



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Optimierung der Interleukin-6^{-597/-572/-174} Genotypisierung und
Charakterisierung der Interleukin-6-Sekretion in
Hämodialysepatienten**

Autor: Friederike Barbara Schulte
Institut / Klinik: Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. M. Müller-Steinhardt

Zielsetzung: Die einzelnen Mechanismen der Transplantatabstoßung nach allogener Nierentransplantation sind in ihrer Gänze noch nicht verstanden. Umso bedeutender ist es, die einzelnen Faktoren, die an einer solchen Abstoßungsreaktion beteiligt sind, genauer zu erforschen. So könnten zukünftig für jeden Patienten die Risiken individualisiert und in die Behandlung mit einbezogen werden. Es ist bekannt, dass die IL-6-Promotor-Polymorphismen („SNPs“) an den Positionen -597, -572 und -174 den Erfolg einer allogenen Nierentransplantation beeinflussen können. So zeigte sich, dass bei Patienten mit dem IL-6^{-597/-572/-174} Genotyp GGG/GGG die beste 3-Jahres-Transplantatüberlebensrate zu beobachten ist, während alle anderen IL-6^{-597/-572/-174} Genotypen mit einem frühzeitigen Transplantatverlust assoziiert sind. Des Weiteren wurde bei gesunden Blutspendern ein Zusammenhang zwischen dem IL-6^{-597/-572/-174} Genotyp und der IL-6-Sekretion nach Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) festgestellt. Hierbei haben Träger des IL-6^{-597/-572/-174} Genotyps GGG/GGG eine signifikant niedrigere IL-6-Sekretion. Ziel dieser Arbeit war zum einen, ein optimiertes PCR-Protokoll zur IL-6^{-597/-572/-174} Genotypisierung zu entwickeln, welches die Untersuchung größerer Kohorten ermöglicht. Zum anderen sollte die funktionelle Relevanz der IL-6-Promotor-Polymorphismen an den Positionen -597, -572 und -174 näher charakterisiert werden.

Methoden: Die Grundlage des optimierten PCR-Protokolls bildete ein bereits veröffentlichtes Protokoll zur IL-6^{-597/-572/-174} Genotypisierung. Durch Veränderung der sequenzspezifischen Primer (SSP), der Zusammensetzung der Primermixe, des Cyclerprogramms und der Gelelektrophoresezeit wurde ein neues, optimiertes PCR-SSP-Protokoll etabliert. Die Validierung der neuen Methode erfolgte durch die erneute IL-6^{-597/-572/-174} Genotypisierung von 94 bereits genotypisierten DNS-Proben. Mithilfe der neuen Methode wurden 298 DNS-Proben von gesunden Blutspendern und 142 DNS-Proben von Hämodialysepatienten genotypisiert. Im Anschluss wurde, mittels eines ELISAs (Enzyme-linked immunosorbent assay), das Plasma der beiden Kohorten auf ihre IL-6-Konzentration hin untersucht. Zuletzt wurden 142 Vollblutproben der Hämodialysepatienten mit LPS stimuliert und ihre IL-6-Sekretion nach vier Stunden Inkubationszeit erneut mithilfe eines ELISAs gemessen.

Ergebnisse: Für die eindeutige IL-6^{-597/-572/-174} Genotypisierung benötigt man durch das optimierte PCR-SSP-Protokoll nur noch vier anstatt zwölf verschiedene Primermixreaktionen. Zusätzliche konnte der zeitliche Aufwand auf 68 Minuten gesenkt werden. Es werden die in der kaukasischen Bevölkerung am häufigsten vorkommenden IL-6^{-597/-572/-174} Haplotypen berücksichtigt, nämlich AGC, GGC, GGG und GCG. Die IL-6^{-597/-572/-174} Haplotyp- bzw. Genotypfrequenzen der gesunden Blutspender und der Hämodialysepatienten sind identisch mit den Frequenzen anderer Kohorten, die bereits mit dem ursprünglichen Protokoll untersucht wurden. Bei der Untersuchung der IL-6-Konzentration im Plasma, zeigten die Hämodialysepatienten signifikant erhöhte Werte im Vergleich zu den gesunden Blutspendern. Ein Einfluss des IL-6^{-597/-572/-174} Genotyps GGG/GGG konnte nicht festgestellt werden. Auch die Untersuchung der IL-6-Sekretion nach LPS-Stimulation in Hämodialysepatienten erbrachte keinen Zusammenhang zum IL-6^{-597/-572/-174} Genotyp. Allerdings zeigte ein Vergleich der Werte von gesunden Blutspendern und Hämodialysepatienten jeweils nach LPS-Stimulation eine konsequent eingeschränkte IL-6-Sekretion bei den Hämodialysepatienten.

Schlussfolgerungen: In der vorliegenden Arbeit wurde ein effizientes PCR-SSP-Protokoll etabliert, welches eine schnelle und einfache IL-6^{-597/-572/-174} Genotypisierung ermöglicht. Dabei gilt zu beachten,

dass dieses Protokoll vorerst nur in der kaukasischen Bevölkerung angewendet werden darf, da die IL-6^{-597/-572/-174}Haplotypenfrequenzen in anderen Ethnien bisher unbekannt sind. Vom neuen PCR-SSP-Protokoll abgedeckt werden dabei 99,9 % der in der kaukasischen Bevölkerung vorkommenden IL-6^{-597/-572/-174}Haplotypen. Ferner wurde das Protokoll in Bezug auf die benötigte Menge an DNS und die Gesamtlaufzeit der PCR-Testung optimiert. Durch die Untersuchung der IL-6-Konzentration im Plasma konnte weder bei gesunden Blutspendern noch bei Hämodialysepatienten ein direkter Einfluss des IL-6^{-597/-572/-174}Genotyps nachgewiesen werden. Zukünftig wären weitere funktionelle Studien zur Klärung dieser Frage notwendig. Auch bei der Untersuchung der mit LPS stimulierten Vollblutproben von Hämodialysepatienten konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem IL-6^{-597/-572/-174}Genotyp und der IL-6-Sekretion nachgewiesen werden. Die Arbeit zeigt jedoch, dass bei den Hämodialysepatienten eine allgemein eingeschränkte IL-6-Sekretion nachgewiesen werden konnte, die vermutlich auf eine erschöpfte Monozytentätigkeit zurückzuführen ist. Möglicherweise beeinflussen jedoch noch weitere Parameter wie z. B. Geschlecht, Alter, BMI (Body-Mass-Index), Ursache der Niereninsuffizienz, begleitende Erkrankungen und eingenommene Medikamente den von uns untersuchten Zusammenhang. Um diese Faktoren im Rahmen von Subanalysen mit einbeziehen zu können, wäre eine Vergrößerung der Kohorte notwendig. Des Weiteren sollten die neuesten Erkenntnisse über die veränderte Immunität während einer Hämodialysebehandlung mit einbezogen werden. Zur weiteren Klärung der funktionellen Relevanz des IL-6^{-597/-572/-174}Genotyps sollten zukünftig Nierentransplantierte untersucht werden.