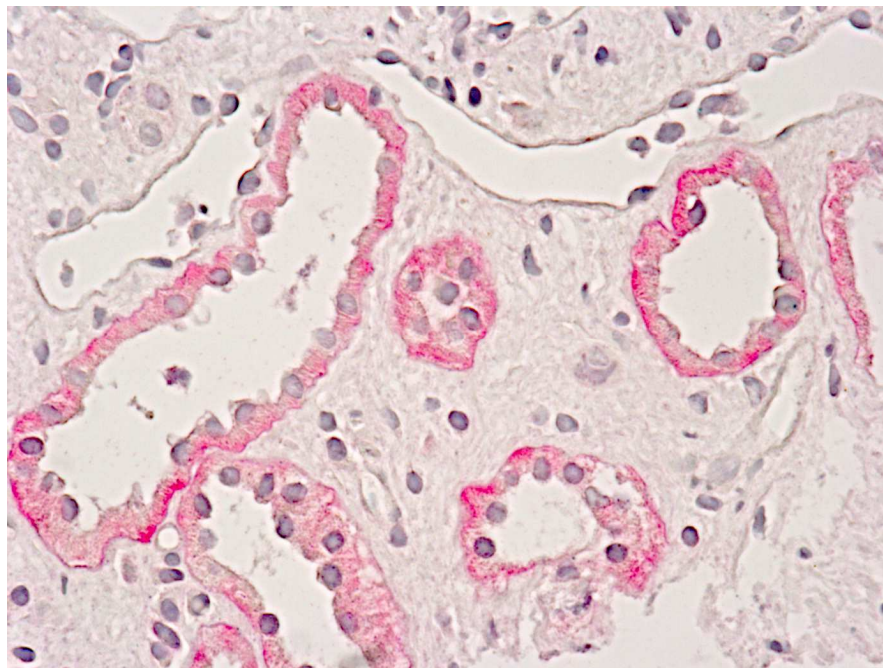


Abbildung 3.4: CAD Grad 0 Emmprin-Score: 0,42 Färbeintensität: 1 Vergrößerung: 40x

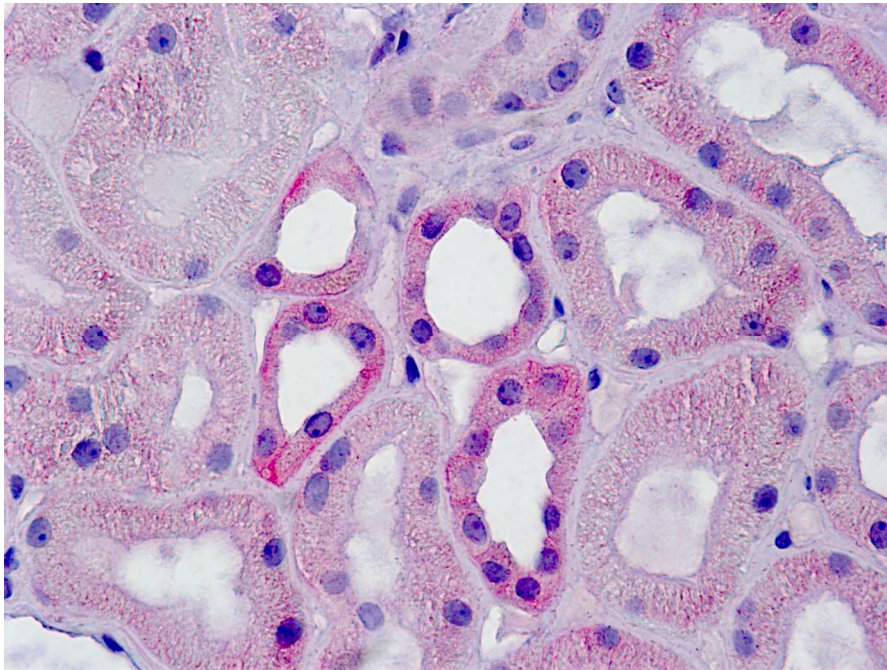


Abbildung 3.5: CAD Grad 3 Emmprin-Score: 0,00 Färbeintensität: 0 Vergrößerung: 20x

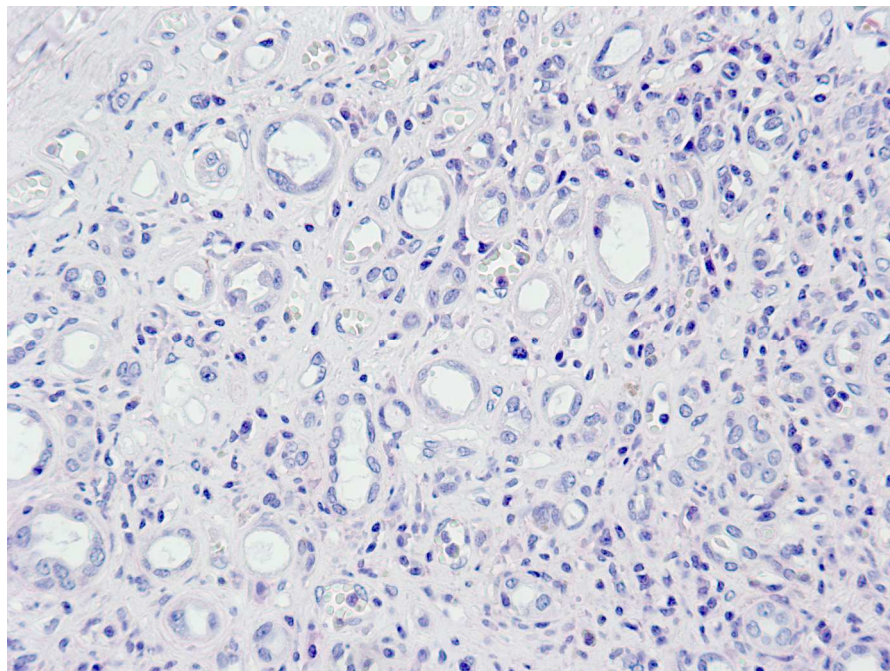
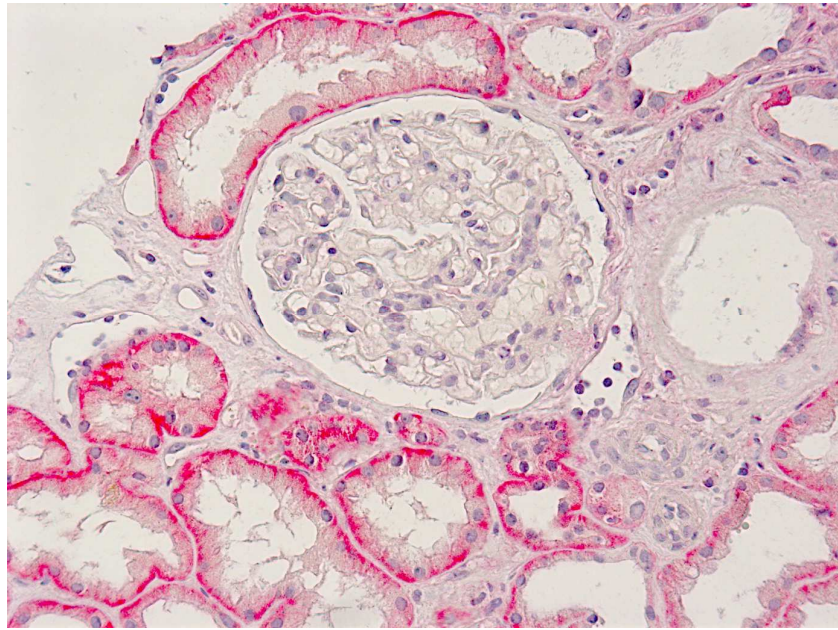


Abbildung 3.6: CAD Grad 0, Emmprin-Score: 0,26 Färbeintensität: 3 Vergrößerung: 40x



### 3.2 EMMPRIN Expression im Verlauf des chronischen Transplantatschadens

Es wurden der EMMPRIN-Score, sowie EMMPRIN-Score x Färbeintensität als quantitative Variable und der Färbeintensitätsgrad als qualitative Größe in Bezug auf die klinischen und laborchemischen Daten bezüglich signifikanter Korrelationen untersucht.

Tabelle 3.2: Ergebnisse der Varianzanalyse von CAD Grad und EMMPRIN-Score

Unterschiede der EMMPRIN Scores zwischen CAD Grad (a) und (b)		Mittlere Diff.	Standard-abweichung	Sig.	95%-Konfidenz-Intervall	
					Untergrenze	Obergrenze
0	1	0,045	0,053	1,000	-0,101	0,192
0	2	0,117	0,051	0,152	-0,022	0,257
0	3	0,212*	0,050	0,000	0,077	0,348
1	2	0,072	0,046	0,759	-0,055	0,199
1	3	0,167*	0,044	0,003	0,045	0,289
2	3	0,095	0,041	0,157	-0,019	0,209

Die mit \* gekennzeichneten Werte sind statistisch signifikant.

Die Mittelwerte der EMMPRIN-Scores zwischen den Gruppen null und drei, sowie zwischen eins und drei unterschieden sich statistisch signifikant. Unterschiede zwischen anderen Gruppen waren zwar ebenfalls nachweisbar, jedoch waren diese nicht statistisch signifikant (s. Tabelle 3.2).

Tabelle 3.3: Ergebnisse der Varianzanalyse von CAD Grad und EMMPRIN-Score x Färbeintensität

Unterschiede von		Mittlere	Standard-	Sig.	95%-Konfidenz-Intervall	
EMMPRIN-Scores x Färbeintensität zwischen CAD Grad (a) und (b)					Diff.	abweichug
<b>0</b>	<b>1</b>	<b>-0,026</b>	<b>0,143</b>	<b>1,000</b>	<b>-0,421</b>	<b>0,370</b>
<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0,231</b>	<b>0,137</b>	<b>0,591</b>	<b>-0,147</b>	<b>0,608</b>
<b>0</b>	<b>3</b>	<b>0,407*</b>	<b>0,132</b>	<b>0,021</b>	<b>0,042</b>	<b>0,772</b>
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>0,256</b>	<b>0,124</b>	<b>0,270</b>	<b>-0,087</b>	<b>0,599</b>
<b>1</b>	<b>3</b>	<b>0,433*</b>	<b>0,120</b>	<b>0,004</b>	<b>0,104</b>	<b>0,763</b>
<b>2</b>	<b>3</b>	<b>0,177</b>	<b>0,111</b>	<b>0,719</b>	<b>-0,131</b>	<b>0,484</b>

Die mit \* gekennzeichneten Werte sind statistisch signifikant

Die Mittelwerte der EMMPRIN-Scores x Färbeintensität zwischen den Gruppen null und drei, sowie zwischen eins und drei unterschieden sich statistisch signifikant (s. Tabelle 3.3).



Neben der Auswertung des 50 Patienten umfassenden Kollektivs wurden fünf Patienten ausgewählt, von denen mindestens fünf Biopsien im zeitlichen Verlauf vorhanden waren. Im Folgenden werden die Ergebnisse der seriellen Biopsien bei jedem der fünf Patienten beschrieben, die mit Patient 1 bis 5 bezeichnet werden. Die Färbungen der seriellen Proben wurden alle im gleichen Arbeitsgang durchgeführt, um systematische Färbefehler bei der Immunhistochemie zu vermeiden. Die Schweregrade des chronischen Transplantatschadens der Biopsien, die innerhalb der ersten drei Monate nach Transplantation genommen wurden, sind nicht aufgeführt, da die Veränderungen in diesen Proben am ehesten auf die Grunderkrankung zurückzuführen sind.

Von Patient 1 existierten fünf Biopsien, die einen Zeitraum von 33,1 Monaten umfassen, die erste Biopsie wurde 0,7 Monate nach der Transplantation entnommen. Eine Übersicht über die zeitliche Abfolge liefert Tabelle 3.4. Die ersten beiden Biopsien, die innerhalb des ersten Monats genommen wurden, zeigten beide spezifische Färbung auf EMMPRIN (EMMPRIN-Score: 0,02; Färbeintensität: 1 bzw. EMMPRIN-Score:0,11; Färbeintensität: 1). Die weiteren Biopsien zeigten keine spezifische EMMPRIN Anfärbung.

Von Patient 2 (s. Tabelle 3.5) waren fünf Biopsien, sowie ein Nephrektomiepräparat vorhanden. Bis auf die dritte Biopsie, die schwach positiv war (EMMPRIN-Score: 0,04; Färbeintensität: 1), konnte keine spezifische Färbung gefunden werden.

Bei Patient 3 (s. Tabelle 3.6) war die erste der fünf Biopsien stark positiv auf EMMPRIN (EMMPRIN-Score: 0,35; Färbeintensität: 2). Die anderen Biopsien zeigten keine spezifische Anfärbung.

Von Patient 4 (s. Tabelle 3.7) lagen fünf Biopsien, sowie ein Nephrektomiepräparat vor. Der Zeitraum von 83,7 Monaten ist der größte, der in den seriellen Biopsien erfasst wurde. Auch hier zeigte die erste Biopsie eine deutliche EMMPRIN-Färbung (EMMPRIN-Score: 0,57; Färbeintensität: 3), die folgenden Proben einschließlich Nephrektomiepräparat waren negativ.

Die erste Biopsie bei Patient 5 (s. Tabelle 3.8) war im Gegensatz zu den anderen vier Patienten nicht innerhalb des ersten Jahres genommen worden, sondern erst 27,3 Monate nach Transplantation. Diese Biopsie hatte keine spez. Färbung. Die nächste Biopsie einen Monate später war positiv (EMMPRIN-Score: 0,43; Färbeintensität: 2), ebenso die vierte Biopsie, die 37,5 Monate nach Transplantation entnommen wurde (EMMPRIN-Score: 0,26; Färbeintensität: 3).

Tabelle 3.4: Zeitlicher Verlauf der EMMPRIN Expression von Patient 1

<b>Zeit nach Transplantation in Monaten</b>	<b>0,7</b>	<b>1,0</b>	<b>7,5</b>	<b>33,7</b>	<b>33,8</b>
<b>EMMPRIN</b>	<b>Positiv</b>	<b>Positiv</b>	<b>Negativ</b>	<b>Negativ</b>	<b>Negativ</b>
<b>CAD Grad</b>			<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>

Tabelle 3.5: Zeitlicher Verlauf der EMMPRIN Expression von Patient 2

<b>Zeit nach Transplantation in Monaten</b>	<b>0,2</b>	<b>0,4</b>	<b>22,2</b>	<b>37,5</b>	<b>38,3</b>	<b>39,0</b>
<b>EMMPRIN</b>	<b>Negativ</b>	<b>Negativ</b>	<b>Positiv</b>	<b>Negativ</b>	<b>Negativ</b>	<b>Negativ</b>
<b>CAD Grad</b>			<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>

Tabelle 3.6: Zeitlicher Verlauf der EMMPRIN Expression von Patient 3

<b>Zeit nach Transplantation in Monaten</b>	<b>0,7</b>	<b>29,5</b>	<b>35,8</b>	<b>39,3</b>	<b>41,7</b>
<b>EMMPRIN</b>	<b>Positiv</b>	<b>Negativ</b>	<b>Negativ</b>	<b>Negativ</b>	<b>Negativ</b>
<b>CAD Grad</b>		<b>0</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>

Tabelle 3.7: Zeitlicher Verlauf der EMMPRIN Expression von Patient 4

<b>Zeit nach Transplantation in Monaten</b>	<b>2,3</b>	<b>21,2</b>	<b>36,4</b>	<b>46,5</b>	<b>47,3</b>	<b>83,7</b>
<b>EMMPRIN</b>	<b>Positiv</b>	<b>Negativ</b>	<b>Negativ</b>	<b>Negativ</b>	<b>Negativ</b>	<b>Negativ</b>
<b>CAD Grad</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3</b>

Tabelle 3.8: Zeitlicher Verlauf der EMMPRIN Expression von Patient 5

<b>Zeit nach Transplantation in Monaten</b>	<b>27,3</b>	<b>28,6</b>	<b>33,6</b>	<b>37,5</b>	<b>51,7</b>
<b>EMMPRIN</b>	<b>Negativ</b>	<b>Positiv</b>	<b>Negativ</b>	<b>Positiv</b>	<b>Negativ</b>
<b>CAD Grad</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>

### 3.3 EMMPRIN und klinische Parameter

Ein höherer Grad des chronischen Transplantatschadens war mit einem kleineren EMMPRIN-Score assoziiert. Ein erniedrigter EMMPRIN-Score war mit einer erniedrigten glomerulären Filtrationsrate assoziiert. Erniedrigte EMMPRIN-Scores waren ferner mit höheren Kreatininserumkonzentrationen und höherem  $\Delta$ -Kreatinin assoziiert. Für Harnstoffserumkonzentration und Transplantatalter ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (s. Tabelle 3.9).

*Tabelle 3.9: Korrelation zwischen EMMPRIN-Score und den klinischen/laborchemischen Daten*

<b>Korrelation zwischen EMMPRIN-Score und ...</b>	<b>Art des Testes</b>	<b>p-Wert</b>
<b>CAD Grad</b>	<b>Kruskall-Wallis-Test</b>	<b>&lt; 0,001 *</b>
<b>glomerulärer Filtrationsrate</b>	<b>Spearman-Test</b>	<b>0,022 *</b>
<b>Kreatinin</b>	<b>Spearman-Test</b>	<b>0,018 *</b>
<b><math>\Delta</math> - Kreatinin</b>	<b>Spearman-Test</b>	<b>0,010 *</b>
<b>Harnstoff</b>	<b>Spearman-Test</b>	<b>0,312</b>
<b>Transplantatalter</b>	<b>Spearman-Test</b>	<b>0,212</b>

Die mit \* gekennzeichneten Werte sind statistisch signifikant.

Ein höherer Grad des chronischen Transplantatschadens war mit einer erniedrigten Färbeintensität assoziiert. Außerdem war eine erhöhte Färbeintensität mit einer erhöhten Kreatininserumkonzentration, einem erhöhten  $\Delta$ -Kreatinin und einer verminderten glomerulären Filtrationsrate korreliert. Ferner zeigte sich, dass steigendes Transplantatalter mit geringerer Färbeintensität korreliert ist (s. Tabelle 3.10).

*Tabelle 3.10: Korrelation zwischen der Färbeintensität und den klinischen/laborchemischen Daten*

<b>Zusammenhang zwischen Färbeintensität und....</b>	<b>Art des Testes</b>	<b>p-Wert</b>
<b>CAD Grad</b>	<b>Chi<sup>2</sup>-Test</b>	<b>&lt; 0,001 *</b>
<b>glomerulärer Filtrationsrate</b>	<b>Kruskall-Wallis-Test</b>	<b>0,046 *</b>
<b>Kreatinin</b>	<b>Kruskall-Wallis-Test</b>	<b>0,019 *</b>
<b><math>\Delta</math> - Kreatinin</b>	<b>Kruskall-Wallis-Test</b>	<b>0,018 *</b>
<b>Harnstoff</b>	<b>Kruskall-Wallis-Test</b>	<b>0,456</b>
<b>Transplantatalter</b>	<b>Kruskall-Wallis-Test</b>	<b>0,046 *</b>

Die mit \* gekennzeichneten Werte sind statistisch signifikant.

Höhere Werte bei EMMPRIN-Score x Färbetintensität korrelierten mit reduzierter glomerulärer Filtrationsrate, sowie steigenden Kreatininserumkonzentrationen und steigendem  $\Delta$ -Kreatinin (s. Tabelle 3.11).

*Tabelle 3.11: Korrelation zwischen EMMPRIN-Score x Färbetintensität und den klinischen/laborchemischen Daten*

Zusammenhang zwischen EMMPRIN-Score x Färbetintensität und ...	Art des Testes	p-Wert
<b>CAD Grad</b>	<b>Kruskall-Wallis-Test</b>	<b>&lt; 0,001 *</b>
<b>Glomerulärer Filtrationsrate</b>	<b>Spearman-Test</b>	<b>0,015 *</b>
<b>Kreatinin</b>	<b>Spearman-Test</b>	<b>0,014 *</b>
<b><math>\Delta</math> - Kreatinin</b>	<b>Spearman-Test</b>	<b>0,012 *</b>
<b>Harnstoff</b>	<b>Spearman-Test</b>	<b>0,249</b>
<b>Transplantatalter</b>	<b>Spearman-Test</b>	<b>0,137</b>

Die mit \* gekennzeichneten Werte sind statistisch signifikant.

## 4 Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass EMMPRIN in Biopsien von transplantierten Nieren mit chronischem Transplantatschaden nachweisbar ist. In 63,16% der 38 Biopsien war eine EMMPRIN Expression zu finden, jedoch in keinem einzigen der zwölf Nephrektomiepräparate. In unserer Studie konnten wir EMMRPIN Expression in Nieren nachweisen, die in unterschiedlichem Maße von einem chronischen Transplantatschaden betroffen sind. Wir detektierten EMMPRIN an der basolateralen Seite von Tubuluszellen; umgebendes Stroma, Entzündungszellen, sowie Glomerula waren hingegen frei von EMMRPIN. Shimada et al. untersuchten in ihrer Studie das Vorkommen von EMMPRIN in den Nieren gesunder Patienten mittels Immunfluoreszenz, PCR und Western Blotting. Sie fanden EMMPRIN Expression in den tubuloepithelialen Zellen der Niere bei den meisten Patienten, jedoch beobachteten sie keine Expression in den Glomeruli (Ina, Kitamura et al. 2002). Auch wenn wir es in unserer Studie mit transplantierten Nieren zu tun hatten, konnten wir beim chronischen Transplantatschaden Grad 0 und 1 diese Ergebnisse bestätigen.

Beim Vergleich der EMMPRIN Expressionen zwischen den CAD Gruppen Grad 1 bis 3 zeigte sich, dass bei Transplantaten ohne fibrotischen Umbau, sowie bei Transplantaten mit chronischem Transplantatschaden Grad 1 signifikant mehr EMMPRIN exprimiert wurde als in Transplantaten mit chronischem Transplantatschaden Grad 3. Unterschiede zwischen weiteren Gruppen zeigten eine Tendenz zu erhöhter EMMPRIN Expression in Transplantaten mit weniger fibrotischem Umbau, diese Korrelationen waren jedoch nicht signifikant.

In Transplantaten, in denen ein fortgeschrittener chronischer Transplantatschaden nachweisbar ist, findet man im Gegensatz zu gesunden Nieren erniedrigte Expression von MMP (Palomar, Mayorga et al. 2005). Diskutiert wird dies im Zusammenhang mit der Fibroseentstehung, verminderter Expression von MMP könnte zu mangelhaftem Abbau von Matrix führen und dadurch die Fibrosierung des Organs fördern. Dass EMMPRIN in der Lage ist, die Synthese von MMP zu induzieren, konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, zum Beispiel stimulieren maligne Tumorzellen über EMMPRIN

Expression die MMP Aktivierung (Gabison, Hoang-Xuan et al. 2005). Dass man ebenso wie verminderte MMP Expression auch weniger EMMPRIN in Nieren mit chronischem Transplantatschaden nachweisen kann, belegt unsere Studie. In Neoplasien führte erhöhte EMMPRIN Konzentration zu aggressiverer Invasion und erhöhtem Umbau von extrazellulärer Matrix. In unserem Fall korreliert die verminderte EMMPRIN Expression mit zunehmender Matrixanhäufung und Nephropathie. Bei der Frage, ob zwischen der EMMPRIN Expression und chronischem Transplantatschaden ein kausaler Zusammenhang besteht, sollten die Wechselwirkungen zwischen EMMPRIN und Transplantatschaden biologisch sinnvoll und plausibel sein. Dass eine Blockierung der MMP Aktivität den Transplantatschaden verstärkt, ist belegt (Lutz, Yao et al. 2005), ebenso die Tatsache, dass die EMMPRIN-Aktivität zur Steigerung der MMP Expression führt (Caudroy, Polette et al. 2002; Li and Yang 2009). Eine Zunahme des Fibrosegrades beim chronischen Transplantatschaden ist somit durchaus durch verminderte EMMPRIN Expression erklärbar. EMMPRIN könnte somit ein Schutzfaktor sein, der vor Fibrose schützt und sich im Verlauf erschöpft. Ob eine Kausalität tatsächlich besteht, kann allerdings nur durch direkte Beeinflussung der EMMPRIN Aktivität untersucht werden.

EMMPRIN war nicht in jeder Biopsie mit CAD Grad 0 oder 1 nachweisbar. Möglich wäre es, dass EMMPRIN in der nicht oder nur milde geschädigten transplantierten Niere nicht konstitutionell exprimiert wird, sondern nur unter bestimmten Einflüssen und zu bestimmten Zeitpunkten. Um hierfür eine mögliche Erklärung zu finden, wird noch einmal kurz Bezug genommen auf die Mechanismen, die an der Entstehung eines chronischen Transplantatschadens beteiligt sind (s. Kapitel 1.2, 1.3, Abbildung 1.2). Die Entwicklung des Transplantatschadens lässt sich in verschiedene Phasen unterteilen. Die Entzündungsphase geht auf Faktoren wie (sub-)klinische akute Abstoßungen und Ischämie-Reperfusionsschäden zurück, die späte Phase beginnt ca. ein Jahre nach Transplantation und ist gekennzeichnet durch langsames, aber stetiges Fortschreiten des Transplantatschadens (Nankivell, Borrows et al. 2003). Wie bereits Lutz et al. gezeigt hatten, führte die frühe MMP Hemmung im Mausmodell zur Hemmung des chronischen Transplantatschadens, weil möglicherweise die MMP in der frühen Phase als Promotoren der Entzündung fungieren (Lutz, Yao et al. 2005). Denkbar wäre nun eine Expression von EMMPRIN in der frühen Phase als übergeordneter Regulator der MMP, was wiederum die MMP Expression fördert und somit den Fortschritt des chronischen Transplantatschadens in diesem Stadium begünstigt. Dieser Prozess spielt sich

möglicherweise nicht fortwährend ab, was der Grund dafür sein könnte, dass sich EMMPRIN nicht in allen Proben des frühen Transplantatschadens nachweisen lässt. Die Tatsache, dass sich jedoch in den Transplantaten Grad 0 und 1 signifikant mehr EMMPRIN nachweisen ließ, könnte dafür sprechen, dass sich in dieser frühen Phase der Transplantatschädigung noch mehr aktive Vernarbungsprozesse abspielen, die im weiteren Verlauf im chronischen Transplantatschaden münden. Passend hierzu zeigte eine der wenigen Studien, die sich mit EMMPRIN in humanem fibrotischem Gewebe befasst, dass EMMPRIN bei der pulmonalen Fibrose besonders in der Nähe aktiver Vernarbungsprozesse nachzuweisen war. Die Autoren schlugen vor, dass EMMPRIN demzufolge wichtig für diese Umbauprozesse sei, nämlich indem es möglicherweise die MMP Produktion in Fibroblasten stimuliere und damit die Umstrukturierung der extrazellulären Matrix ermögliche, die in pulmonaler Fibrose mündet (Guillot, Delaval et al. 2006).

Zusammenfassend gesagt könnte eine verminderte EMMPRIN Expression durch verminderte MMP Aktivierung den Fortschritt des chronischen Transplantatschadens in der späten Phase begünstigen. Zum anderen könnte eine EMMPRIN Expression in der frühen Phase des Transplantatschadens als Promoter aktiver Vernarbungsprozesse die Entwicklung des chronischen Transplantatschadens fördern.

Es wurden ferner serielle Biopsien von fünf Patienten untersucht, um den zeitlichen Verlauf der EMMPRIN Expression im gleichen Transplantat zu untersuchen. Bei drei Patienten konnte in den Biopsien, die früher nach Transplantation genommen wurden, EMMPRIN Färbung nachgewiesen werden, während diese in den späteren Biopsien nicht mehr anzutreffen war. Dies passt zur Hypothese, dass verminderte EMMPRIN Expression den Fortschritt des chronischen Transplantatschadens fördert, da der Niere ein wichtiger Schutzfaktor fehlt. Bei den anderen beiden Biopsieserien war EMMPRIN in Biopsien nachweisbar, die nicht zeitlich aufeinander folgten. Die Verläufe dieser beiden Patienten wären damit erklärbar, dass EMMPRIN nicht dauerhaft in der Niere exprimiert wird, sondern einen Marker eines aktiven Vernarbungsprozesses darstellt, der nicht kontinuierlich abläuft. Letztendlich müssen aber immer auch methodische Probleme, zum Beispiel durch das unterschiedliche Alter der Paraffinschnitte, in Betracht gezogen werden.



Wir konnten ferner nachweisen, dass eine verminderte EMMPRIN Expression mit erhöhten Serumkreatininwerten beziehungsweise mit einer verminderten glomerulären Filtrationsrate korreliert. EMMRPIN steht also nicht nur mit histopathologischen Veränderungen beim chronischen Transplantatschaden, sondern auch mit der daraus resultierenden eingeschränkten Funktion der Transplantatniere in Zusammenhang.

## 5 Zusammenfassung

Das Langzeitüberleben transplantiertener Nieren wird in erster Linie durch das Auftreten und den Verlauf eines chronischen Transplantatschadens bestimmt. Dieser ist gekennzeichnet durch vaskuläre Schäden, fortschreitende interstitielle Fibrosierung, tubuläre Atrophie und Glomerulosklerose. Die Anhäufung der extrazellulären Matrix wird dabei als Folge eines Ungleichgewichts von Matrixsynthese und Matrixabbau verstanden, wobei am Abbau vor allem Matrix Metalloproteinasen beteiligt sind, die beim chronischen Transplantatschaden vermindert exprimiert werden. Ein übergeordneter Regulator der MMP ist das EMMPRIN, das die Aktivität und Expression von MMP induzieren kann.

In dieser Studie wurden n=50 Biopsien/Nephrektomien von Nieren mit chronischem Transplantatschaden immunhistochemisch hinsichtlich ihrer Expression von EMMPRIN untersucht. Dabei fanden wir, dass der Grad der EMMPRIN Expression mit zunehmender Nephropathie korreliert. Ferner korreliert die EMMPRIN Expression positiv mit der glomerulären Filtrationsrate als Marker für eine abnehmende Transplantatfunktion. Wir folgern, dass EMMPRIN an der verminderten MMP Expression in Nieren mit chronischem Transplantatschaden ursächlich beteiligt sein könnte, indem es auch hier als übergeordneter Regulator fungiert.

## 6 Literaturverzeichnis

- Baluja, P., L. Haragsim and Z. Laszik Chronic allograft nephropathy. *Adv Chronic Kidney Dis* 13(2006) 56-61.
- Basset, P., J. P. Bellocq, C. Wolf, I. Stoll, P. Hutin, J. M. Limacher, O. L. Podhajcer, M. P. Chenard, M. C. Rio and P. Chambon A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 348(1990) 699-704.
- Biswas, C., Y. Zhang, R. DeCastro, H. Guo, T. Nakamura, H. Kataoka and K. Nabeshima The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res* 55(1995) 434-9.
- Carmeliet, P., L. Moons, R. Lijnen, M. Baes, V. Lemaitre, P. Tipping, A. Drew, Y. Eeckhout, S. Shapiro, F. Lupu and D. Collen Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. *Nat Genet* 17(1997) 439-44.
- Caudroy, S., M. Polette, B. Nawrocki-Raby, J. Cao, B. P. Toole, S. Zucker and P. Birembaut EMMPRIN-mediated MMP regulation in tumor and endothelial cells. *Clin Exp Metastasis* 19(2002) 697-702.
- Cecka, J. M. The UNOS renal transplant registry. *Clin Transpl*(2001) 1-18.
- Cheng, S., A. S. Pollock, R. Mahimkar, J. L. Olson and D. H. Lovett Matrix metalloproteinase 2 and basement membrane integrity: a unifying mechanism for progressive renal injury. *Faseb J* 20(2006) 1898-900.
- Cosio, F. G., R. P. Pelletier, D. D. Sedmak, M. E. Falkenhain, M. L. Henry, E. A. Elkhammas, E. A. Davies, G. L. Bumgardner and R. M. Ferguson Pathologic classification of chronic allograft nephropathy: pathogenic and prognostic implications. *Transplantation* 67(1999) 690-6.
- DSO Deutsche Gesellschaft Organspende: Daten und Grafiken. [www.dso.de](http://www.dso.de), Stand: 22.1.11.
- Eddy, A. A. Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol* 15(2000) 290-301.

- Gabison, E. E., T. Hoang-Xuan, A. Mauviel and S. Menashi EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair. *Biochimie* 87(2005) 361-8.
- Gomez, D. E., D. F. Alonso, H. Yoshiji and U. P. Thorgeirsson Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74(1997) 111-22.
- Guillot, S., P. Delaval, G. Brinchault, S. Caulet-Maugendre, A. Depince, H. Lena, B. Delatour, V. Lagente and C. Martin-Chouly Increased extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) expression in pulmonary fibrosis. *Exp Lung Res* 32(2006) 81-97.
- Haug, C., C. Lenz, F. Diaz and M. G. Bachem Oxidized low-density lipoproteins stimulate extracellular matrix metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) release by coronary smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(2004) 1823-9.
- Hewitt, R. and K. Dano Stromal cell expression of components of matrix-degrading protease systems in human cancer. *Enzyme Protein* 49(1996) 163-73.
- Igakura, T., K. Kadomatsu, T. Kaname, H. Muramatsu, Q. W. Fan, T. Miyauchi, Y. Toyama, N. Kuno, S. Yuasa, M. Takahashi, T. Senda, O. Taguchi, K. Yamamura, K. Arimura and T. Muramatsu A null mutation in basigin, an immunoglobulin superfamily member, indicates its important roles in peri-implantation development and spermatogenesis. *Dev Biol* 194(1998) 152-65.
- Igakura, T., K. Kadomatsu, O. Taguchi, H. Muramatsu, T. Kaname, T. Miyauchi, K. Yamamura, K. Arimura and T. Muramatsu Roles of basigin, a member of the immunoglobulin superfamily, in behavior as to an irritating odor, lymphocyte response, and blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun* 224(1996) 33-6.
- Ina, K., H. Kitamura, S. Tatsukawa, T. Takayama, Y. Fujikura and T. Shimada Transformation of interstitial fibroblasts and tubulointerstitial fibrosis in diabetic nephropathy. *Med Electron Microsc* 35(2002) 87-95.
- Inkinen, K. A., A. P. Soots, L. A. Krogerus, I. T. Lautenschlager and J. P. Ahonen Fibrosis and matrix metalloproteinases in rat renal allografts. *Transpl Int* 18(2005) 506-12.

- Joosten, S. A., Y. W. Sijpkens, C. van Kooten and L. C. Paul Chronic renal allograft rejection: pathophysiologic considerations. *Kidney Int* 68(2005) 1-13.
- Kasiske, B. L., R. S. Kalil, H. S. Lee and K. V. Rao Histopathologic findings associated with a chronic, progressive decline in renal allograft function. *Kidney Int* 40(1991) 514-24.
- Kontinen, Y. T., T. F. Li, J. Mandelin, M. Liljestrom, T. Sorsa, S. Santavirta and I. Virtanen Increased expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 43(2000) 275-80.
- Li, C. and C. W. Yang The pathogenesis and treatment of chronic allograft nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 5(2009) 513-9.
- Lindholm, A., S. Ohlman, D. Albrechtsen, G. Tufveson, H. Persson and N. H. Persson The impact of acute rejection episodes on long-term graft function and outcome in 1347 primary renal transplants treated by 3 cyclosporine regimens. *Transplantation* 56(1993) 307-15.
- Lutz, J., Y. Yao, E. Song, B. Antus, P. Hamar, S. Liu and U. Heemann Inhibition of matrix metalloproteinases during chronic allograft nephropathy in rats. *Transplantation* 79(2005) 655-61.
- MacDougall, J. R. and L. M. Matrisian Contributions of tumor and stromal matrix metalloproteinases to tumor progression, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 14(1995) 351-62.
- Major, T. C., L. Liang, X. Lu, W. Rosebury and T. M. Bocan Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) is induced upon monocyte differentiation and is expressed in human atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(2002) 1200-7.
- Meier-Kriesche, H. U., A. O. Ojo, A. B. Leichtman, J. C. Magee, S. M. Rudich, J. A. Hanson, D. M. Cibrik and B. Kaplan Interaction of mycophenolate mofetil and HLA matching on renal allograft survival. *Transplantation* 71(2001) 398-401.
- Modena, F. M., T. H. Hostetter, A. K. Salahudeen, J. S. Najarian, A. J. Matas and M. E. Rosenberg Progression of kidney disease in chronic renal transplant rejection. *Transplantation* 52(1991) 239-44.

- Nabeshima, K., H. Iwasaki, K. Koga, H. Hojo, J. Suzumiya and M. Kikuchi Emprin (basigin/CD147): matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression. *Pathol Int* 56(2006) 359-67.
- Nankivell, B. J., R. J. Borrows, C. L. Fung, P. J. O'Connell, R. D. Allen and J. R. Chapman The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 349(2003) 2326-33.
- Noguchi, Y., T. Sato, M. Hirata, T. Hara, K. Ohama and A. Ito Identification and characterization of extracellular matrix metalloproteinase inducer in human endometrium during the menstrual cycle in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 88(2003) 6063-72.
- Opelz, G. New immunosuppressants and HLA matching. *Transplant Proc* 33(2001) 467-8.
- Palomar, R., M. Mayorga, J. C. Ruiz, J. Cuevas, E. Rodrigo, J. G. Cotorruelo, J. F. Val-Bernal and M. Arias Markers of fibrosis in early biopsies of renal transplants. *Transplant Proc* 37(2005) 1468-70.
- Paul, L. C. Chronic allograft nephropathy: An update. *Kidney Int* 56(1999) 783-93.
- Racusen, L. C., K. Solez, R. B. Colvin, S. M. Bonsib, M. C. Castro, T. Cavallo, B. P. Croker, A. J. Demetris, C. B. Drachenberg, A. B. Fogo, P. Furness, L. W. Gaber, I. W. Gibson, D. Glotz, J. C. Goldberg, J. Grande, P. F. Halloran, H. E. Hansen, B. Hartley, P. J. Hayry, C. M. Hill, E. O. Hoffman, L. G. Hunsicker, A. S. Lindblad, Y. Yamaguchi and et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 55(1999) 713-23.
- Schmidt, R., A. Bultmann, M. Ungerer, N. Joghetaei, O. Bulbul, S. Thieme, T. Chavakis, B. P. Toole, M. Gawaz, A. Schomig and A. E. May Extracellular matrix metalloproteinase inducer regulates matrix metalloproteinase activity in cardiovascular cells: implications in acute myocardial infarction. *Circulation* 113(2006) 834-41.
- Solez, K., R. B. Colvin, L. C. Racusen, M. Haas, B. Sis, M. Mengel, P. F. Halloran, W. Baldwin, G. Banfi, A. B. Collins, F. Cosio, D. S. David, C. Drachenberg, G. Einecke, A. B. Fogo, I. W. Gibson, D. Glotz, S. S. Iskandar, E. Kraus, E. Lerut, R. B. Mannon,

- M. Mihatsch, B. J. Nankivell, V. Nickleit, J. C. Papadimitriou, P. Randhawa, H. Regele, K. Renaudin, I. Roberts, D. Seron, R. N. Smith and M. Valente Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 8(2008) 753-60.
- Southgate, K. M., M. Davies, R. F. Booth and A. C. Newby Involvement of extracellular-matrix-degrading metalloproteinases in rabbit aortic smooth-muscle cell proliferation. *Biochem J* 288 ( Pt 1)(1992) 93-9.
- Takemoto, S. K., P. I. Terasaki, D. W. Gjertson and J. M. Cecka Twelve years' experience with national sharing of HLA-matched cadaveric kidneys for transplantation. *N Engl J Med* 343(2000) 1078-84.
- Tomita, T., T. Nakase, M. Kaneko, K. Shi, K. Takahi, T. Ochi and H. Yoshikawa Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 46(2002) 373-8.
- Vincenti, F., R. Kirkman, S. Light, G. Bumgardner, M. Pescovitz, P. Halloran, J. Neylan, A. Wilkinson, H. Ekberg, R. Gaston, L. Backman and J. Burdick Interleukin-2-receptor blockade with daclizumab to prevent acute rejection in renal transplantation. Daclizumab Triple Therapy Study Group. *N Engl J Med* 338(1998) 161-5.
- Waller, J. R. and M. L. Nicholson Molecular mechanisms of renal allograft fibrosis. *Br J Surg* 88(2001) 1429-41.
- Yamani, M. H., R. C. Starling, J. B. Young, D. Cook, Y. Yu, D. G. Vince, P. McCarthy and N. B. Ratliff Acute vascular rejection is associated with up-regulation of vitronectin receptor (alpha<sub>v</sub>beta<sub>3</sub>), increased expression of tissue factor, and activation of the extracellular matrix metalloproteinase induction system. *J Heart Lung Transplant* 21(2002) 983-9.

## 7 Anhang

n	Geschlecht	Geburtsdatum			Alter	Gewicht [kg]	CAD Grad	Basis Krea [mg/dl]	Krea [mg/dl]	GFR [ml/min]	Harnstoff [mg/dl]
		9	11	1967							
1	m	9	11	1967	37	85,0	0	1,60	1,80	66,0	22
2	m	25	9	1923	70	57,2	0	1,60	4,00	14,0	62
3	m	15	3	1936	57	92,0	0	2,00	2,90	36,5	42
4	f	28	6	1989	14	44,0	0	2,20	4,60	14,0	54
5	f	27	3	1958	40	65,5	0	1,10	1,70	38,3	34
6	f	9	7	1943	60	53,9	0	2,00	6,30	9,0	88
7	f	12	10	1968	29	61,0	0	0,60	1,60	50,0	22
8	m	18	7	1927	64	71,0	0	2,20	5,20	14,4	76
9	m	1	8	1940	57	62,0	1	1,40	3,40	24,8	34
10	m	14	7	1939	57	72,0	1	1,00	3,10	26,6	61
11	m	17	12	1944	51	80,5	1	1,30	1,90	52,5	29
12	m	4	12	1940	57	94,3	1	1,20	2,00	54,0	38
13	m	17	2	1950	43	59,2	1	1,80	3,20	25,2	23
14	m	9	3	1935	62	84,4	1	1,30	3,90	23,4	57
15	m	18	5	1933	62	74,0	1	1,40	2,80	28,9	47
16	m	30	1	1931	60	68,7	1	1,40	1,80	42,4	43
17	m	21	12	1938	57	69,5	1	1,40	1,70	39,6	?
18	f	4	2	1949	53	70,0	1	1,10	3,50	20,7	32
19	m	11	4	1941	60	58,0	1	1,30	1,80	36,0	20
20	f	2	10	1963	32	67,0	2	1,50	2,00	43,1	36
21	f	5	6	1939	58	82,4	2	1,80	2,60	30,7	53
22	m	16	4	1940	56	77,2	2	1,80	5,00	17,6	59
23	m	30	9	1937	56	120,0	2	1,60	2,00	69,7	27
24	f	23	12	1942	60	53,0	2	1,80	4,40	13,6	26
25	m	19	10	1937	57	109,0	2	2,20	3,40	37,4	36
26	m	19	8	1966	31	84,7	2	1,40	2,50	51,2	39
27	f	25	11	1944	55	57,0	2	1,20	3,50	16,6	35
28	m	3	6	1963	32	63,0	2	1,30	4,50	20,5	82
29	m	28	4	1940	51	73,6	2	2,00	6,40	14,2	64
30	f	13	6	1968	24	56,0	2	1,90	2,20	34,5	36
31	m	15	12	1940	58	59,0	2	1,60	5,10	13,1	211
32	f	8	1	1959	37	52,1	2	1,70	3,30	22,7	67
33	m	7	3	1963	33	66,0	2	1,40	3,20	31,0	65
34	m	24	1	1966	35	57,5	3	1,40	6,20	13,7	146
35	m	3	1	1977	26	58,0	3	1,20	7,30	12,5	96
36	f	27	4	1969	34	56,0	3	0,90	9,10	9,5	49
37	m	2	11	1964	36	81,5	3	2,00	5,80	20,8	102
38	f	7	8	1941	60	54,5	3	1,10	0,80	64,6	12
39	m	13	2	1949	44	86,2	3	?	4,90	23,0	79
40	m	22	9	1939	62	57,5	3	1,20	4,10	14,8	114
41	m	24	3	1924	69	87,0	3	1,10	3,60	24,1	47
42	f	26	8	1949	52	?	3	1,40	?	?	?
43	f	26	9	1965	27	50,0	3	1,40	6,00	13,4	121
44	m	29	11	1947	54	75,5	3	1,30	9,30	9,5	43
45	m	30	5	1936	64	?	3	1,80	?	?	?
46	m	1	10	1940	54	67,0	3	1,50	2,30	34,4	37
47	m	13	12	1934	59	73,1	3	1,60	8,50	9,7	116



n	Geschlecht	Geburtsdatum			Alter	Gewicht [kg]	CAD Grad	Basis Krea [mg/dl]	Krea [mg/dl]	GFR [ml/min]	Harnstoff [mg/dl]
48	f	24	11	1940	55	69,2	3	1,40	3,90	18,1	75
49	m	24	5	1957	45	76,0	3	1,00	12,00	8,6	129
50	m	6	11	1952	40	54,0	3	1,80	3,60	21,0	33

n	Spendertyp des Transplantats	Grund für Dialysepflicht	Ischämiezeit des Transplantats: kalt, warm
1	Lebend	Polyzystische Nierenerkrankung	3h, 20min
2	Kadaver	Analgetika-Nephropathie	21h, 32min
3	Kadaver	Radiogene Nephritis	28h, 40min
4	Lebend	Hämolytisch-urämisches Syndrom	40min, 10min
5	Kadaver	Diabetische Nephropathie	14h, 40min
6	Kadaver	Chron. Glomerulonephritis unbek. Ätiologie	27,5h, 30min
7	Kadaver	Mesangioproliferative GN	23h, 30min
8	Kadaver	Polyzystische Nierenerkrankung	?
9	Kadaver	Chron. Glomerulonephritis unbek. Ätiologie	26h
10	Kadaver	Polyzystische Nierenerkrankung	26h, 55min
11	Kadaver	Chron. Glomerulonephritis unbek. Ätiologie	?
12	Kadaver	Mesangioproliferative GN	17h, 35min
13	Kadaver	Diabetische Nephropathie	2h, 30min
14	Kadaver	Chron. Glomerulonephritis unbek. Ätiologie	21h, 35min
15	Kadaver	Chron. Glomerulonephritis unbek. Ätiologie	33h, 30min
16	Kadaver	Chronische Pyelonephritis	20h, 32min
17	Kadaver	IgA-Nephritis	30h, 30min
18	Kadaver	Chron. Glomerulonephritis unbek. Ätiologie	21h
19	Lebend	Chron. Glomerulonephritis unbek. Ätiologie	2h, 25min
20	Kadaver	Chron. Glomerulonephritis unbek. Ätiologie	27h, 30min
21	Kadaver	Chron. Glomerulonephritis unbek. Ätiologie	26h, 50min
22	Kadaver	Diabetische Nephropathie	19h, 30min
23	Kadaver	Diabetische Nephropathie	39h, 37min
24	Kadaver	Chron. Glomerulonephritis unbek. Ätiologie	29h,35min
25	Kadaver	Polyzystische Nierenerkrankung	29,3h, 30 min
26	Lebend	Chron. Glomerulonephritis unbek. Ätiologie	3h, 40min
27	Kadaver	Polyzystische Nierenerkrankung	25h, 32min
28	Kadaver	Oxalose	12h, 30min
29	Kadaver	Diabetische Nephropathie	2,25h, 43min
30	Lebend	IgA-Nephritis	3,5h, 32 min
31	Kadaver	Interstitielle Nephritis	27h, 20min
32	Kadaver	Chron. Glomerulonephritis unbek. Ätiologie	30h, 35 min
33	Lebend	Chron. Glomerulonephritis unbek. Ätiologie	3h, 42min
34	Lebend	Fokal sklerosierende GN	3,5h, 30min
35	Kadaver	Vesicouretraler Reflux	26h, 35min
36	Kadaver	Chron. Glomerulonephritis unbek. Ätiologie	20h, 40min
37	Kadaver	Diabetische Nephropathie	15,5h 50min
38	Kadaver	Mesangioproliferative GN	24h, 35min
39	Kadaver	Fokal sklerosierende GN	27h, 38min

n	Spendertyp des Transplantats	Grund für Dialysepflicht	Ischämiezeit des Transplantats: kalt, warm
41	Kadaver	Chronische Pyelonephritis	21,5h, 40min
42	Kadaver	IgA-Nephritis	29h, 40min
43	Kadaver	Chronische Pyelonephritis	30h, 40min
44	Kadaver	IgA-Nephritis	?
45	Kadaver	Chron. Glomerulonephritis unbek. Ätiologie	18h, 45min
46	Kadaver	Chron. Glomerulonephritis unbek. Ätiologie	32h, 35min
47	Kadaver	Mesangioproliferative GN	33h, 35min
48	Kadaver	Chron. Glomerulonephritis unbek. Ätiologie	19h, 35min
49	Lebend	Vesicouretraler Reflux	2h, 30min
50	Kadaver	Chron. Glomerulonephritis unbek. Ätiologie	24,5h, 25min

n	Anzahl Tubuli in der Biopsie	Anzahl Glomerula in der Biopsie	Anzahl der gefärbten Tubuli	EMMPRIN-Score	Färbeintensität	EMMPRIN-Score x Färbeintensität
1	50	1	11	0,220	1	0,22
2	950	20	400	0,421	1	0,42
3	200	1	60	0,300	2	0,60
4	250	0	0	0,000	0	0,00
5	500	3	140	0,280	3	0,84
6	500	10	130	0,260	3	0,78
7	400	7	15	0,038	1	0,04
8	250	4	45	0,180	2	0,36
9	180	0	40	0,222	2	0,44
10	900	9	0	0,000	0	0,00
11	700	4	30	0,043	2	0,09
12	400	7	200	0,500	3	1,50
13	250	3	20	0,080	2	0,16
14	150	4	20	0,133	2	0,27
15	1100	11	35	0,032	1	0,03
16	500	3	175	0,350	3	1,05
17	400	3	150	0,375	3	1,13
18	100	2	10	0,100	1	0,10
19	350	7	0	0,000	0	0,00
20	400	9	15	0,038	1	0,04
21	600	7	30	0,050	1	0,05
22	100	1	0	0,000	0	0,00
23	300	8	0	0,000	0	0,00
24	Nephrektomie	Nephrektomie	0	0,000	0	0,00
25	100	0	25	0,250	3	0,75
26	100	5	0	0,000	0	0,00
27	600	0	0	0,000	0	0,00
28	75	0	15	0,200	1	0,20
29	150	3	50	0,333	2	0,67
30	600	0	60	0,100	3	0,30
31	200	2	0	0,000	0	0,00
32	40	2	10	0,250	1	0,25

<b>n</b>	<b>Anzahl Tubuli in der Biopsie</b>	<b>Anzahl Glomerula in der Biopsie</b>	<b>Anzahl der gefärbten Tubuli</b>	<b>EMMPRIN- Score</b>	<b>Färbe- intensität</b>	<b>EMMPRIN- Score x Färbe- intensität</b>
34	Nephrektomie	Nephrektomie	0	0,000	0	0,00
35	Nephrektomie	Nephrektomie	0	0,000	0	0,00
36	Nephrektomie	Nephrektomie	0	0,000	0	0,00
37	Nephrektomie	Nephrektomie	0	0,000	0	0,00
38	Nephrektomie	Nephrektomie	0	0,000	0	0,00
39	125	1	0	0,000	0	0,00
40	Nephrektomie	Nephrektomie	0	0,000	0	0,00
41	60	2	0	0,000	0	0,00
42	Nephrektomie	Nephrektomie	0	0,000	0	0,00
43	Nephrektomie	Nephrektomie	0	0,000	0	0,00
44	Nephrektomie	Nephrektomie	0	0,000	0	0,00
45	Nephrektomie	Nephrektomie	0	0,000	0	0,00
46	100	3	0	0,000	0	0,00
47	125	5	0	0,000	0	0,00
48	250	5	0	0,000	0	0,00
49	Nephrektomie	Nephrektomie	0	0,000	0	0,00
50	25	2	0	0,000	0	0,00

## Danksagung

Mein Dank geht als erstes an meinen Doktorvater PD Dr. J. Lutz, der mir die Erstellung dieser Arbeit ermöglicht hat.

In ganz besonderem Maße danke ich Herrn Dr. C. Schmaderer, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und ohne dessen Motivation diese Arbeit wohl nicht zustande gekommen wäre. Durch seine außerordentliche Hilfsbereitschaft war er immer für mich da, wofür ich ihm von ganzem Herzen danke.

Ferner danke ich Herrn Dr. von Weyern, der die histopathologische Einschätzung der Biopsien vorgenommen hat. Ebenso danke ich den Kollegen des Instituts für Statistik/Medizinische Informatik, die mich bei der Erstellung der Statistik unterstützt haben.

Meiner Ehefrau und meinen beiden Kindern danke ich, dass sie mir in den Höhen und Tiefen dieser Arbeit zur Seite standen.