

Aus der Klinik für Nephrologie und internistische Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Entwicklung von Biomarkern zum Monitoring nierentransplantierte
Patienten mittels Durchflusszytometrie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nina Görlich

aus Bonn

Datum der Promotion: 18.09.2020

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden am 21. Januar 2020 veröffentlicht in Scientific Reports: Kidney transplant monitoring by urinary flow cytometry: Biomarker combination of T cells, renal tubular epithelial cells, and podocalyxin-positive cells detects rejection (<https://doi.org/10.1038/s41598-020-57524-7>).

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Grundzüge der Nierentransplantation.....	1
1.2	Konventionelle Diagnostik der Transplantatfunktion.....	3
1.3	Nicht-invasive Biomarker für das Monitoring nierentransplantiertes Patient*innen	3
1.3.1	Biomarker im Blut.....	5
1.3.2	Biomarker im Urin	7
1.3.3	Kommentar zum aktuellen Forschungsstand.....	8
1.4	Analyse von Urinzellen als Fenster in die Niere	12
1.4.1	Immunzellen im Urin	12
1.4.2	Podozyten im Urin.....	13
1.5	Zwischenfazit.....	13
2	Zielsetzung.....	14
3	Materialien und Methoden.....	16
3.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	16
3.2	Geräte und Programme.....	17
3.3	Antikörper	18
3.4	Patient*innen	18
3.5	Etablierung der Methode	21
3.5.1	Zelllinien.....	21
3.5.2	Nierenfärbungen	22
3.6	Uringewinnung und Probenaufbereitung	22
3.6.1	Uringewinnung	22
3.6.2	Urinteststreifenuntersuchung	22
3.6.3	Zellisolation	22
3.6.4	Fluoreszenzmarkierung	23

3.6.5	Extrazelluläre Markierung	25
3.6.6	Messung mit dem Durchflusszytometer	25
3.7	Nierenbiopsien	27
3.7.1	Biopsieentnahme	27
3.7.2	Histopathologische Auswertung der Biopsien	28
3.8	Statistische Methoden	28
4	Ergebnisse	29
4.1	Etablierung einer Methode zum Nachweis von Podocalyxin-positiven Zellen als Surrogat für Podozyten im Urin mittels Durchflusszytometrie	29
4.2	Zellpopulationen unterscheiden sich in nierentransplantierten Patient*innen mit Abstoßungsreaktion	31
4.3	Korrelationen von Zellpopulationen im Urin mit histopathologischen Klassifikationskriterien	32
4.4	Einzelne Zellpopulationen trennen Patient*innen mit Abstoßungsreaktion nur bedingt voneinander	36
4.5	Erhöhter Quotient von CD4-positiven T-Zellen zu Podozyten bei Patient*innen mit Rejektion	37
4.6	Zellpopulationen im Urin bei frischtransplantierten Patient*innen zeigen keine eindeutigen Unterschiede für die Verlaufsbeurteilung	38
5	Diskussion	41
5.1	T-Zellen als Biomarker im Urin	41
5.2	Podozyten als Biomarker im Urin	43
5.3	Korrelation der Biomarker mit Biopsieergebnissen	45
5.4	Interpretation der Unterschiede der Gesamtzellzahlen in der Biopsiekohorte ..	45
5.5	Anwendung der Biomarker in der klinischen Praxis für Patient*innen mit Verdacht auf Rejektion	46
5.6	Biomarker zur Funktionsprognose und Verlaufsbeurteilung	47
5.7	Durchflusszytometrie von Urin als Monitoringmethode für nierentransplantierte Patient*innen	48

6	Literaturverzeichnis	51
7	Eidesstattliche Versicherung.....	60
8	Lebenslauf	62
9	Publikation	63
10	Danksagung.....	64

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Biomarker Übersicht	5
Abbildung 2: „Gating“-Strategie	27
Abbildung 3: Podozyten-Färbung	30
Abbildung 4: Zellpopulationen	32
Abbildung 5: Biopsiebilder und Durchflusszytometrie	33
Abbildung 6: Korrelationen	35
Abbildung 7: Einzelne Zellpopulationen im Vergleich	37
Abbildung 8: Quotient Biomarkerkombination.....	38
Abbildung 9: Verlaufsanalyse	40

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Studienlage Biomarker.....	10
Tabelle 2: Chemikalien / Verbrauchsmaterial	16
Tabelle 3: PBS-Rezept	17
Tabelle 4: Geräte / Programme	17
Tabelle 5: Antikörper	18
Tabelle 6: Patienten Biopsiekohorte	20
Tabelle 7: Patienten Frischtransplantiertenkohorte	21

Abstract

Creatinine and proteinuria are used to monitor kidney transplant patients. However, renal biopsies are needed to discriminate pathologies and diagnose renal graft rejection. In this study, we assessed whether the quantification of urinary immune cells and podocalyxin-positive (PDX-positive) cells would allow non-invasive detection of allograft rejection and outcome predictions in newly transplanted patients.

Urinary cell numbers of CD4⁺ T cells, monocytes/macrophages, and PDX-positive cells were determined using flow cytometry and were compared to renal biopsy results and outcomes after transplantation. A total of 94 renal transplant patients were analyzed, consisting of patients with biopsy-proven T cell-mediated rejection (TCMR), antibody-mediated rejection (ABMR), patients whose biopsies showed deteriorating graft function without rejection (No RX), a control group of stable transplant patients (Ctrl) and a group of newly transplanted patients.

Patients with transplant rejection had higher amounts of urinary T cells than Ctrl patients; however, patients who showed worsening graft function without rejection had similar numbers of T cells. Urinary macrophages correlated with the histological levels of interstitial inflammation ($p = 0.0004$, $r = 0.6978$) and tubulitis ($p = 0.0088$, $r = 0.5562$). Combining the amount of urinary T cells and PDX⁺ cells, yielded a significant segregation of patients with rejection (TCMR and ABMR) from patients in the No RX group (all $p < 0.05$, and area under the curve (AUC 0.83). There was no meaningful significant segregation in newly transplanted patients regarding the analyzed urinary cell population.

Urinary cell populations analyzed by flow cytometry have the potential to establish new monitoring methods for kidney transplant patients. The combination of urinary T cells and PDX-positive cells may allow non-invasive detection of transplant rejection.

Zusammenfassung

Bei nierentransplantierten Patient*innen wird die Transplantatfunktion aktuell durch Proteinurie und Serum-Kreatinin-Bestimmungen überwacht. Bei Verdacht auf eine Abstoßungsreaktion wird eine Nierenbiopsie durchgeführt, um die entsprechende Diagnose und weitere Pathologien feststellen zu können. Zur Entwicklung neuer, nicht-invasiver Monitoringmethoden für die Betreuung nierentransplantierte Patient*innen wurden in dieser Arbeit Immunkzellen und Podocalyxin(PDX)-positive Zellen im Urin analysiert.

CD4⁺-positive T-Zellen, Monozyten/Makrophagen und PDX-positive Zellen im Urin wurden mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Zellpopulationen wurden anschließend mit Biopsieergebnissen und Transplantatverläufen verglichen. Der Urin von 94 nierentransplantierten Patient*innen wurde in dieser Arbeit analysiert. Die Patientengruppen setzten sich aus einer Querschnitts-Biopsie-Kohorte, einer Längsschnitt-Studienkohorte an frischtransplantierten Patient*innen und einer Kontrollgruppe zusammen. Biopsiepatient*innen wurden in Patient*innen mit T-Zell-vermittelter Abstoßung (T cell-mediated rejection, TCMR), antikörpervermittelter Abstoßung (antibody-mediated rejection, ABMR) und Patient*innen ohne Hinweise auf Rejektion in der Biopsie (No rejection, No RX) eingeteilt.

Patient*innen mit TCMR zeigten mehr T-Zellen im Urin als Patient*innen der Kontrollgruppe. Patient*innen mit Biopsie, jedoch ohne Rejektion in der histologischen Beurteilung, zeigten jedoch ähnlich viele T-Zellen. Makrophagen im Urin korrelierten mit der histologischen Beurteilung der interstitiellen Inflammation ($p = 0.0004$, $r = 0.6978$) und Tubulitis ($p = 0.0088$, $r = 0.5562$). Anhand der Kombination aus CD4⁺-T-Zellen und PDX-positiven-Zellen konnten Patient*innen mit Rejektion (TCMR und ABMR) von Patient*innen ohne Abstoßung deutlich voneinander getrennt werden (alle $p < 0.05$, Area under the curve (AUC) 0.83). Prognosen bezüglich des Verlaufs konnten anhand der Analyse von Urinzellen nicht sicher getroffen werden.

Die Analyse von Urinzellen mittels Durchflusszytometrie hat Potential, das Monitoring von nierentransplantierten Patient*innen zu optimieren. Der Quotient aus T-Zellen und PDX-positiven Zellen könnte zur Diagnose von Transplantatabstoßungen genutzt werden.

1 Einleitung

1.1 Grundzüge der Nierentransplantation

Die Nierentransplantation ist die Therapie der Wahl bei Patient*innen mit terminaler Niereninsuffizienz. Das Überleben und die Lebensqualität von transplantierten Patient*innen sind im Vergleich zu Patient*innen mit Dialysetherapie überlegen.¹⁻³

Terminale Niereninsuffizienz kann durch akute und chronische Niereninsuffizienz entstehen. Chronische Niereninsuffizienz wird definiert als eine länger als drei Monate bestehende Schädigung der Nierenstruktur oder Nierenfunktion mit Auswirkung auf die Gesundheit des/der Patient*in. Grenzwerte hierfür sind eine glomeruläre Filtrationsrate (GFR) von <60 ml/min pro $1,73\text{m}^2$ und eine Albumin-Kreatinin-Ratio im Urin von ≥ 30 mg/g.⁴ Akute Niereninsuffizienz ist definiert als (i) ein Serum-Kreatinin-Anstieg von $\geq 0,3$ mg/dl innerhalb von 48 Stunden, (ii) ein Anstieg des Kreatinins um größer/gleich 1,5-mal des Baseline-Kreatinins, oder (iii) eine Urinproduktion von weniger als $0,5$ /ml/kg/KG über einen Zeitraum von mindestens sechs Stunden.⁵ Von terminaler Niereninsuffizienz kann gesprochen werden, wenn die chronische Niereninsuffizienz, also die Einschränkung der Nierenstruktur oder -funktion, länger als drei Monate in Stadium 5 andauert, d.h. die GFR < 15 ml/min $1,73\text{m}^2$ entspricht; allerdings ist die GFR hier nur als Surrogat zu betrachten und die individuelle Patientensituation und Symptomatik muss in die Diagnose „terminale Niereninsuffizienz“ miteinbezogen werden.⁶

Die Erkrankungen, die zur terminalen Niereninsuffizienz führen können, sind vielfältig. Prinzipiell lassen sich diese in folgende Kategorien einteilen: prärenal, intrarenal und postrenal. Prärenales Nierenversagen liegt vor, wenn die Niere durch renale Minderperfusion Schaden leidet. Beispiele sind eine beeinträchtigte Blutzufuhr durch eine Verteilungsstörung oder Volumenverluste durch große Operationen. Intrarenale Erkrankungen sind vielseitig und können jede Komponente der Niere betreffen. Als postrenale Ursache wird das Vorliegen einer Urinabflusshinderung bezeichnet, die durch Urinrückstau die Niere schädigt.

In der Datenlage des Reports von 2016 der ERA-ETDA, einer Gemeinschaft aus 36 Ländern, wird die diabetische Nephropathie (Typ I und Typ II Diabetes) als Hauptursache für terminale Niereninsuffizienz beschrieben. Gefolgt von Nephrosklerose durch

Hypertension und primäre und sekundäre Glomerulonephritiden zählen diese Erkrankungen zu den häufigsten Gründen einer Niereninsuffizienz.⁷

Wenn der Zeitpunkt gekommen ist, an dem der/die Patient*in in naher Zukunft eine Nierenersatztherapie benötigt, bestehen folgende Optionen: Hämodialyse, Peritonealdialyse und die präemptive Nierentransplantation (im Falle eines/einer vorhandenen Lebendspender*in). Mit Einleiten der Dialysetherapie kann der/die Patient*in für eine Nierentransplantation durch eine Leichenspende gelistet werden.

Die aktuelle Datenlage zeigt, dass insbesondere bei jüngeren Patient*innen im Alter von 0 bis 64 Jahren die Nierentransplantation in europäischen Ländern die Haupttherapiemodalität bei terminaler Niereninsuffizienz ist.⁷ Die meisten Nierentransplantationen finden in Spanien statt und die Analysen zeigen, dass die Überlebenswahrscheinlichkeit bei Nierentransplantierten weitaus höher liegt als bei Dialysepatient*innen.⁷ Es zeigte sich außerdem in Studien, dass eine Lebendnierenspende den Vorteil besitzt, dass der Zeitpunkt der Transplantation planbar ist und sich somit eine Dialyse vor der Transplantation vermeiden lässt, wodurch das Transplantatüberleben erhöht wird.⁸

Damit das Transplantat vom/von der Empfänger*in angenommen bzw. nicht abgestoßen wird, muss stets eine immunsuppressive Therapie eingeleitet werden. Zum Standard gehört hier zum aktuellen Zeitpunkt ein Schema aus drei Immunsuppressiva, bestehen aus einem Calcineurin-Inhibitor, Mycophenolat Mofetil und Glukokortikoiden.⁹

Wie bei jeder Therapiemaßnahme geht die Nierentransplantation auch mit Risiken und der Möglichkeit eines Therapieversagens einher. Die am meisten gefürchtete Komplikation ist hierbei eine Abstoßungsreaktion, da diese im schlimmsten Falle zum chronischen Transplantatversagen bis hin zum Verlust des Transplantats führt.¹⁰⁻¹²

Die Abstoßungsreaktionen eines Nierentransplantats lassen sich in Kategorien einordnen. Es gibt die Einteilung nach zeitlichen Komponenten, definiert als akute versus chronische Abstoßung, und die Einteilung nach Ursache der Abstoßung. Als Ursache wird zwischen T-Zell-vermittelter und antikörpervermittelter Abstoßung unterschieden. Bei der T-Zell-vermittelten Abstoßung kommt es durch lymphozytäre Migration zur Tubulitis, Infiltraten im Interstitium und teilweise in der Intima der Arterien. Selbst wenn es in der histologischen Diagnosestellung zu fehlerhaften Diagnosen kommt, kann sich die Involvierung der T-Zellen bei dieser Art von Rejektion auf molekularer Ebene

nachweisen lassen.¹³ Die antikörpervermittelte Abstoßung zeichnet sich durch mikrovaskuläre Schädigung, zirkulierende Donor-spezifische Antikörper und antikörpervermittelte Prozesse, wie zum Beispiel C4d-Ablagerungen, aus.¹⁴ Im Ergebnis kommt es bei beiden Rejektionsmechanismen durch das Inflammationsgeschehen zur Schädigung von Nierenstrukturen, sodass die Transplantatfunktion beeinträchtigt wird und es zur Verschlechterung der Prognose für das Transplantatüberleben kommt.¹⁰

1.2 Konventionelle Diagnostik der Transplantatfunktion

In der aktuellen klinischen Routine wird die Transplantatfunktion über das Serum-Kreatinin und die Proteinurie überwacht. Kreatininwerte werden genutzt, um die glomeruläre Filtrationsrate zu berechnen, und ein Anstieg des Serum-Kreatinins wird in den Leitlinien als Hinweis auf eine mögliche Abstoßungsreaktion beurteilt.¹⁵ Kreatinin erweist sich jedoch nur als mittelmäßig guter Biomarker. Es wird von der Niere nicht nur frei filtriert, sondern auch aktiv sekretiert. Da Kreatinin ein Muskelabbauprodukt ist, wird der Serum-Wert durch Muskelauf- bzw. -abbau und Ernährung beeinflusst.¹⁶ Die Nierenbiopsie ist laut Leitlinie Goldstandard für die Diagnostik eines Transplantatversagens im Sinne eines Serum-Kreatinin-Anstieges von $\geq 0,3$ mg/dl innerhalb von 48 Stunden, eines Anstieges des Kreatinins um größer/gleich 1,5-mal des Baseline-Kreatinins oder einer Urinproduktion von weniger als 0,5 /ml/kg/KG innerhalb von sechs Stunden nach Ausschluss anderer, offensichtlicher Ursachen.¹⁵ Mit Hilfe der Biopsie lässt sich die Pathologie in der Niere betrachten, eine potenziell behandelbare Ursache wird möglicherweise erkannt und die Art und Schwere der Transplantatschädigung kann beurteilt werden. Sie ist allerdings immer ein invasiver Eingriff, der mit einem Blutungsrisiko und einer Schädigung des Transplantats, im schlimmsten Falle bis zum Verlust des Nierentransplantats, einhergeht.¹⁷ Aus diesem Grunde sollten vor dieser invasiven Maßnahme immer Dehydrierung, Urinobstruktion, hoch-toxische Calcineurininhibitorpiegel und andere, nicht-invasiv-ausschließbare Ursachen ausgeschlossen werden.

1.3 Nicht-invasive Biomarker für das Monitoring nierentransplantierte Patient*innen

Die konventionellen Monitoringmethoden zur Überwachung der Transplantatfunktion gehen mit den beschriebenen Risiken der Biopsie und der Beeinflussung des

Kreatininwertes durch mannigfaltige Faktoren einher, was die Sensitivität und Spezifität dieses Messparameters schwächen. Des Weiteren steigt das im Serum messbare Kreatinin erst nach ausgeprägter Nierenschädigung an. Dementsprechend gibt es großen Bedarf an der Entwicklung von weniger invasiven, sensitiven Biomarkern für die Diagnostik einer Rejektion und das Monitoring nierentransplantierte Patient*innen. Erstrebenswert sind hierfür Marker, welche mit einem Rejektionsereignis korrelieren, im optimalen Falle sogar prädiktiven Wert haben und die Entscheidung zur Therapie leiten können.¹⁸ Im besten Falle könnte man also anhand neuer Biomarker ein drohendes Rejektionsereignis erkennen und präventiv therapeutisch entgegenwirken und/oder Patient*innen anhand von Risikomeerkmalen stratifizieren und die immunsuppressive Therapie entsprechend anpassen.

Ein Biomarker für eine Rejektion wäre also ein Charakteristikum, welches objektiv und reproduzierbar gemessen und ausgewertet wird und als Indikator für einen Rejektion und verschiedene Arten innerhalb eines Rejektionsprozesses gilt.¹⁹ Ein Biomarker sollte darüber hinaus schnell und einfach zu messen, akkurat, nicht-invasiv zu erlangen und ökonomisch einsetzbar sein. Die Sensitivität und Spezifität sollen möglichst hoch sein und die diagnostische Area Under the Curve (AUC) sollte gegen 1,0 streben.^{18,20}

Inzwischen sind einige Ansätze zur Etablierung von neuen Biomarkern für das Transplantatmonitoring verfolgt worden. Die diskutierten Marker lassen sich in verschiedene Kategorien einordnen. Im Folgenden werden die Forschungsergebnisse nach „Biomarker im Blut“ und „Biomarker im Urin“ klassifiziert. Untergruppen bildet das jeweils untersuchte Material: mRNA, Proteine, microRNA, zellfreie DNA (cfDNA) und die Genexpression von Zellpopulationen. Eine Übersicht bietet Abbildung 1. Es folgt nun eine Literaturübersicht der aktuellen Biomarker im Bereich der Nierentransplantation mit besonderem Fokus auf die Detektion einer Transplantatabstoßung.

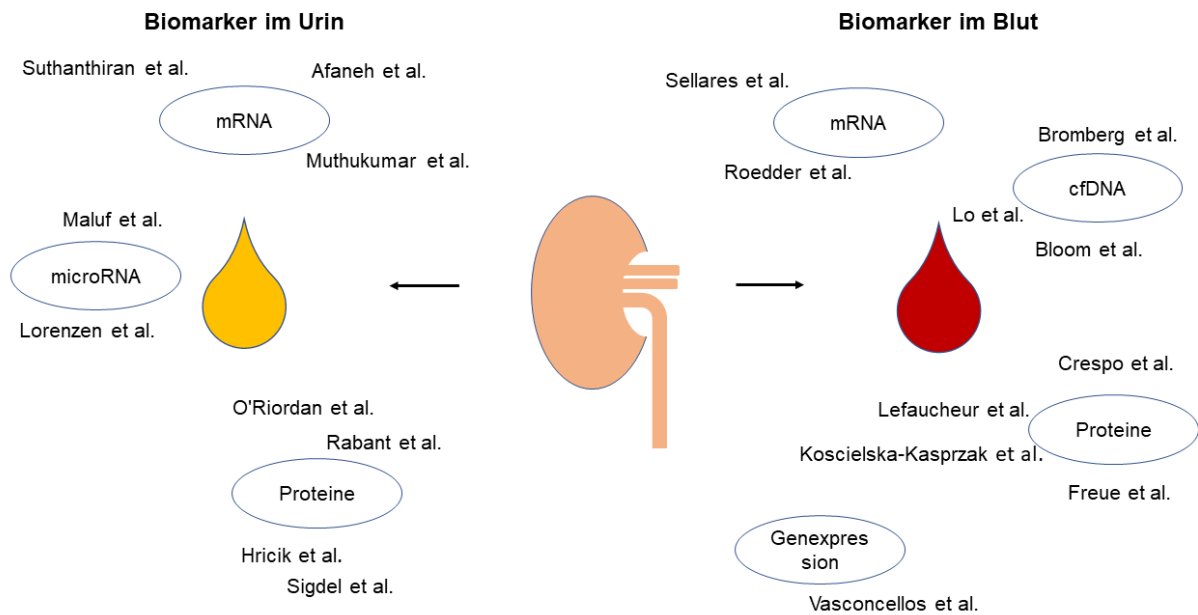


Abbildung 1: Biomarker Übersicht

Übersicht über nicht-invasive Biomarker und zugeordnete Autor*innen entsprechend des aktuellen Forschungsstandes für das Monitoring nierentransplantierte Patient*innen. mRNA, messenger RNA; cfDNA, cell free DNA.

1.3.1 Biomarker im Blut

Einige Untersuchungen wurden bereits unternommen, Blut als Medium für die Biomarkersuche zu nutzen. Blut als Probenmaterial lässt sich wenig invasiv erlangen und die Techniken und angewandten Methoden sind bereits etabliert für Blutuntersuchungen.

Der Analyse von mRNA im Blut liegt die Hypothese zu Grunde, dass es im Falle einer Rejektionsreaktion zur vermehrten Proteinbiosynthese kommt, wobei zunehmend mRNA produziert wird, welche sich von der mRNA in Patient*innen ohne Abstoßung unterscheidet und dieser Unterschied im Blut analysierbar ist. Diese „Transkriptomanalyse“ zeigte bereits vielversprechende Ergebnisse. Durch Microarray wurden mRNA, welche mit Endothelzellen, NK-Zellen und T-Zellen assoziiert sind, analysiert und zeigten als Marker für eine antikörpervermittelte Rejektion (antibody-mediated rejection, ABMR) eine AUC von 0.89.²¹ Mithilfe eines 17-Gen-Sets, bekannt als kSORT (Kidney solid Organ Response Test), erreichten *Roedder et al.* eine vielversprechende Separation von Patient*innen mit akuter Rejektion von Patient*innen ohne Abstoßung (AUC 0.94).²²

Eine weitere Herangehensweise an die Suche nach neuen Biomarkern ist die Analyse von spenderspezifischer zellfreier DNA (cell-free DNA, cfDNA). Durch Zellschädigung im Rahmen einer Inflammation wird die sich im physiologischen Zustand intrazellulär befindende DNA freigesetzt und kann im peripheren Blut untersucht werden. *Lo et al.* wiesen als Erste spenderspezifische DNA im Plasma nierentransplantierter Patient*innen nach und legten so den Grundstein für die aktuellen Untersuchungen.²³ In neuesten Studien konnte mittels Next Generation Sequencing (NGS) cfDNA nachgewiesen und hierdurch eine aktive Rejektion erfolgreich in Patient*innen festgestellt werden (AUC 0.74). Die Variabilität von spenderspezifischer cfDNA in Patient*innen mit stabiler Transplantatfunktion konnte dabei mit einem Grenzwert von 1.2% bestimmt werden.^{24,25} Für zukünftige Untersuchungen wurde somit ein weiterer Grundstein gelegt.

Die Analyse von Proteinen im Blut nierentransplantierter Patient*innen stellt ebenfalls ein breites Feld der Biomarkerforschung dar. Durch eine Plasmaprotein-Signatur aus 18 Proteinen konnte eine Rejektion festgestellt werden, wobei sich vier Proteine als Marker herauskristallisierten (coagulation factor IX precursor [F9], sex hormone-binding globulin [SHBG], complement factor D [CFD] and lecithin–cholesterol acyltransferase [LCAT]).²⁶ Quantifiziert wurden die Plasmaproteine mit iTRAQ (isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation) und die Ergebnisse wurden durch ELISA validiert. INF- γ ELISPOT misst spezifisch die INF- γ -Sekretion von Empfänger-T-Zellen auf Spenderantigene.²⁷ INF- γ ELISPOT scheint einen höheren prädiktiven Wert zu haben als die im klinischen Alltag teilweise bestimmten Panel-reaktiven Antikörper (PRA).²⁸ In einer prospektiven Studie zur Prädiktion einer Rejektion wurden Blutproben nach drei und sechs Monaten analysiert und der prädiktive Wert der Quantifizierung von INF- γ -Spiegeln zur Diagnostik einer T-Zell-vermittelten Abstoßung (T cell-mediated Rejection, TCMR) untersucht. Die AUC in der Validierungskohorte (n=101) zum prädiktiven Wert des INF- γ ELISPOT zur Diagnostik einer TCMR war 0.725.²⁹ Zur Diagnostik einer ABMR fokussieren sich aktuelle Analysen unter anderem auch auf die Untersuchung von IgG-Subklassen zirkulierender anti-human-HLA-Antikörper. IgG3-Antikörper korrelierten mit einer ABMR, IgG4 ließen sich vermehrt in Patient*innen mit subklinischer oder chronischer ABMR feststellen und erscheinen somit als potenzielle Biomarker für die Diagnostik einer ABMR.³⁰

Die Genexpression von Perforin, Granzym und Fas Ligand in zirkulierenden Lymphozyten in nierentransplantierten Patient*innen zeigte eine Hochregulation der Expression und eine Hochregulation von zwei dieser Marker zeigte einen positiv

prädiktiven Wert von 100% und negativ prädiktiven Wert von 95% für die Diagnose einer akuten Rejektion.³¹

1.3.2 Biomarker im Urin

Die Urinanalyse bietet ein weiteres breites Feld der Biomarkerforschung im Bereich der Nierentransplantation und stellt zudem die einzige noninvasive Technik dar. Die Analysen lassen sich grob einordnen als Untersuchungen von mRNA, microRNA und urinären Proteinen.

In einer multizentrischen Studie wurden unter anderem die mRNA von CD3 ϵ , Perforin, Granzym B, Proteinase-inhibitor-9, CD103 und CXCR3 in 4300 Urinproben untersucht. Durch diese molekulare Signatur konnte eine TCMR vorhergesagt und diagnostiziert werden (AUC 0.85, Validierungsstudie AUC 0.74).³² Die Quantifizierung von ebenfalls T-Zell-assoziiierter mRNA von OX40, OX40L, PD-1, PD-L1, PD-L2 und Foxp3 ergab normalisiert zu 18S rRNA eine starke Vorhersagewahrscheinlichkeit für eine akute Rejektion (AUC 0.98 für die Kombination der Marker).³³ In der Gruppe der Patient*innen mit akuter Rejektion konnte anhand der Marker zusätzlich das Outcome nach Rejektion prognostiziert werden. *Muthukumar et al.* untersuchten die mRNA von Foxp3, CD25, CD3 ϵ , Perforin und 18s rRNA und fanden heraus, dass Kopien von Foxp3-mRNA im Urin (normalisiert zu 18S rRNA) als Prädiktor für das Outcome nach einer Rejektionsepisode infrage kommen (Foxp3: Sensitivität 90%, Spezifität 73%).³⁴

Die Untersuchung von microRNA (miR) mittels qPCR im Urin stellt eine neue innovative Methode zur Biomarkersuche dar. miR-142-3p, miR-204, miR-211 und weitere miR konnten schon als Marker für Transplantatdysfunktion und zum Monitoring untersucht werden.³⁵ Des Weiteren erscheinen unter anderem die Hoch- bzw. Runterregulation von miR-210, miR-10a und miR-10b als Biomarker für aktive Rejektion in Frage zu kommen (AUC 0.7 für miR-210) und Messungen von miR-210 im Urin gaben Hinweise auf den Transplantatfunktionsverlust nach einem Jahr.³⁶

O'Riordan et al. untersuchten urinäre Proteine mittels SELDI-TOF MS (Surface-enhanced laser desorption/ionization- Time-of-flight mass spectrometer) und beschrieben, dass die Proteine Beta-Defensin-1 und Alpha-1-antichymotrypsin (beide assoziiert mit neutrophilen Granulozyten) als Biomarker für akute Rejektion Potential haben (AUC 0.749 für Beta-Defensin-1, Ratio 0.912).³⁷ Weitere Untersuchungen beschreiben in einer

multizentrischen prospektiven Studie höhere CXCL9 Werte im Urin bei nierentransplantierten Patient*innen mit Rejektion, bereits 30 Tage vor der Nierenbiopsie.³⁸ Negative Werte konnten demnach herangezogen werden und eine aktive Rejektion ausschließen und wiesen auf das Ausbleiben einer Rejektion in den zukünftigen 6-24 Monaten hin. Die Chemokine CXCL9 und CXCL10 wurden in einer weiteren Studie im Urin analysiert und CXCL10 konnte als Prädiktor für TCMR (AUC 0.86) und für ABMR (AUC 0.7) angewendet werden.³⁹ Der CXCL10-Spiegel konnten ebenfalls bei noch stabilen Nierenfunktionsparametern eine aktive Rejektion vorhersagen (AUC 0.72 einen Monat nach Transplantation für eine Rejektion innerhalb 400 Tage nach Transplantation).⁴⁰ *Sigdel et al.* untersuchten 1.446 Proteine und entdeckten hierbei rejektionsspezifische Proteine. Als Biomarker für akute Rejektion zeigten CD44 (AUC 0.97), Proteinase-Inhibitor-Faktor 1 (Serin/Cystein) (AUC 0.93) und Tamm-Horsfall protein (0.84) Potential.⁴¹

1.3.3 Kommentar zum aktuellen Forschungsstand

Die Suche nach optimalen, nicht-invasiven Biomarkern im Feld der Nierentransplantation ist ein wachsender Forschungsbereich. Die hier beschriebenen Marker zeichnen sich dadurch aus, dass sie bei einer Rejektion erhöht sind. Allerdings sind viele der Marker mit allgemeinen Inflammationsprozessen assoziiert, wodurch eine Unterscheidung von Inflammation aufgrund einer Rejektion und Inflammation aufgrund anderer Ursachen (Wiederauftreten der Grunderkrankungen, pharmakologisch-toxische Effekte, virale Infektionen) oftmals nicht gelingt. Zudem weisen erhöhte Werte eher auf ein akutes Geschehen hin, chronische Abstoßungsreaktionen sind hierdurch aber erschwert oder überhaupt nicht zu detektieren.

Ein weiteres Problem stellt die Gegenüberstellung eines jeden innovativen Markers zu den aktuell in der Klinik angewendeten Monitoringmethoden dar. Wie oben beschrieben, ist die Sensitivität und Spezifität des Kreatininwertes nach aktuellen Standards nicht als befriedigend anzusehen. Die glomeruläre Filtrationsrate, welche ebenfalls oft behelfsweise herangezogen wird, ist ein errechneter Wert, welcher letzten Endes oft auf dem gemessenen Kreatininwert beruht und von einer Konstanz ausgeht, welche gerade im Inflammationsprozess nicht vorhanden ist. Die Beurteilung und die Diagnose durch die Nierenbiopsie sind im Endeffekt ein subjektives Diagnostikum, da das Ergebnis von der Expertise des Betrachters abhängt. Das aktuelle Problem in der Biomarkerforschung

stellt sich nun so dar, dass die neuen Biomarker im Vergleich zu suboptimalen Standardmethoden, oftmals dem Kreatininwert, gesetzt werden. Im Vergleich würde also der perfekte Biomarker schlecht abschneiden und verworfen werden, da er von den Ergebnissen der Standardmethoden abweicht. Dies sollte bei Betrachtung der aktuellen Ergebnisse immer bedacht werden.

Eine weitere Herausforderung ist der Wunsch, die Rejektion feststellen zu können, bevor eine Schädigung des Transplantates stattgefunden hat. Diesen Gedanken verfolgend müsste eine Abstoßung sich also im Immunsystem als spezifische Konstellation darstellen, in einer unbekanntem Zeitspanne vor Nierenschädigung. Die Daten, welche zur Inflammationsreaktion einer Abstoßung vorliegen, sind in diesem Sinne aber retrospektiv, das heißt, die Reaktion kann erst untersucht werden, wenn sie stattgefunden hat und somit schon eine Nierenschädigung vorliegt. Insbesondere die Biomarker, welche cfDNA enthalten, wären daher nur mittelmäßig bzw. in dieser Herangehensweise nicht einsetzbar.

Die Fülle der oben beschriebenen Marker lässt auch rückschließen, dass es sich bei einer Rejektion um einen komplexen, nicht vollständig verstandenen Vorgang handelt. Letztlich wird daher realistischerweise eine Biomarkerkombination infrage kommen, da ein eindimensionaler Marker kaum die Komplexität der Prozesse widerspiegeln kann.

Für die Marker lässt sich ebenfalls zusammenfassen, dass Validierungsstudien mit entsprechend großer Studienkohorte durchgeführt werden müssen.

Bis zum aktuellen Zeitpunkt lässt sich daher kein befriedigender Biomarker finden, welcher bereits in nächster Zeit die konventionelle Diagnostik ablösen könnte.

Tabelle 1: Studienlage Biomarker

Übersicht über die aktuelle Studienlage zur Forschung nicht-invasiver Biomarker für das Monitoring nierentransplanteder Patient*innen. N= Patientenzahl, Größe = Probenanzahl. mRNA, messenger RNA; dd-cfDNA, donor-derived cell free DNA; ABMR, antibody-mediated rejection; TCMR, T cell-mediated rejection; AR, akute Rejection.

Autor	Biomarker	Biologische Assoziation	n	Größe	Material	Methode	Rejektionsart	AUC	Sensitivität %	Spezifität %	PPV %	NPV %
Bloom et al.	dd-cfDNA	Zellerstörung, unspezifisch	n=102	n=107	Blut	cfDNA-Analyse mittels NGS	Aktive Rejektion	0.74	59	85	61	84
Roedder et al.	kSORT	17 Gene, assoz. mit akuter RX, Monozyten, Endothelzellen, T-Zellen	n=436	n=558	Blut	mRNA-Analyse mittels qPCR	AR	0.94	0.83	90.6	93.2	
Freue et al.	Multiple Plasmaproteine (1446)	unspezifisch	n=32		Blut	Proteinquantifizierung mittels iTRAQ	AR	0.89	80	80		
Crespo et al.	Spenderspezifisches INF-γ	T-Zellen	n=60, prospektive Validierungsstudie		Blut	INF-γ-Analyse mittels ELISPOT	TCMR	0.8 / Validierungsstudie: 0.725	81.8 / 80	87.8 / 64		
Vasconcellos et al.	Perforin Granzym Fas Ligand	T-Zellen, NK-Zellen T-Zellen, NK-Zellen T-Zellen	n=25	n=31	Blut	Genanalyse zytotoxischer Leukozyten mittels qPCR	AR				100	95
Bromberg et al.	dd-cfDNA	Zellerstörung, unspezifisch	n=93	n=380	Blut	cfDNA-Analyse mittels NGS	Biologische Variabilität in stabilen Transplantaten	Ergebnis: dd-cfDNA >1.2% als Grenzwert				
Lefaucheur et al.	IgG-Subklassen zirkulierender anti-human-HLA-Ak	B-Zellen	n=125		Blut	HLA-Typisierung mittels PCR, Single-Ag-Flow-Beads	ABMR		Kombination IgG3 u. IgG4: 67.8	100	100	57.6
Sellares et al.	mRNA	Endothelzellen, NK-Zellen, T-Zellen	n=315	n=403	Blut	Microarray Analyse	ABMR	0.89	67	90	64	91
Lo et al.	dd-cfDNA	Zellerstörung, unspezifisch	n=28		Blut	cfDNA-Analyse mittels PCR	Nachweis von spenderspez. cfDNA	spenderspez. cfDNA kann nachgewiesen werden				
Koscielska-Kasprzak et al.	INF-γ-Sekretion	T-Zellen	n=53		Blut	INF-γ-Analyse mittels ELISPOT	progn. Risiko für AR	1.5 erhöhung Spot Nr. 2, 7-fache erhöhung Spot Intensity progn. AR				

Autor	Biomarker	Biologische Assoziation	n	Größe	Material	Methode	Rejektionsart	AUC	Sensitivität % Validierungsstudie 71	Spezifität % Validierungsstudie 72	PPV %	NPV %
Suthanthiran et al.	CD3ε	T-Zellen	n=485	n=4300	Urin	mRNA-Analyse mittels qPCR	Akute TCMR	0.85	85.2	80.7	67.6	92
	Perforin	T-Zellen, NK-Zellen										
	Granzym B	T-Zellen, NK-Zellen										
	proteinase-inhibitor-9	T-Zellen, NK-Zellen										
	CD103	T-Zellen						0.74				
	CXCR3	Monozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, T-Zellen, NK-Zellen										
Hricik et al.	CXCL9	T-Zellen	n=255		Urin	Proteinanalyse ELISA	Banff ≥ 1 AR	0.86	85.2	80.7	67.6	92
Rabant et al.	CXCL10	T-Zellen	n=247	n=290	Urin	Proteinanalyse ELISA	TCMR	0.86	80	87	23.5	98.9
Rabant et al.	CXCL10	T-Zellen	n=247	n=290	Urin	Proteinanalyse ELISA	ABMR	0.7	73	61.6	25.7	92.6
Rabant et al.	CXCL10	T-Zellen	n=247	n=290	Urin	Proteinanalyse ELISA	Gemischte Rejektion	0.8	74.2	83.3	40.4	95.5
Sigdel et al.	Multiple urinare Proteine (1446)	unspezifisch	n=40 (pädiatrisch)	n=52	Urin	Proteinanalyse mittels LC-MS/MS und ELISA	AR	0.97 für CD44 0.93 für SERPINF1 0.84 für THP				
Muthukumar et al.	Foxp3	T-Zellen	n=36		Urin	RNA-Analyse mittels qPCR	AR		Foxp3 als Prädiktor für das Outcome nach AR : 90	73		92
	CD25	T-Zellen										
	CD3ε	T-Zellen										
	Perforin	T-Zellen, NK-Zellen										
	18s rRNA	unspezifisch										
	OX40	T-Zellen	n=21	n=21	Urin	mRNA-Analyse mittels qPCR	AR	0.98	95	92		
	OX40L											
	PD-1											
	PD-L1											
	PD-L2											
Lorenzen et al.	Foxp3											
	microRNA-210	unbekannte Funktion im Urin	n=62		Urin	microRNA-Analyse mittels qPCR	AR	0.7 für miR-210	74	52		
O'Riordan et al.	microRNA-10a											
	microRNA-10b u. a.	Neutrophile Granulozyten	n=73		Urin	SELDI-TOF MS	AR	0.749 für Beta-Defensin-1				
	Beta-Defensin-1											
Maluf et al.	Alpha-1-antichymotrypsin											
	miR-99a	Inflammation	n=125	n=191	Urin	GeneChip miRNA Array	chronische Transplantatdysfunktion	signifikante Unterschiede in der Expression	p<0.05			
	miR-140-3p											
	miR-200b											
	miR-142-3p und weitere											

1.4 Analyse von Urinzellen als Fenster in die Niere

Im Urin als nicht-invasiv zu erlangendes Untersuchungsmaterial bietet sich die Möglichkeit, ausgeschiedene Zellen zu analysieren und durch Zellpopulationen auf Veränderungen in der Niere und mögliche Diagnosen Rückschlüsse zu ziehen. Verschiedene Zellarten werden mit dem Urin bei unterschiedlichen Pathologien ausgeschieden. Die Urin-Teststreifenmethode und die Mikroskopie des Harnsediments gehören seit Langem zu einfachen, schnellen Diagnostikmethoden in der Klinik, um Zellen im Urin zu analysieren und hierdurch Rückschlüsse auf Erkrankungen und Pathologien in der Niere zu ziehen. Hauptsächlich werden hierbei Leukozyten und Erythrozyten analysiert, aber auch Epithelzellen lassen sich im Phasenkontrastmikroskop bei der Standarduntersuchung des Urinsediments erkennen. Zellen des Urins wurden bisher weitgehend nur experimentell mittels Durchflusszytometrie analysiert.

1.4.1 Immunzellen im Urin

Schon 1992 untersuchten *Lee et al.* Urinzellen durch Durchflusszytometrie bei nierentransplantierten Patient*innen und erstellten ein Zytogramm, in dem Leukozyten und tubuläre Epithelzellen des Urins im Streulicht-Diagramm dargestellt wurden, und beschrieben diese Methode mit Potential zum Monitoring nierentransplantierte Patient*innen.⁴² Die durchflusszytometrische Analyse von T-Zellen im Urin wurde bereits als hervorragender Marker für intrarenale Inflammation bei Lupusnephritis beschrieben.^{43,44} Es konnte durch *Nanni-Costa et al.* gezeigt werden, dass nierentransplantierte Patient*innen mit akut zellulärer Abstoßung des Transplantats vermehrt Lymphozyten bei durchflusszytometrischer Untersuchung des Urinsediments zeigen, während bei stabiler Transplantatfunktion nur eine geringe Menge an Zellen im Urin zu finden war.⁴⁵ Die vorhandenen Lymphozytenpopulationen konnten anhand ihrer Oberflächenmarker noch weiter differenziert werden. Neutrophile Granulozyten konnten in der beschriebenen Studie außerdem bei bakterieller Infektion nachgewiesen werden.⁴⁵ Weitere Studien zeigten ebenfalls, dass Urinzellen mit Durchflusszytometrie analysiert werden können und dass einerseits ein erhöhter Nachweis an T-Zellen im Urin mit einer Abstoßungsreaktion korreliert, dass andererseits Leukozyten im Urin einen prädiktiven Wert für eine akute Rejektion haben, und somit die Methode als Monitoring von nierentransplantierten Patient*innen hohes Potential zeigt.^{46,47}

1.4.2 Podozyten im Urin

In glomerulären Erkrankungen der Niere kommt es zur Ablösung und zum Verlust von Podozyten, sodass Podozyten und Podozytenfragmente im Urin ausgeschieden werden. Die Analyse von Podozyten im Urin ist noch im Etablierungsstadium. *Habara et al.* konnten Podocalyxin(PDX)-positive Fragmente bereits im Urin mittels Durchflusszytometrie nachweisen, wobei sich erhöhte Werte bei Patient*innen mit aktiver Glomerulonephritis zeigten.⁴⁸ Mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie und ELISA zum Podocalyxin-Nachweis ließ sich eine Assoziation von Podozyten zu histologischen Pathologien in IgA-Nephritis nachweisen.⁴⁹ Auch im Urin von Patient*innen mit membranöser Nephropathie wurde PDX durch Sandwich-ELISA-Analyse in Kombination mit klinischen Parametern als diagnostischer Marker beschrieben.⁵⁰

1.5 Zwischenfazit

Im Falle einer terminalen Niereninsuffizienz ist die Transplantation das Mittel der Wahl für die Therapie. Die Diagnostik und Therapie der Transplantatabstoßung bilden bis heute eine wesentliche Herausforderung in der Betreuung nierentransplantierte Patient*innen. Eine nicht-invasive Diagnostik der Rejektion ist zurzeit nicht möglich, sodass die Nierenbiopsie den Goldstandard in diesem Falle bildet.

Einige Untersuchungen zeigen bereits, dass sich dieses Defizit durch die Analyse von Urinzellen potenziell lösen ließe. Die Zellanalyse im Urin bieten die Möglichkeit, Rückschlüsse auf intrarenale Pathologien zu ziehen. Für Schnelltests oder in der Harnmikroskopie spielt die Zellanalyse seit Langem eine Rolle in der klinischen Praxis. Experimentelle Untersuchungen haben verschiedene Zellpopulationen im Urin bereits weiter charakterisieren können und damit demonstriert, dass die Methoden zur Diagnostik nephrologischer Erkrankungen großes Potential haben. Einzug in die Klinik haben die beschriebenen nicht-invasive Monitoringmethoden zur Diagnostik aber noch nicht erhalten.

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer neuen Monitoring-Methode für nierentransplantierte Patient*innen.

Wie bereits beschrieben, sind die momentan in der Klinik eingesetzten Methoden zur Überwachung der Transplantatfunktion entweder Marker von nicht idealer Physiologie für einen Biomarker, da es zu viele Einflussgrößen gibt (zum Beispiel der gebräuchlichste: Kreatinin) oder sie sehr invasiv (Biopsie) sind und in sehr seltenen Fällen sogar mit Transplantatverlustgefahr einhergehen. Einige Studien zeigen bereits die beschriebene Herangehensweise auf der Suche nach neuen und besseren Biomarkern bzw. Monitoringmethoden. Gemein haben sie größtenteils, dass es sich bei den Analysen um „Downstream-Signale“ und/oder kleinste Moleküle als Produkte größtenteils unklarer Vorgänge in der untersuchten Erkrankung handelt.

Die Idee hinter dieser Arbeit ist es, die „Upstream-Signale“, also die Zellen, in denen die Moleküle der Genexpression und Proteomik synthetisiert werden, zu untersuchen. Auf diese Weise wird die stromaufwärts gelegene „Black Box“ beleuchtet und die Lücke zwischen abgeleiteten Molekülen und Pathologien innerhalb der Niere kann ein Stück weit geschlossen werden. Zudem bietet die Zellanalyse die Möglichkeit, die Synthesequelle zu untersuchen. Sie ist weniger variabel und bietet gleichzeitig ein größeres Spektrum als die eindimensionale Produktanalyse.

Der Urin zeigt sich als dienliches Untersuchungsmaterial, da es reichlich vorhanden, sowie ohne jegliche Invasivität und kostenunaufwendig zu erlangen ist.

Zur Zellanalyse hat sich im Blut die Durchflusszytometrie als pragmatische Methode erwiesen. Der logische Gedankenschluss war daher, die Durchflusszytometrie des Urins weiterzuentwickeln, um so die Zellen im Urin als Biomarker nutzen zu können und eine bereits in der Klinik etablierte Methodik zu verwenden.

Die Auswahl der Zellen, die untersucht werden sollten, erfolgte einerseits durch Rückschlüsse auf mögliche im Urin detektierbare Zellen anhand der Histopathologie bei Transplantatabstoßungsreaktionen und andererseits anhand der Realisierbarkeit der Detektion spezifischer Zellpopulation mittels Durchflusszytometrie. Die Vermutung ist, dass T-Zellen und Monozyten/Makrophagen intrarenale Inflammation widerspiegeln und Podozyten bzw. Podocalyxin-positive Elemente glomeruläre Pathologien

reflektieren. Des Weiteren wollten wir untersuchen, ob eine Kombination dieser Zellpopulationen ein präziseres Monitoring von Rejektionsreaktionen gegenüber anderen Pathologien erlaubt, als dies bei einzelnen Populationen der Fall ist.

Diese Gedanken kombinierend wird die Hypothese verfolgt, dass anhand der Zellpopulationsanalyse im Urin nierentransplantierte Patient*innen durch die Methode der Durchflusszytometrie Biomarker entwickelt werden können, welche die Transplantatfunktion überwachen und eine Abstoßung zu diagnostizieren vermögen. Wir untersuchen daher CD4+-T-Zellen, Makrophagen und Podozyten im Urin nierentransplantierte Patient*innen.

3 Materialien und Methoden

3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Chemikalien / Verbrauchsmaterial

Chemikalien/ Verbrauchsmaterial	Herkunft
Reagiergefäß 1,5ml EASY CAP	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
gibco RPMI Medium 1640 (-GlutaMAX)	Life Technologies, Pailsley, UK
Formaldehydlösung 37%	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Ficoll-Paque	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Combur Urinteststreifen	Roche Deutschland Holding, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Flebogamma	Grifols, Langen, Deutschland
Saponin	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research plus Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Biosphere Filter Tips	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
CELLSTAR 15ml serological Pipette	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Rotert Probenbecher 125ml	H.H. Rotert GmbH & Co. KG, Bad Iburg, Deutschland
Falcon Tubes 15 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Cell Strainer 70 µm Nylon	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Collagenase VIII	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Desoxyribonuclease	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
BD Pharm Lyse	BD, Franklin Lakes, USA

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) nach Hausrezept:

Tabelle 3: PBS-Rezept

	Molekulargewicht	10fach für 5l	mM
NaCl	58,4	400 g	136,9
KCl	74,5	10 g	2,7
KH ₂ PO ₄	136,9	10 g	1,5
Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O	178	71 g	7,9

Auf PBS basierend:	Rezept
FACS Flow Lösung	PBS/0,02% NaN ₃
Sorter Puffer	PBS sterilfiltriert, vor Gebrauch portionsweise autoklaviert
PBS/BSA	PBS / 0,2% BSA (sterilfiltriert)
PBS/BSA/Azid	PBS / 0,2% BSA / 0,02% Azid

3.2 Geräte und Programme

Tabelle 4: Geräte / Programme

Geräte / Programme	Herkunft
Heraeus Fresco 17 Centrifuge	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Heraeus Multifuge 3 S-R	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Heraeus Labofuge 400R	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Guava easyCyte Millipore	Guva Technologies, Hayward, California, USA
PipetBoy ACU	Integra, Zizers, Schweiz
MACS Quant Analyzer	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany
Flowjo 10.3	Tree Star, Ashland, Oregon, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, San Diego, California, USA
Adobe Illustrator CC	Adobe Systems Incorporated, San Jose, California, USA

3.3 Antikörper

Tabelle 5: Antikörper

Name	Klon	Isotyp	Konzentration	Verdünnung	Hersteller
CD3 PerCP	BW264/56	mouse IgG2	30 µl in 1mL	1:10	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD4-PE-Vio770	VIT4	mouse IgG2a	30 µl in 1mL	1:10	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD45RO-VioGreen	5B1	mouse IgG2	30 µl in 1mL	1:10	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD36-PE	AC106	IgG2a	30 µl in 1mL	1:10	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD14-FITC	TÜK4	mouse IgG2	30 µl in 1mL	1:10	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Podocalyxin-PE	REA246	human IgG1	30 µl in 1mL	1:10	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
REA Control-PE	REA293	recombinant human IgG1	30 µl in 1mL	1:10	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland

3.4 Patient*innen

Die Biopsiekohorte bestand aus 63 nierentransplantierten Patient*innen. Eine detaillierte Patient*innencharakterisierung findet sich in Tabelle 6. Für die Untersuchung wurden 39 Patient*innen rekrutiert, die nierentransplantiert waren und wegen des Verdachtes einer Abstoßungsreaktion standardgemäß biopsiert wurden. Die Urinanalyse erfolgte im Zeitraum von drei Tagen vor bis drei Tagen nach der Biopsie. Der Urin dieser Patient*innen wurde einmalig gemessen. Die Patient*innen wurden anhand der histologischen Diagnose der Biopsie in drei Gruppen eingeteilt: Patient*innen, bei denen eine akute zelluläre Rejektion festgestellt wurde, wurden der Gruppe „T cell-mediated Rejection“(TCMR) zugeordnet. Die Gruppe „Antibody-mediated Rejection“ (ABMR) bildeten Patient*innen, bei denen histologisch eine akute oder chronische antikörpervermittelte Rejektion festgestellt wurde. Patient*innen, bei denen biopsisch keine Abstoßung festgestellt wurde, wurden in der Gruppe „No Rejection“ (No Rx) zusammengefasst. Patient*innen mit unklarer histologischer Diagnose aufgrund von zu wenig Untersuchungsmaterial wurden von der Analyse ausgeschlossen. Wenn die Histologie trotzdem bei pathohistologischer Beurteilung eine Rejektionsdiagnose nahelegte, werden diese Patient*innen als separate Datenpunkte in den Ergebnissen

dargestellt, aber nicht in die Berechnung mit einbezogen. Patient*innen mit folgenden gesicherten spezifischen Diagnosen wurden von der Analyse ausgeschlossen: Membranöse Glomerulonephritis, Harnwegsinfektion, akute interstitielle Nephritis, fokal segmentale Glomerulosklerose oder Rezidiv einer IgA-Nephropathie.

Als Kontrollgruppe für die Biopsiekohorte wurden 24 nierentransplantierte Patient*innen aus der nephrologischen Ambulanz der Charité Universitätsmedizin Berlin randomisiert ausgewählt, bei denen eine gute Transplantatfunktion vorhanden war. Gute Transplantatfunktion war hier definiert als:

- stabiles Serum-Kreatinin (Schwankungen unter 25%) oder Kreatininabfall in regulären Kontrollterminen in der Ambulanz und
- keine stationäre Aufnahme aufgrund von nephrologischen oder im Zusammenhang mit dem Nierentransplantat stehenden Ursachen in den letzten sechs Monaten.

Eine Ausnahme bildete ein Patient, welcher eine unklare Kreatininerhöhung einen Monat vor der hier beschriebenen Messung hatte, welche sich innerhalb einer Woche ohne erurierbare Ursache zurückbildete. Für fünf langjährig transplantierte Patient*innen (Median Jahre nach Nierentransplantation (NTX) 8.39) war kein Serum-Kreatinin sechs Monate vor Messung vorhanden, da die Kontrolltermine in der nephrologischen Ambulanz in größeren zeitlichen Abständen bei beschwerdefreien Langtransplantierten und stabiler Funktion erfolgten. Die Definition des stabilen Serum-Kreatinins an den jeweilig vorherigen Kontrollterminen (auch wenn diese zeitlich länger zurücklagen) und die Abwesenheit von stationären Aufnahmen in den letzten sechs Monaten galt auch für diese fünf Patient*innen.

Tabelle 6: Patienten Biopsiekohorte

	T cell-mediated rejection (TCMR)	Antibody-mediated rejection (ABMR)	No rejection (No RX)	Kontrollgruppe
Mittelwert ± Standardabweichung	49 (±18)	58 (±18)	56 (±13)	47 (±14)
Weiblich/Männlich	4/10	1/6	6/12	10/14
Grunderkrankung	2x IgA-Nephropathie, 2x Diabetische Nephropathie, 1x Fanconi-Syndrom, 2x Glomerulonephritis, 1x Reflux mit Megaureter, 6x unbekannt	1x Hypertensive Nephropathie, 1x Alport-Syndrom, 1x IgA-Nephropathie, 1x Glomerulonephritis, 1x Diabetische Nephropathie, 2x unbekannt	1x Glomerulonephritis, 1x Lupusnephritis, 4x IgA-Nephropathie, 1x Kardiorenales Syndrom, 5x Diabetische Nephropathie, 1x Alport-Syndrom, 1x Hypertensive Nephropathie, 2x ADPKD, 2x unbekannt	4x ADPKD, 2x IgA-Nephropathie, 2x Refluxnephropathie, 1x Nierenzellkarzinom, 4x Glomerulonephritis, 2x Alport-Syndrom, 1x Medikamenteninduzierte Nephropathie, 2x Diabetische Nephropathie, 2x Hypertensive Nephropathie, 1x Atypisches hämolytisch-urämisches Syndrom, 3x unbekannt
Therapie der Abstoßung	7x Methylprednisolon, 3x Antithymozytenglobulin und Methylprednisolon, 1x Antithymozytenglobulin, 1x Methylprednisolon und IgG-Therapie, 2x keine spezifische Therapie	1x Methylprednisolon, 1x Cyclophosphamid, 1x Plasmapherese und IgG-Therapie und Antithymozytenglobulin, 1x Methylprednisolon und Plasmapherese, 3x keine spezifische Therapie	4x Methylprednisolon, 1x Antithymozytenglobulin, 13x keine spezifische Therapie	-
Urinvolumen ± Standardabweichung	111 (±39) ml	120 (±50) ml	84 (±45) ml	76 (±34) ml
Proteinurie Median (Spannweite)	30 (100) mg/dl	65 (300) mg/dl	22.5 (2000) mg/dl	0 (100) mg/dl
Leukozyturie Median (Spannweite)	0 (125) Leukozyten/µl	0 (0) Leukozyten/µl	0 (70) Leukozyten/µl	0 (70) Leukozyten/µl
Erythrozyturie Median (Spannweite)	200 (200) Erythrozyten/µl	5 (200) Erythrozyten/µl	80 (200) Erythrozyten/µl	0 (80) Erythrozyten/µl
Tage nach NTX Median (Spannweite)	66.5 (9524)	3368 (1833)	105 (5970)	2067 (7349)

Patientencharakterisierung Biopsiekohorte

Zusätzlich zu den 63 Patient*innen der Biopsiekohorte wurden 31 Patient*innen untersucht, die innerhalb von 24 Stunden vor Aufnahme in die Studie ein Nierentransplantat erhalten hatten (Frischtransplant-Kohorte). Diese Patient*innen wurden im Verlauf mehrfach untersucht und der Urin analysiert (Zeitabstände gerechnet in Tagen nach der Transplantation). Die Patient*innen wurden je nach Beurteilung ihres medizinischen Verlaufs in die Gruppe Gute Funktion/„Good Function Group“ oder „Delayed Graft Function/Problematic Course“ eingeteilt. „Good Function“, also gute Transplantatfunktion nach Transplantation, wurde definiert als die Abwesenheit jeglicher Komplikationen nach der Operation zur Transplantation, ein rascher Serumkreatininabfall und in der Transplantatsonographie Resistance Indices von 0,5-0,84. Eine weitverbreitete und akzeptierte Definition der „Delayed Graft Function“ ist die Notwendigkeit einer Dialyse in den ersten sieben Tagen nach Transplantation.⁵¹ Allerdings wird diese Definition nicht allen Patient*innen mit ausbleibender Transplantatfunktionsaufnahme gerecht, da die Entscheidung der Dialyse oftmals von keinen harten Faktoren abhängt, gegebenenfalls sogar von infrastrukturellen Umständen beeinflusst ist. Daher sind hier Patient*innen mit Nierenbiopsie innerhalb der ersten

sieben Tage nach Transplantation, Dialyse innerhalb der ersten sieben Tage nach Transplantation, neu aufgetretener CMV-Infektion innerhalb der ersten sieben Tage nach Transplantation und Komplikationen nach der Operation, definiert als Wundinfektion oder Notwendigkeit zur Re-OP innerhalb der ersten 14 Tage nach Transplantation in die Gruppe „Delayed Graft Function/Problematic Course“ eingeordnet. Eine detaillierte Patientencharakterisierung dieser Kohorte stellt Tabelle 7 dar.

Tabelle 7: Patienten Frischtransplantiertenkohorte

	Gute Funktion / Good function Gruppe	Delayed Graft Function/ Problematic Course
Mittelwert ± Standardabweichung	53 (±13)	46 (±14)
Weiblich/Männlich	6/8	6/11
Grunderkrankung	3x IgA-Nephropathie, 4x Glomerulonephritis, 2x Hypertensive Nephrosklerose, 1x Chronische tubulointerstitielle Nephritis, 1x chronische Pyelonephritis, 3x unbekannt	1x kongenitale Hydronephrose, 1x Membranöse Nephropathie, 2x ADPKD, 1x Hypertensive Nephrosklerose, 2x Glomerulonephritis, 1x Lupusnephritis, 4x kombinierte diabetische und medikamenteninduzierte Nephropathie, 2x IgA-Nephropathie, 1x kombinierte Glomerulosklerose und tubulointerstitielle Nephritis, 2x unbekannt
Lebendspende/Leichenspende	8/6	12/5
Proteinurie Median (Spannweite)	8,25 (53,3) mg/dl	22,5 (100) mg/dl
Leukozyturie Median (Spannweite)	0 (15) Leukozyten/µl	0 (62,5) Leukozyten/µl
Erythrozyturie Median (Spannweite)	100 (200) Erythrozyten/µl	105 (200) Erythrozyten/µl

Patientencharakterisierung Frischtransplantiertenkohorte

3.5 Etablierung der Methode

Zur Etablierung der Methode zur durchflusszytometrischen Analyse von Urinzellen wurden die Messmethode und anschließend die angewendeten Antikörper-Panel mit Hilfe von Zelllinien aus humaner Niere und anhand von Kadavernieren entwickelt.

3.5.1 Zelllinien

Podozyten von humanen Nieren wurden kultiviert und gezüchtet. Die Zellen wurden durch Verdauung des humanen Nierengewebes mittels Kollagenase und anschließender Percoll-Dichtezentrifugation gewonnen. Das von *Baer et al.* beschriebene Protokoll für proximale und distale Tubuluszellen wurde hierfür verwendet.⁵²

3.5.2 Nierenfärbungen

Humane Kadavernieren von Spender*innen wurden innerhalb von 24 Stunden nach dem Tod untersucht und dienten der Entwicklung eines Färbeprotokolls zur Analyse von Podozyten mit Durchflusszytometrie. Das Nierengewebe wurde mit RPMI-Medium, welches Kollagenase VIII und DNase enthielt, für 30-60 Minuten bei 37 °C verdaut. Erythrozytolyse wurde durch BD Pharm Lyse erreicht. Anschließend wurden vitale und letale Zellen mittels Vitalfärbung getrennt. Das Färbeprotokoll und die Messung wurden nach gleichem Prozedere durchgeführt wie hier in Abschnitt 3.6.4, 3.6.5 und 3.6.6 beschrieben.

3.6 Uringewinnung und Probenaufbereitung

3.6.1 Uringewinnung

Patientenabhängig wurde der Urin entweder spontan oder über einen Blasenkatheter abgegeben. Bis zur Untersuchung wurde der Urin in sterilen Mehrzweckbechern aufbewahrt. Die Untersuchung der nicht fixierten Zellen erfolgte unmittelbar am Abnahmetag, die restlichen Zellen wurden fixiert und entweder am selben oder höchstens bis zu vier Tage später gemessen.

3.6.2 Urinteststreifenuntersuchung

Um bei der Auswertung Rückschlüsse auf mögliche Ursachen für detektierte Zellen im Urin ziehen zu können, wurde jede Urinprobe vor der Zellisolation mittels Reagenzstreifen zur visuellen Harnanalyse auf Leukozyturie, Nitrit, Proteinurie und Erythrozyturie untersucht. Durch die Beschichtung des Reagenzstreifens mit einem jeweiligen substanzspezifischen Indikator, welcher bei Urinkontakt entsprechend der Konzentration einen Farbumschlag zeigt, können semiquantitativ und qualitativ Rückschlüsse für die primäre orientierende Urindiagnostik gezogen werden.

3.6.3 Zellisolation

Für die Untersuchung mittels eines Durchflusszytometers mussten zunächst die Zellen des Urins isoliert werden. Die eingegangene Urinprobe wurde auf 50ml Falcon Tubes aufgeteilt und anschließend mit 280 x g bei 4 C° acht Minuten lang zentrifugiert. Ein

Milliliter des Überstands wurde bei -20 C° eingefroren. Der restliche Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in PBS-Puffer mit Rinderserumalbumin (Abk. BSA für Bovine Serum Albumin) resuspendiert und zusammengeführt, sodass 40ml Lösung pro Patientenprobe vorhanden waren.

Die beschriebene Lösung wurden langsam auf 15ml Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer (Ficoll-Paque) pipettiert, sodass per Zentrifugation bei 450 x g bei 20 C° 20 Minuten die mononukleären Zellen isoliert werden konnten. Mithilfe einer Pipette konnten die mononukleären Zellen, welche sich als weiße Zellschicht darstellten, in ein 15ml-Gefäß überführt werden. Diese Zellen wurden bei 300 x g bei 4 C° für acht Minuten zu einem Pellet zentrifugiert, welches in 1800 µl PBS-Puffer mit BSA resuspendiert wurde. Die Lösung wurde auf zwei 1,5-Milliliter-Reaktionsgefäße aufgeteilt und bei 280 x g bei 4C° für acht Minuten zentrifugiert. Anschließend folgte die im Folgenden beschriebene extrazelluläre Fluoreszenzmarkierung.

3.6.4 Fluoreszenzmarkierung

Bei der Fluoreszenzmarkierung werden Oberflächenmoleküle der Zellen markiert, sodass diese anhand ihrer Charakteristika sortiert werden können. Bei diesen Oberflächenmolekülen handelt es sich um sogenannte „Cluster of Differentiation“ (CD). Dies sind Merkmale, die von Zellen teilweise spezifisch exprimiert werden. Sie spielen eine Rolle bei Rezeptorbindungen, Aktivierungen und Signaltransduktionen oder sind Enzyme. Alle gemeinsam spielen in der Zell-Zell-Interaktion eine Rolle. In Gruppen zusammengefasst wurden die Antikörper, die das gleiche Merkmal erkennen. So wurde eine internationale Nummerierung der Cluster of Differentiation eingeführt, die aktuell bis 371 reicht.⁵³

Eine kurze Beschreibung der verwendeten CD-Moleküle folgt:

CD3: CD3 gehört zu dem T-Tell-Rezeptor und spielt eine Rolle in der Aktivierung zytotoxischer T-Zellen. Sowohl T-Helferzellen als auch regulatorische und zytotoxische T-Zellen exprimieren diesen Rezeptor.

CD4: CD4 ist ein Glykoprotein und befindet sich auf T-Helferzellen, Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen. Gemeinsam mit CD3 können so die T-Helferzellen identifiziert werden.

CD14: CD14 ist ein Protein, welches zum angeborenen Immunsystem gehört. Hier hat es die Funktion eines Korezeptors bei der Detektion von bakteriellen Lipopolysacchariden. Exprimiert wird es von Makrophagen, dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten. Gemeinsam mit CD36 können die Makrophagen charakterisiert werden.

CD36: CD36 ist ein Membranprotein, welches sich auf Thrombozyten, Erythrozyten, Monozyten, Muskelzellen, differenzierten Adipozyten, Milzzellen und Mammaepithelzellen befindet. Wie oben beschrieben können in der Kombination mit CD14 Makrophagen identifiziert werden.

Um die vitalen von den nicht-vitalen Zellen zu unterscheiden (nur relevant für nicht-fixierten Zellen), wurden die Zellen mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. DAPI markiert die DNA und muss dafür in den Intrazellulären Bereich gelangen, was bei toten Zellen wesentlich schneller geschieht. DAPI kann zwar auch die intakte Zellmembran lebender Zellen durchdringen, allerdings nur sehr langsam. Deshalb wurde DAPI unmittelbar vor der Messung am Durchflusszytometer zur Probe hinzugegeben.

Für die Markierung der Podozyten wurde das Protein Podocalyxin ausgewählt. Podocalyxin ist ein Sialoglykoprotein, eine Kombination aus Sialinsäure und einem Glykoprotein. Es wird als Hauptbestandteil der Glykokalix von Podozyten im Glomerulus angenommen. Die Glykokalix ist der extrazelluläre Kohlenhydratanteil, der an Proteine oder Lipide gebunden ist.

Teilweise wurden Zellen mit mehreren Antikörpern markiert, um sie zu identifizieren.

Da mithilfe des Durchflusszytometers die Möglichkeit bestand, mehrere Fluorochrome zu detektieren, waren die Antikörper mit den Fluorochromen Vio Green, FITC, PE, PerCP, PE-Vio770, APC-Vio770 gekoppelt. Sie haben deutlich voneinander trennbare Emissionsspektren, sodass die beschriebenen Merkmale voneinander getrennt werden konnten. Alle Farbstoffe können von den drei Lasern (405, 488, 638nm) des MACSQuant Analyser 10 Durchflusszytometers angeregt werden.

Zu Beginn der Fluoreszenzmarkierung wurden alle Proben in 90 µl PBS-Puffer mit BSA und 10 µl Flebogamma resuspendiert. Flebogamma blockiert die unspezifischen Fc-Rezeptoren. Anschließend wurden die Antikörper entsprechend der Titration durch in Vorversuchen festgestellten Konzentration hinzugegeben (siehe Tabelle 5). Die

Inkubationszeit betrug 15 Minuten bei 4 C° im Dunkeln. Die Proben wurden mit einem Milliliter PBS-Puffer mit BSA nach Inkubation bei 280 x g bei 4 C° für acht Minuten zentrifugiert. Für die Messung wurde das so entstandene Pellet in 180 µl resuspendiert. Die Proben wurden vor der Messung mit den Filtern „Cell Strainer 70 µm Nylon“ gefiltert. Dies diente dem Herausfiltern von Detritus, um das Messgerät nicht zu verstopfen.

3.6.5 Extrazelluläre Markierung

Bei der oben beschriebenen Markierung von CD3, CD4, CD14, CD36 und Podocalyxin handelt es sich um die Markierung von extrazellulären Proteinen, die sich demnach auf der Zelloberfläche befinden. Somit können sie durch die Zugabe von Antikörpern ohne notwendige Perforation an das entsprechende Antigen binden.

3.6.6 Messung mit dem Durchflusszytometer

3.6.6.1 Messprinzip

Die Urinzellen, welche nun durch Antikörper, die an Fluorochrome gekoppelt waren, markiert waren, wurden zur Messung in das Durchflusszytometer „MACS Quant Analyzer“ gegeben. Zunächst wurden so die Größe und die Granularität der einzelnen Zellen erfasst. Des Weiteren wurden die Fluorochrome, die an die spezifischen Antikörper gekoppelt sind, durch die jeweilige spezifische Wellenlänge eines im Gerät vorhandenen Lasers angeregt und emittieren daraufhin wiederum Licht in einer spezifischen Wellenlänge. Diese Emission wird durch das FACS-Gerät detektiert und in ein zweidimensionales Streudiagramm umgerechnet. So lässt sich die durch die Antikörperbindung erfolgte Zellmarkierung analysieren und Rückschlüsse auf Zellpopulationen sind möglich.

3.6.6.2 Messung

Vor der Messung am FACS-Gerät wurde die Probe im 1,5-Milliliter-Reaktionsgefäße am Vortexmischer durchmischt. Anschließend wurden die in Vorexperimenten zur Kompensation erstellten Streuungseinstellungen geladen und das MACS Quant Analyzer den Vorgaben entsprechend durchgespült und gebleicht. Es wurden pro Probe 100µl zur Messung aufgenommen. Die Durchflussrate betrug 2.000 Zellen pro Sekunde.

3.6.6.3 Auswertung

Die durch die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse gewonnenen Daten in Form von Streudiagrammen wurden mit Hilfe der Software Flowjo 10.3 ausgewertet. Mithilfe der Software können durch sogenanntes „Gating“ gewünschte Zellpopulationen eingekreist und somit als Teilmenge definiert werden. Diese Teilmenge der analysierten Zellen, nun als Population zusammengefasst, wird anschließend im Hinblick auf die Intensität ihrer Emission auf die spezifischen Fluorochrome analysiert. Hohe Intensitäten für ein Fluorochrom in einer Population sprechen somit für eine große Menge des jeweiligen gekoppelten Antikörpers in dieser Population. So lassen sich Rückschlüsse auf das gebundene Antigen und im Endeffekt die Zellart treffen. Abbildung 2 zeigt die „Gating“-Strategie der Zellpopulationen für die beschriebene Untersuchung. Im Vorwärts-/Seitwärtsstreulicht wird die Population in der für die Zellart typische Streuung markiert und anschließend auf die spezifische Markierung analysiert. Bei den T-Zellen wurde die CD3-positive Population auf CD4-Positivität untersucht und diese doppelt-positive Zellgruppe als T-Zellen definiert. Für die Analyse der Makrophagen wurde die CD45- und CD36-positive Population auf CD14-Positivität untersucht. Bei jeder Population wurden im ersten Schritt die Dubletten in der FSC-H/FSC-Einstellung ausgeschlossen. Dies ist in Abbildung 2 für das Podozyten-„Gating“ repräsentativ dargestellt. Podocalyxin-positive Elemente sind in dieser Untersuchung ein Surrogat für Podozyten.

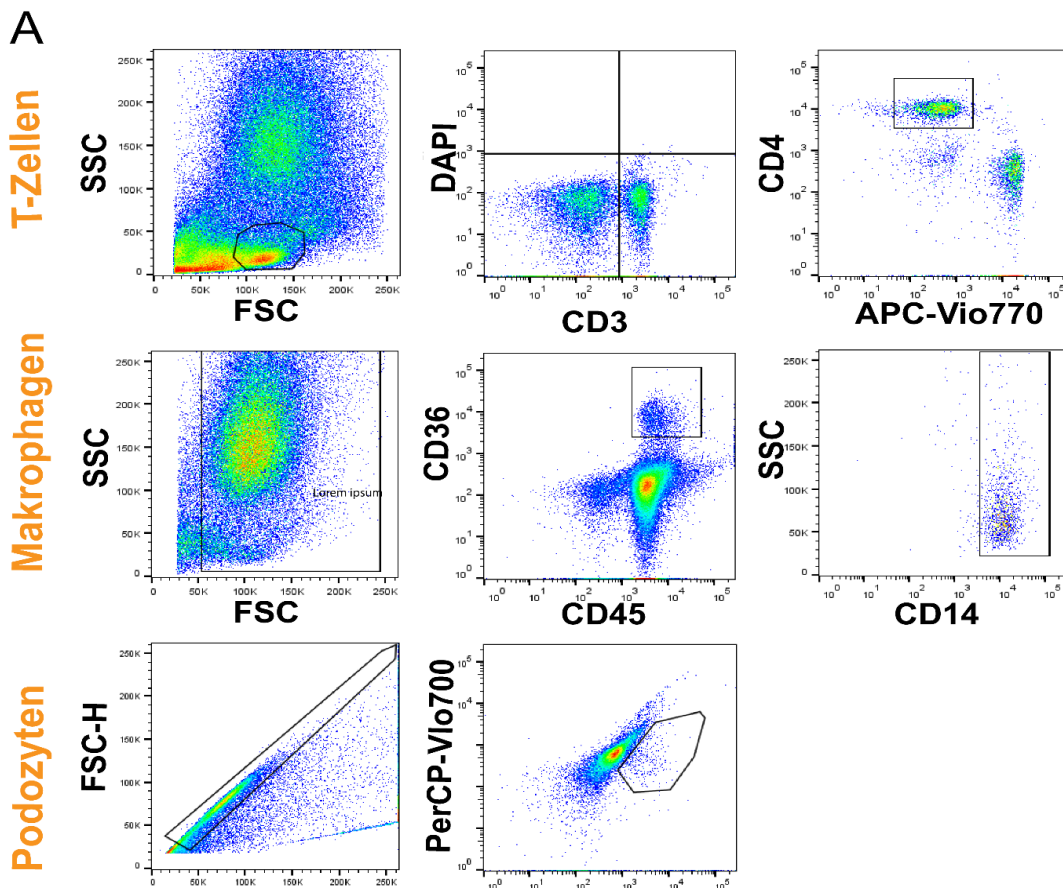


Abbildung 2: „Gating“-Strategie
 „Gating“-Strategie der Zellpopulationen zur Auswertung der durch Durchflusszytometrie erstellten Streudiagramme. SSC, Side Scatter/Seitwärtsstreulicht; FSC, Forward Scatter/Vorwärtsstreulicht; PDX, Podocalyxin. Abbildung entstanden in Zusammenarbeit mit Hannah Antonia Brand.

3.7 Nierenbiopsien

Nierenbiopsien gehören, wie bereits in 1.2 beschrieben, zum Standardprotokoll der Diagnostik bei nierentransplantierten Patient*innen. Zur Gruppeneinteilung der Patient*innen in der Biopsiekohorte dieser Studie wurden die Diagnosen der Nierenbiopsie als Grundlage verwendet.

3.7.1 Biopsieentnahme

Die Nierenbiopsien dieser Studie wurden stets unter sonographischer Sichtkontrolle durchgeführt. Die Punktionsstelle wurde ordnungsgemäß auf der Haut des/der Patient*in markiert und die Haut und das Subkutangewebe durch die Verwendung eines Lokalanästhetikums lokal anästhesiert. Die Haut wurde vorschriftsgemäß desinfiziert und die Punktion erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die Biopsienadel wurde durch eine Führungsschiene auf den gewünschten Biopsiebereich zubewegt und ein

Gewebszylinder des Nierentransplantats entnommen. Anschließend erhielten die Patient*innen einen Druckverband und einen Sandsack zur Hämatomverhinderung an der Punktionsstelle. Die Patient*innen wurden mindestens 24 Stunden nach dem Eingriff stationär überwacht. Alle Patient*innen erhielten eine Kontrollsonographie.

3.7.2 Histopathologische Auswertung der Biopsien

Die durch die Nierenbiopsie entnommenen Gewebszylinder wurden in sterilen Röhrchen für Gewebeproben in Paraformaldehyd oder Formalin umgehend an das Institut für Pathologie für die weitere Bearbeitung übergeben. Alle in dieser Studie verwendeten Biopsieergebnisse wurden durch das Institut für Pathologie der Charité Universitätsmedizin Berlin erhoben und validiert. Die Biopsiezylinder wurden mittels Lichtmikroskopie und Immunfluoreszenz-Färbung oder immunhistochemischer Färbung analysiert. Elektronenmikroskopie wurde nur bei Bedarf verwendet.

Die histopathologischen Befunde wurden anhand der BANFF-Klassifikation von 2013⁵⁴ (zur Zeit der Probenanalyse die aktuelle Klassifikation) begutachtet.

3.8 Statistische Methoden

Da es sich in der hier beschriebenen Untersuchung um eine explorative Studie handelt, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet, um Unterschiede in Zellpopulationen zu berechnen. Ein p -Wert von 0,05 oder weniger wurde in allen statistischen Tests als signifikant gewertet. Alle Medianwerte, Durchschnittswerte, Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurven und Spearman Korrelationen wurden mit der Software GraphPad Prism 5 berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung einer Methode zum Nachweis von Podocalyxin-positiven Zellen als Surrogat für Podozyten im Urin mittels Durchflusszytometrie

Podozyten rücken mehr und mehr in den Fokus der nephrologischen Forschung, da sie zentral für die Nierenfunktion sind und bei multiplen nephrologischen Erkrankungsbildern eine Rolle spielen. Die Forschung reicht hier vom Einsatz von Podozyten oder Podozyten-assoziierten Moleküle für die Diagnostik, über Outcome-Prädiktion bis hin zu Podozyten als pharmakologisch-therapeutische Zielstrukturen. Der Nachweis und der Einsatz der Methoden im Zusammenhang mit Podozyten sind durch die Fülle der Nierenerkrankungen, welche Podozyten beeinflussen, nicht erkrankungsspezifisch.

Im Wesentlichen werden für die Podozytenanalyse im Urin Markierungen mit Antikörpern gegen Podocalyxin, Podocin, Nephrin und Synaptopodin angewendet.⁵⁵ Podocalyxin ist ein relativ stabiler Marker für Podozyten, aber nicht podozytenspezifisch.⁵⁶ Hämatopoetische Stammzellen, Megakaryozyten, Thrombozyten, Erythrozytenvorläufer bei hoher Blutbildungsrate, vaskuläre Endothelzellen, Neurone (insbesondere im zerebralen Kortex und im Zerebellum), mesotheliale Zellen, Zellen maligner Prozesse (Mammakarzinom, Prostatakarzinom, Hodenkarzinom, duktales Pankreaskarzinom, hepatozelluläres Karzinom, Leukämie, aggressiver Wilms Tumor) zeigen Podocalyxin-positivität.⁵⁷ Parietalzellen der Niere zeigen ebenfalls Podocalyxinpositivität.⁵⁸

Die Podozytenanalyse im Urin erfolgte in Studien zur Forschung von urinären Podozyten als Marker für unterschiedliche Erkrankungen mittels Immunfluoreszenzfärbung und anschließender Mikroskopie.⁵⁸⁻⁶¹ Die Immunfluoreszenzfärbung gestaltet sich aber für den klinischen Alltag nicht sehr praktikabel, da die Proben über Nacht fixiert werden müssen, die Färbung Zeit in Anspruch nimmt, bei Waschschritten Zellen verloren gehen und die Beurteilung unter dem Mikroskop maßgeblich vom Betrachter abhängt.

Podozytenfragmente und Proteine wurden ebenfalls als Marker für nephrologische Erkrankungen untersucht, wobei hier Nephrin das vorwiegend untersuchte Protein darstellt, welches mittels ELISA oder Durchflusszytometrie nachgewiesen werden kann.⁶² Des Weiteren wurde podozytenassoziierte mRNA im Urin und in Nierenbiopsien im Rahmen der Forschung von Podozyten als Biomarker für nephrologische Erkrankungsbilder untersucht.⁵⁵

Durch die Untersuchungen in dieser Arbeit konnte eine Methode entwickelt werden, mit welcher Podocalyxin-positive Zellen als Surrogat für Podozyten im Urin nierentransplantiertes Patient*innen mittels Durchflusszytometrie analysiert werden können. Die Methode wurde zunächst an humanem Nierengewebe getestet und etabliert. Abbildung 3 zeigt die hierfür durchgeführten Experimentergebnisse mit entsprechender Isotypkontrolle, welche die Spezifität des Antikörpers demonstriert. Anschließend konnte die Methode am Patientenurin durchgeführt werden und so eine Podocalyxin-positive Population als Surrogat für Podozyten dargestellt und analysiert werden. Abbildung 3.B zeigt die Weiterentwicklung des Protokolls für die Urinmessung, ebenfalls mit der entsprechenden Isotypkontrolle zur Spezifitätsüberprüfung des Antikörpers.

Somit ist dies die erste Arbeit, welche Podocalyxin-positive Elemente als Surrogat für Podozyten als Marker in nierentransplantierten Patient*innen darstellt. Im Folgenden werden zur Optimierung des Leseflusses Podocalyxin-positive Zellen in dieser Arbeit als Podozyten bezeichnet, es sei aber an dieser Stelle ausdrücklich darauf hingewiesen, dass es sich hierbei um ein Surrogat für Podozyten handelt, welches nicht mit Podozyten gleichgesetzt werden kann.

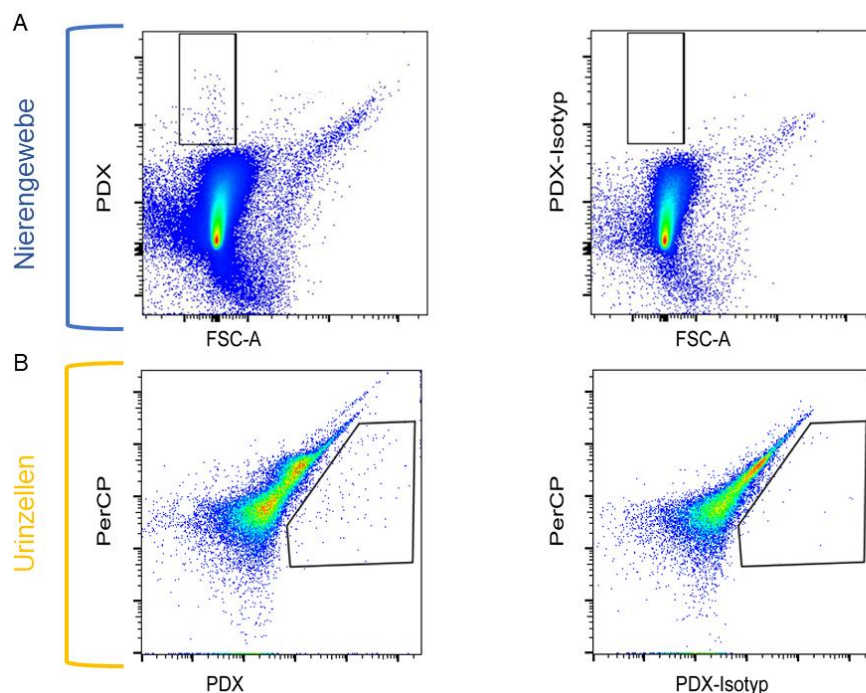


Abbildung 3: Podozyten-Färbung

Etablierung der Podozyten-Färbung mittels Durchflusszytometrie. A: Durchflusszytometrische Untersuchung von Nierengewebe auf Podocalyxin-positive Zellen mit entsprechender Isotypkontrolle. B: Urin-Analyse mittels Durchflusszytometrie auf Podocalyxin-positive Zellen/Podozyten mit entsprechender Isotypkontrolle. PDX, Podocalyxin; FSC, Forward Scatter/Vorwärtsstreulicht.

4.2 Zellpopulationen unterscheiden sich in nierentransplantierten Patient*innen mit Abstoßungsreaktion

Der Urin 39 nierentransplanterter Patient*innen mit Verdacht auf Rejektion als sogenannte „Biopsiekohorte“ wurde auf CD4-positive T-Zellen, Makrophagen und Podozyten mit Durchflusszytometrie untersucht. In der standardmäßig durchgeführten Biopsie wurden bei 14 Patient*innen eine T-Zell-vermittelte Abstoßung, bei sieben Patient*innen eine antikörpervermittelte Abstoßung und bei 18 Patient*innen keine Rejektion diagnostiziert. Fünf Patient*innen hatten uneindeutige Biopsieergebnisse, sodass sie von der statistischen Analyse ausgeschlossen wurden. Abbildung 4 zeigt, dass sich die Gesamtpopulation und die Zusammensetzung der Zellen im Urin in den drei Gruppen unterscheiden. Die größte Zellanzahl befand sich im Urin von Patient*innen, die in der Biopsie keine Abstoßung zeigten. Hier waren vor allem Makrophagen, gefolgt von Podozyten, im Urin nachzuweisen. Die größte T-Zell-Population zeigte sich im Urin von Patient*innen mit T-Zell-vermittelter Abstoßung. In der Gruppe der Patient*innen mit antikörpervermittelter Rejektion waren am wenigsten Zellen zu detektieren und auch absolut gesehen alle drei untersuchten Zellgruppen am wenigsten vorhanden.

Die T-Zell-, Makrophagen- und Podozytenpopulationen im Urin korrelierten nicht mit den Urinteststreifenergebnissen für Hämoglobin, Protein, Nitrit oder Leukozyten.

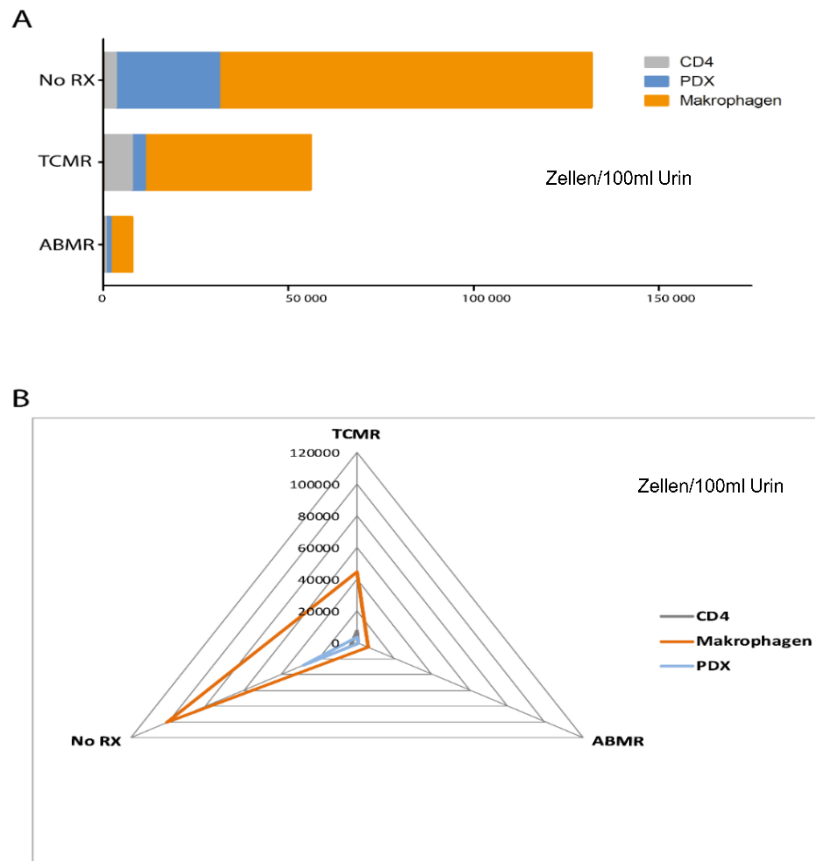


Abbildung 4: Zellpopulationen

Zellpopulationen im Urin in nierentransplantierten Patient*innen mit Verdacht auf Rejektion (Biopsiekohorte). A: Darstellung der Untergruppen der durch das Durchflusszytometer detektierten Ereignisse der drei untersuchten Gruppen (Mittelwerte). B: Netzdiagramm zur Veranschaulichung der unterschiedlichen Zellpopulationen in den drei untersuchten Gruppen (Mittelwerte). No RX, No Rejection/keine Rejektion, TCMR, T cell-mediated rejection/ T-Zell-vermittelte Rejektion; ABMR, Antibody-mediated rejection/Antikörper-vermittelte Rejektion; PDX, Podocalyxin-positive Zellen.

4.3 Korrelationen von Zellpopulationen im Urin mit histopathologischen Klassifikationskriterien

Um die Hypothese zu untersuchen, dass Zellpopulationen im Urin intrarenale Pathologien reflektieren, wurde die Anzahl der Zellen mit den histopathologischen Befunden nach der BANFF-Klassifikation von 2013 korreliert. Die BANFF-Klassifikation von 2013 war zum Zeitpunkt der Untersuchung die aktuell angewendete und wurde zur Beurteilung der Biopsien dieser Studie eingesetzt. Repräsentative Biopsiebilder mit jeweils zugehöriger durchflusszytometrischer T-Zell-Analyse sind in Abbildung 5 dargestellt.

TCMR

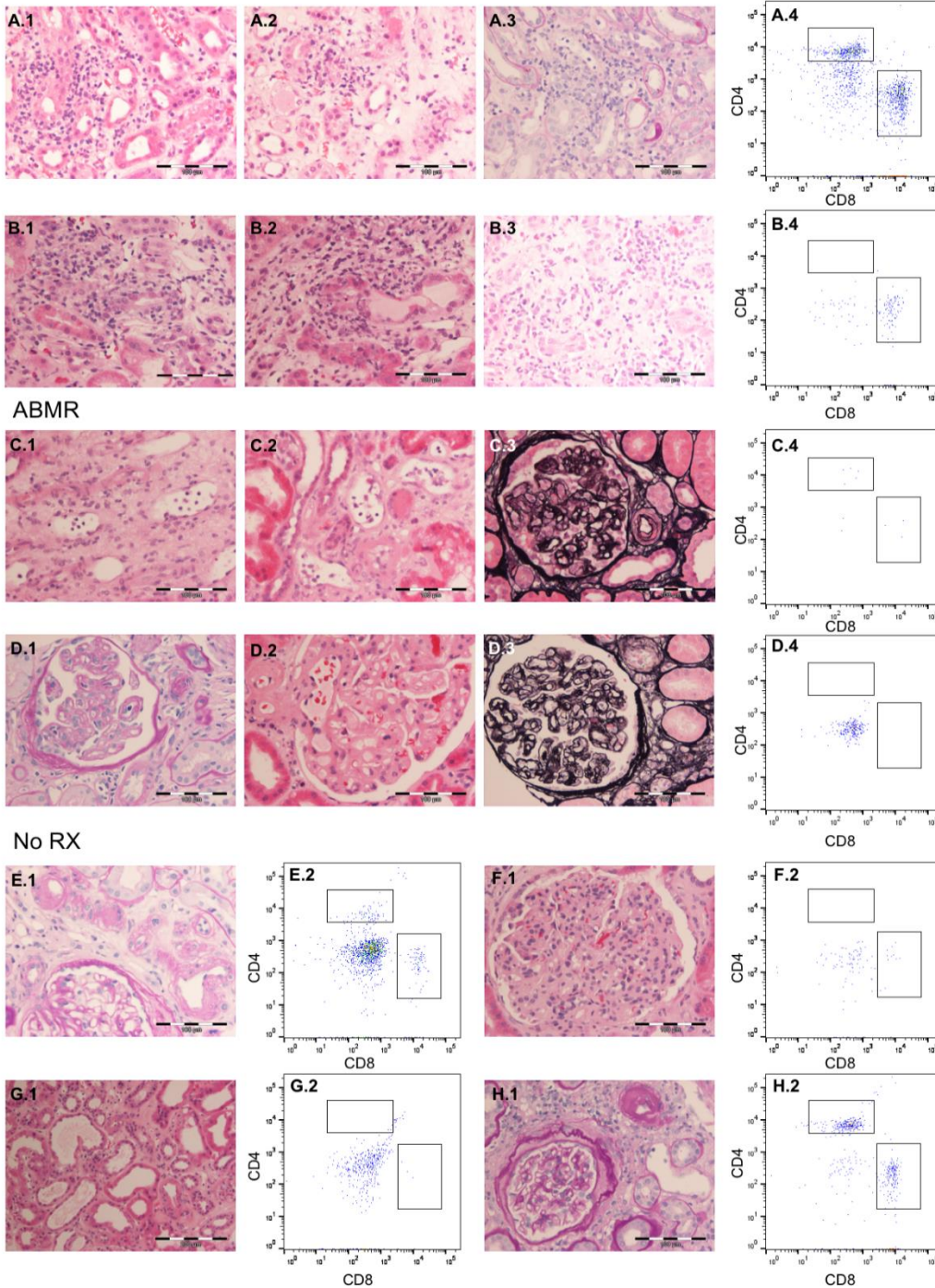


Abbildung 5: Biopsiebilder und Durchflusszytometrie

Repräsentative Biopsiebilder mit entsprechender durchflusszytometrischer Analyse (A) Patient*in mit Borderline-Läsionen, hinweisend auf TCMR, A.1 und A.2 HE, A.3 PAS, A.4. Durchflusszytometrische T-Zell-Analyse (B) Patient*in mit TCMR, B.1-B.3 HE, B.4 Durchflusszytometrische T-Zell-Analyse. (C) Patient*in mit ABMR, C.1 und C.2 HE, C.3 Jones Färbung, C.4 Durchflusszytometrische T-Zell-Analyse. (D) Patient*innen ohne Rejektion, aber mit diversen anderen Pathologien. E.1 und H.1 PAS, F.1 und G.1 HE, E.2, F.2, G.2, H.2 Durchflusszytometrische T-Zell-Analyse. No RX, No Rejection/keine Rejektion; TCMR, T cell-mediated rejection/T-Zell-vermittelte Abstoßung; ABMR, antibody-mediated rejection/Antikörpervermittelte Rejektion; HE, Hämatoxylin-Eosin Färbung; PAS, Periodic acid-Schiff-Reaktion. Abbildung entstanden in Zusammenarbeit mit Wolfgang Schneider (Institut für Pathologie Charité-Universitätsmedizin Berlin).

Bei der Analyse der Makrophagen im Urin lässt sich eine negative Korrelation zwischen Glomerulokapillaritis ($r = -0,4258$, $p = 0,0268$) und chronischer Transplantatglomerulopathie ($r = -0,5822$, $p = 0,0014$) feststellen. Des Weiteren korreliert die Makrophagenpopulation mit interstitieller Entzündung ($r = 0,6978$, $p = 0,0004$) und Tubulitis ($r = 0,5562$, $p = 0,0088$).

Die CD4-positiven T-Zellen im Urin korrelieren mit Tubulitis ($r = 0,5099$, $p = 0,0182$). Bei Betrachtung der mesangialen Matrixvermehrung zeigte sich eine negative Korrelation im Hinblick auf die T-Zellen ($r = -0,4734$, $p = 0,035$).

Podocalyxin-positive Zellen korrelieren negativ mit chronischer Transplantatglomerulopathie ($r = -0,3962$, $p = 0,0451$) und Glomerulitis ($r = -0,4132$, $p = 0,0322$). Ursächlich für diese Korrelation ist hauptsächlich die hohe Podozytenanzahl bei Patient*innen mit der Bewertung von null in den genannten Kategorien der BANFF-Klassifikation.

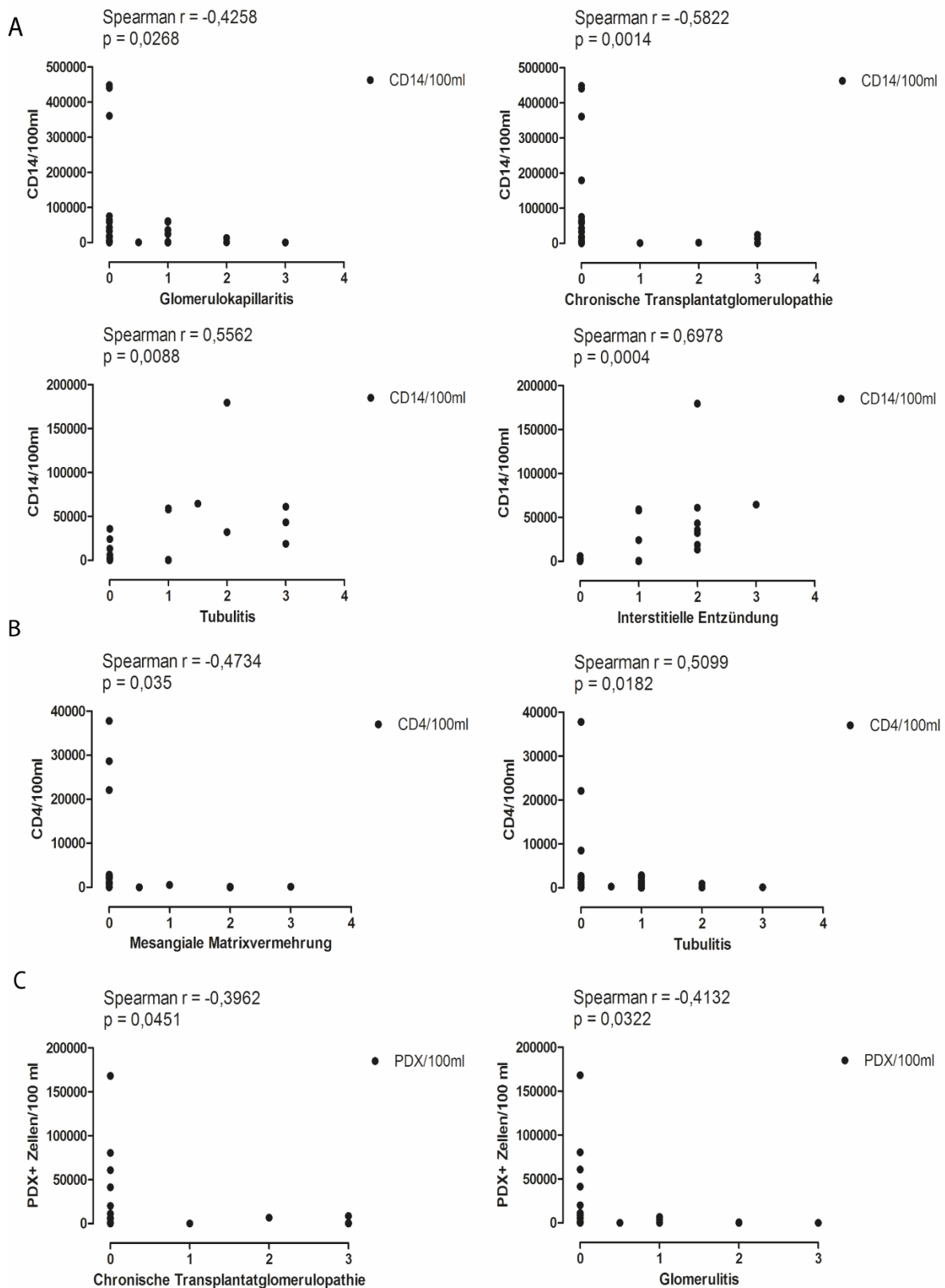


Abbildung 6: Korrelationen

Korrelationen von Zellpopulationen im Urin mit histologischen Klassifikationskriterien der BANFF Klassifikation von 2013. A: Korrelationen der Makrophagen/CD14-positiven Zellen im Urin. B: Korrelationen der CD4-positiven T-Zellen im Urin. C: Korrelationen der Podozyten im Urin. PDX, Podocalyxin.

4.4 Einzelne Zellpopulationen trennen Patient*innen mit Abstoßungsreaktion nur bedingt voneinander

Im Anschluss wurde analysiert, ob sich durch einzelne Zellpopulationen im Urin Patient*innen innerhalb der Biopsiekohorte mit Abstoßungsreaktion ermitteln lassen. Für diese Untersuchung wurde eine Kontrollgruppe aus 24 nierentransplantierten Patient*innen mit stabiler Transplantatfunktion (ohne Nierenbiopsie) miteingeschlossen.

Bei Patient*innen mit T-Zell-vermittelter Abstoßung wurden signifikant höhere CD4-positive T-Zellen im Vergleich zu Patient*innen mit antikörper-vermittelter Rejektion detektiert ($p < 0,05$). Auch wenn sich größere T-Zell-Populationen bei Patient*innen mit TCMR im Vergleich zu Patient*innen ohne Rejektion präsentierten, ließen sich diese Gruppen nicht eindeutig voneinander trennen und es zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Es wurden ebenfalls signifikant mehr T-Zellen und Makrophagen im Urin von Patient*innen mit TCMR im Vergleich zur Kontrollgruppe detektiert (beide Parameter $p < 0,01$). Im Urin bei Patient*innen ohne Rejektion in der Biopsie zeigten sich signifikant mehr Podozyten als bei Patient*innen mit TCMR ($p < 0,01$).

Im Urin von Patient*innen mit ABMR ließen sich deutlich weniger Makrophagen und Podozyten detektieren als bei Patient*innen ohne Rejektion in der Biopsie (Makrophagen $p < 0,05$, Podozyten $p < 0,01$). Die Kontrollgruppe zeigte ebenfalls signifikant mehr Podozyten im Urin als bei Patient*innen mit ABMR ($p < 0,05$).

Der Urin von Patient*innen mit dem Verdacht auf Rejektion, welcher sich nicht in der Biopsie bestätigen ließ (No RX-Gruppe), präsentierte signifikant größere Populationen an Makrophagen als die Kontrollgruppe ($p < 0,01$).

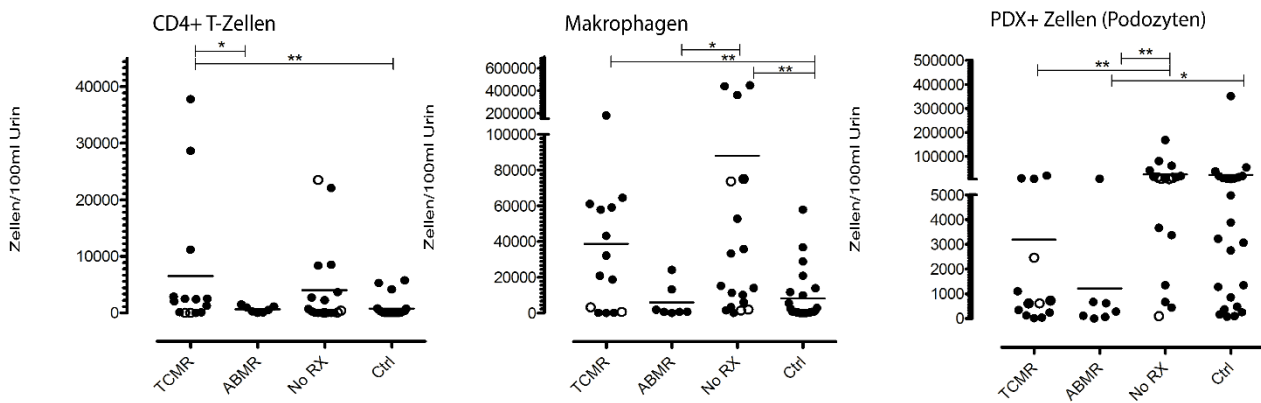


Abbildung 7: Einzelne Zellpopulationen im Vergleich

Zellpopulationen im Urin in nierentransplantierten Patient*innen mit Verdacht auf Rejektion und Nierenbiopsie (Biopsiekohorte). Patient*innen wurden anhand ihrer histologischen Diagnose der entsprechenden Gruppe zugeteilt. Eine Kontrollgruppe mit nierentransplantierten Patient*innen wurde ebenfalls analysiert und hier gezeigt. Unausgefüllte Punkte symbolisieren Patient*innen mit zu wenig Biopsiematerial, aber suggestiven Diagnosen. Sie wurden von der Berechnung ausgeschlossen, sind aber hier graphisch dargestellt. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. No RX, No Rejection/keine Rejektion, TCMR, T cell-mediated rejection/ T-Zell-vermittelte Rejektion; ABMR, Antibody-mediated rejection/Antikörper-vermittelte Rejektion; Ctrl, Control/Kontrollgruppe, PDX, Podocalyxin.

4.5 Erhöhter Quotient von CD4-positiven T-Zellen zu Podozyten bei Patient*innen mit Rejektion

Wie beschrieben wurde, zeigten die verschiedenen Patientengruppen der Biopsiekohorte unterschiedliche Muster an Zellpopulationen im Urin. Abschnitt 4.2 zeigte bereits, dass sich die Größe der T-Zell-Population und der Podozytenpopulation in den Gruppen unterscheiden. Als logische Schlussfolgerung wurde daher evaluiert, ob eine Kombination der Zellpopulationen in Form eines Quotienten einen diagnostischen Mehrwert bringt. Wird die Anzahl der CD4-positiven T-Zellen durch die Podozyten geteilt, zeigte sich ein signifikant erhöhter Quotient in Patient*innen mit Rejektion (TCMR und ABMR) im Vergleich zu Patient*innen ohne Rejektion ($p < 0,05$). Dieser Quotient beschreibt demnach die Anzahl der CD4-positiven T-Zellen, die sich pro Podozyt im Urin detektieren ließ.

Patient*innen mit TCMR hatten einen signifikant höheren Quotienten als Patient*innen der Gruppe No RX ($p < 0,05$) und als Patient*innen der Kontrollgruppe ($p < 0,01$). Wurde im Biopsieergebnis eine ABMR beschrieben, fanden sich im Urin der Patientengruppe signifikant mehr T-Zellen pro Podozyten als bei Patient*innen ohne Rejektion ($p < 0,01$) und als in den Urinproben der Patient*innen der Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Allerdings trennte der Quotient nicht die Gruppen TCMR und ABMR voneinander.

Die Berechnung der ROC-Kurve zur Bewertung des Quotienten und der Darstellung der Effizienz der Ratio und der Fehlerrate zeigte eine deutliche Trennung der Patient*innen mit Abstoßungsreaktion (TCMR und ABMR) von Patient*innen mit Transplantatverschlechterung ohne Abstoßung in der Biopsie (AUC 0.83 für CD4-positive T-Zellen/ Podozyten). In Abbildung 8 ist ebenfalls die ROC-Kurve für die kombinierten Gruppen TCMR plus ABMR und No RX plus Kontrollgruppe dargestellt.

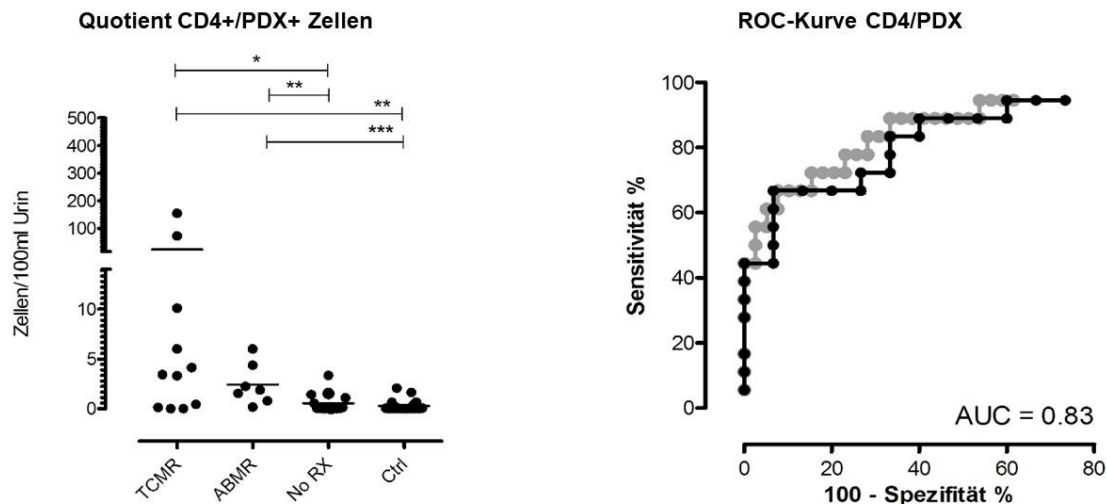


Abbildung 8: Quotient Biomarkerkombination

Erhöhter CD4/Podozyten-Quotient in Patient*innen mit Transplantatabstoßung und zugehörige ROC-Kurve für die Biomarkerkombination. Patient*innen wurden anhand ihrer histologischen Diagnose der entsprechenden Gruppe zugeteilt. Eine Kontrollgruppe mit nierentransplantierten Patient*innen wurde ebenfalls analysiert und hier gezeigt. Die ROC-Kurve zeigt die Gruppen TCMR und ABMR versus No RX (schwarz) und TCMR und ABMR versus No RX und die Kontrollgruppe (grau). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. No RX, No Rejection/keine Rejektion, TCMR, T cell-mediated rejection/ T-Zell-vermittelte Rejektion; ABMR, Antibody-mediated rejection/Antikörper-vermittelte Rejektion; Ctrl, Control/Kontrollgruppe, PDX, Podocalyxin; ROC, receiver operating characteristic; AUC, area under the curve.

4.6 Zellpopulationen im Urin bei frischtransplantierten Patient*innen zeigen keine eindeutigen Unterschiede für die Verlaufsbeurteilung

Eine weitere Kohorte nierentransplantierten Patient*innen wurde auf die beschriebene Weise als sogenannte „Frischtransplantierten-Kohorte“ untersucht. Es handelte sich hierbei um frischtransplantierte Patient*innen, von denen der Urin zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transplantation als Längsschnittstudie analysiert wurde. Die Urinanalyse wurde in fünf Messzeitpunkte nach NTX eingeteilt:

- Messpunkt 1: 1-2 Tage nach NTX
- Messpunkt 2: 3-5 Tage nach NTX
- Messpunkt 3: 6-10 Tage nach NTX
- Messpunkt 4: 11-35 Tage nach NTX
- Messpunkt 5: 36-60 Tage nach NTX.

Die Patient*innen dieser Kohorte wurden in zwei Gruppen geteilt, je nach Verlauf nach der Transplantation. Die Gruppen lauteten „Gute Funktion“, für Patient*innen mit guter Funktionsaufnahme des Transplantates, sowie „DGF/PC“ für „Delayed Graft Function“ und „Problematic Course“, also Patient*innen mit verzögerter Funktionsaufnahme des Transplantats, bzw. problematischem Verlauf nach Transplantation.

Die Untersuchung der Zellpopulationen zeigte eine große Heterogenität für die Zellquantitäten bei den analysierten Patient*innen. In der Analyse der beiden Gruppen zeigte sich, dass die Makrophagen-Population im Urin an Messpunkt 3 (Tag 6-10 nach Transplantation) bei Patient*innen mit DGF/PC signifikant größer ist ($p < 0,05$) (Abbildung 9.B). Ansonsten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 9.A-D). Die Populationen der Makrophagen im Urin zeigten die Tendenz, bei Patient*innen mit verzögerter Funktionsaufnahme bzw. problematischem Verlauf bis Tag 11 erhöht zu sein.

Die CD4-positiven T-Zellen zeigten eine wechselseitige Entwicklung über die Zeitspanne betrachtet, da Patient*innen mit guter Funktionsaufnahme zum zweiten Messpunkt eher höhere Werte hatten als Patient*innen mit DGF/PC, an Messpunkt 1 und 3 jedoch die Patient*innen mit DGF/PC die größeren Population aufwiesen.

Ebenfalls zeigte sich die Tendenz erhöhter Podozyten im Urin bei Patient*innen mit DGF/PC in den ersten zehn Tagen nach NTX im Vergleich zu Patient*innen mit guter Funktion, welches sich dann ab Tag 10 zu invertieren scheint.

Der Quotient aus CD4-positiven T-Zellen und Podozyten zeigte bis Tag 11 nach NTX erhöhte Werte bei Patient*innen mit guter Funktion, was im längeren Verlauf ab Tag 36 nach NTX ebenfalls der Trend zu sein scheint.

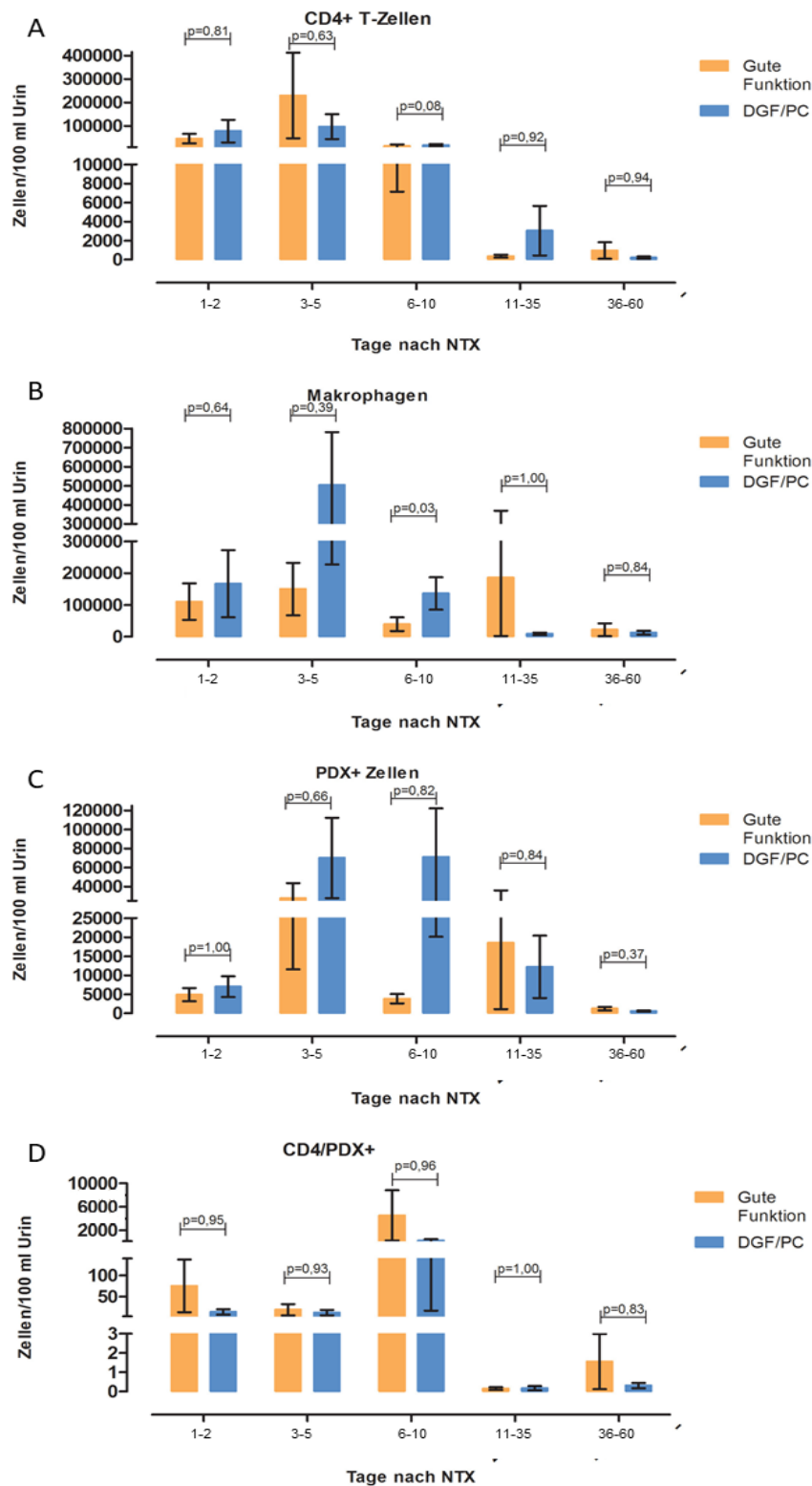


Abbildung 9: Verlaufsanalyse

Verlaufsanalyse von Zellpopulationen im Urin in frischtransplantierten Patient*innen (Frischtransplantierten-Kohorte). A: CD4-positive T-Zellen im Urin im Vergleich und im Verlauf (Median, SEM). B: Makrophagen im Urin im Vergleich und im Verlauf (Median, SEM). C: Podozyten im Urin im Vergleich und im Verlauf (Median, SEM). D: Quotient CD4-positive T-Zellen/Podozyten im Vergleich und im Verlauf (Median, SEM). Patient*innen wurden anhand ihrer Funktionsparameter den Gruppen „Gute Funktion“ (orange) oder „DGF/PC“ (blau) zugeteilt. DGF, Delayed Graft Function/Verzögerte Transplantatsfunktionsaufnahme; PC, Problematic Course/Problematischer Verlauf; NTX, Nierentransplantation; PDX, Podocalyxin.

5 Diskussion

Bei der Betreuung nierentransplantierte Patient*innen ist nach wie vor die Transplantatabstoßung und mit ihr einhergehend der Funktionsverlust des Transplantats eine große Besorgnis und zugleich ein unvermeidbares Risiko dieser Therapie. Das suffiziente Monitoring spielt daher in der Transplantationsmedizin eine große Rolle. Der Entwicklung von in der Klinik pragmatisch anwendbaren Biomarkern zum Monitoring der Transplantatfunktion kommt daher ein essenzielles Interesse für die Diagnostik und Therapieeinstellung der Patient*innen zu. Hierbei sind letzten Endes die Sensitivität, Spezifität, sowie das Vermeiden von Invasivität und damit einhergehenden Risiken die ausschlaggebenden Kriterien für eine zukünftige und schnelle Translation in die klinische Praxis.

In dieser Arbeit wurde das Potential von Immunzellen und Podozyten im Urin, gemessen mittels Durchflusszytometrie, als Biomarker für Transplantatabstoßung und Verlaufparameter in frischtransplantierten Patient*innen analysiert. Während einzelne Zellpopulationen nur moderate Unterschiede in Patient*innen mit Rejektion zeigten, konnte durch einen Quotienten von CD4-positiven T-Zellen zu Podozyten eine Separation der Patient*innen mit akuter Abstoßung von jenen ohne Abstoßungsreaktion erreicht werden. Zur Verlaufsbeurteilung nach Transplantation konnte keine eindeutige Tendenz der Quantität von Urinzellen erkannt werden.

5.1 T-Zellen als Biomarker im Urin

Die Analyse von T-Zellen im Urin durch Durchflusszytometrie als Mittel für Monitoring und Diagnostik wurde von einigen Autoren für unterschiedliche Erkrankungen mit Nierenpathologien bereits beschrieben und führte zu der Erkenntnis, dass T-Zell-Populationen intrarenale Inflammation widerzuspiegeln scheinen.

Bereits 1992, als die Markierungsmethoden für Zelloberflächenmarker bei Weitem noch nicht so etabliert waren wie zur heutigen Zeit, beschrieben *Lee et al.* die durchflusszytometrische Analyse von Urinzellen als schnelle und nicht-invasive Methode für die Überwachung von Nierentransplantaten und stellten eine prozentuale Zunahme von Leukozyten in Patient*innen mit akuter Rejektion fest.⁴²

Auch *Nanni-Costa et al.* analysierte damals schon Urinzellen mit Durchflusszytometrie. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass transplantierte Patient*innen mit akuter Rejektion eine größere Anzahl an Zellen im Urin zeigen als Patient*innen mit stabiler Nierenfunktion. Hierbei dominieren Lymphozyten, welche weiter Anhand ihrer Oberflächenmarker charakterisiert wurden und im Urin von Patient*innen mit akuter Rejektion unter anderem zytotoxische und CD8-positive T-Zellen zu finden waren.⁴⁵

Die Quantifizierung von Lymphozyten im Urin mit Durchflusszytometrie wurde auch von *Yu et al.* als Methode zur Verlaufsbeurteilung bei nierentransplantierten Patient*innen zur Detektion von akuter tubulärer Nekrose und akuter Rejektion, zusätzlich zur Standarddiagnostik mittels Biopsie, vorgestellt. Die Arbeitsgruppe setzte einen Grenzwert von unter 10% Lymphozyten und 15% Granulozyten im Urin als Normwert und beschrieb die Ergebnisse als bedeutend negativ prädiktiv für akute tubuläre Nekrose und schwächer positiv prädiktiv für eine akute Transplantatabstoßung.⁴⁷

Galante et al. haben das Problem der Diagnostik einer Rejektion mittels Biopsie adressiert und das Ziel verfolgt, im Urin Parameter für die Einstellung der immunsuppressiven Therapie zu finden, da sie von der Prämisse ausgingen, dass eine präventive Therapie besser für das Transplantatüberleben sei, als die Behandlung einer stattgehabten Rejektion. Sie verglichen hierbei Durchflusszytometrie mit real time PCR und detektierten unterschiedliche Marker auf T-Zellen in signifikant höherer Anzahl bei Patient*innen mit Abstoßungsreaktion und legten damit die T-Zell-Analyse als Methode zum Monitoring nahe.⁴⁶

Unabhängig von der Nierentransplantation wurden urinäre T-Zellen auch in anderen nephrologischen Krankheitsbildern als Biomarker analysiert.

CXCR3-positive T-Zellen konnten durchflusszytometrisch im Urin als Biomarker bei Patient*innen mit Lupusnephritis nachgewiesen werden und korrelierten mit dem Vorhandensein von CXCR3-positiven T-Zellen in der jeweiligen Nierenbiopsie.⁴⁴ Hierdurch lässt sich schlussfolgern, dass die T-Zell-Analyse intrarenale Phänotypen widerspiegelt.

Unsere Arbeitsgruppe konnten in Vorarbeiten ebenfalls zeigen, dass die T-Zell-Analyse zur Diagnostik und zum Monitoring des Therapieansprechens bei Patient*innen mit Lupusnephritis angewendet werden kann. Ein Grenzwert von $\geq 800/100$ ml CD4-positiven T-Zellen im Urin wurde als hervorragender Marker für aktive Lupusnephritis bestimmt.

Unter der Therapie zeigte eine Gruppe der Patient*innen rückläufige CD4-positive T-Zell-Populationen im Urin, was mit weniger Krankheitsaktivität durch das Therapieansprechen und besserer Nierenfunktion einherging. Patient*innen mit unverändert großen T-Zell-Populationen zeigten einen schlechteren Verlauf.⁴³

Eine weitere Studie zeigte, dass CD8-positive T-Zellen im Urin Patient*innen mit aktiver von Patient*innen mit inaktiver Lupusnephritis voneinander separieren. Erhöhte Werte an CD8-positiven T-Zellen im Urinsediment waren in Patient*innen mit aktiver Lupusnephritis zu finden, welche durch eine Nierenbiopsie bestätigt wurde. Nach Remissionsinduktion zeigte sich eine Abnahme der CD8-positiven T-Zellen im Sediment. Als Biomarker wurde diese Zellanalyse insbesondere für Patient*innen mit zuvor stattgehabter Nierenbeteiligung beschrieben.⁶³ Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Urinzellen intrarenale Inflammation reflektieren.

Bei Patient*innen mit ANCA-assoziierten Vaskulitiden ließ sich ebenfalls darstellen, dass CD4-positive T-Zellen bei Nierenbeteiligung in die Niere immigrieren und dadurch größere T-Zell-Populationen im Urin messbar sind, was zur Krankheitsaktivitätsanalyse genutzt werden kann. Mit der T-Zell-Migration einhergehend, wurden bei Patient*innen mit aktiver Erkrankung im Blut niedrigerer CD4-positive T-Zellen detektiert als bei Patient*innen ohne Nierenbeteiligung oder Patient*innen in Remission. Diese Reziprozität scheint eine Bestätigung der T-Zell Migration in das Nierengewebe und direkte Beeinflussung des Biomarkers durch die Inflamationsaktivität zu sein.⁶⁴

All diese Studien beschreiben das Potential der Urinanalyse im Hinblick auf Leukozyten/Lymphozyten/T-Zellen als Biomarker in nephrologischen Patient*innen. Es zeigt sich jedoch bei Betrachtung der aktuellen Studienlage, dass die Untersuchung einer einzelnen Zellpopulation nicht die gewünschte Sensitivität und Spezifität zeigt, wie sie zur Einführung in den klinischen Anwendungsbereich nötig wäre. Daher folgte diese Arbeit der Überlegung, sowohl T-Zellen als auch Kombinationen von Zellpopulationen mit T-Zellen als Biomarker zu untersuchen, um dadurch eine präzise Trennung verschiedener Diagnosen zu ermöglichen.

5.2 Podozyten als Biomarker im Urin

Podozyten und ihre Fragmente wurden schon in mehreren Arbeiten als Biomarker für Nierenerkrankungen beschrieben. Der Urin von Patient*innen mit diabetischer

Nephropathie wurde auf mRNA verschiedener podozytenassoziiierter Moleküle, unter anderem Podocalyxin, mittels Real Time PCR untersucht und zeigte erhöhte Werte der Moleküle in diabetischer Nephropathie, sodass die Quantifikation von podozytären Molekülen in dieser Erkrankung als möglicher Biomarker gilt.⁶⁵ Unter anderem konnte gezeigt werden, dass die Moleküle Podocin, Synaptopodin und Nephrin, welche sämtlich mit Podozyten assoziiert sind, im Urin von Patient*innen mit Lupusnephritis signifikant erhöht sind und ein Marker für die Krankheitsaktivität und die Einschränkung der Nierenfunktion sein könnten.⁶⁶

Bei nierentransplantierten Patient*innen wurde die mRNA von Podocin im Urin nach Transplantation analysiert und die Hypothese aufgestellt, dass ein erhöhter Podozytenverlust über den Urin durch den Podozytenstress aufgrund der Nierentransplantation ausgelöst wird.⁶⁷ Podocalyxin wird von Podozyten exprimiert und spielt in ihrer Entwicklung eine essentielle Rolle für die Formation und Erhaltung der Fußfortsätze.⁵⁷ Daher scheint Podocalyxin als Biomarker für Podozyten im Urin ein geeigneter Marker zu sein. *Nakamura et al.* beschrieben bereits Podocalyxin-positive Zellen, durch Immunfluoreszenzmikroskopie quantifiziert, als Biomarker für aktive Lupusnephritis. Sie zeigten des Weiteren, dass die Anzahl der Podozyten im Urin nach der Therapie mit Glukokortikoiden abnimmt.⁶⁸ Auch bei Patient*innen mit aktiver Glomerulonephritis zeigte die Analyse von Podocalyxin-positiven Elementen mittels Durchflusszytometrie die Krankheitsaktivität an und beschreibt bereits die Podozytenanalyse im Urin mit der dargestellten Methode.⁴⁸

Vor diesem Hintergrund wurden in der vorgelegten Studie Podocalyxin-positive Elemente als Surrogat für Podozyten bei nierentransplantierten Patient*innen mit Verdacht auf Rejektion und nach jüngster Nierentransplantation quantifiziert und diese Methode für die Anwendung bei Patient*innen mit Nierentransplantation etabliert. Eine Herausforderung in der Podozytenquantifizierung auf diese Weise bleibt allerdings die Tatsache, dass Podocalyxin zwar für Podozyten ein passender Marker zu sein scheint, aber mit dem Defizit einhergeht, nicht nur von Podozyten exprimiert zu werden. Glykoformen von Podocalyxin wurden in anderen Gewebearten, in Krebszellen, in embryonalen und in induzierten pluripotenten Stammzellen nachgewiesen.⁶⁹ Zudem gestaltete sich die Analyse der Podozytenpopulation in dieser Studie als anspruchsvoll, da im Gegensatz zu den Immunzellen teilweise keine klaren Populationen zu identifizieren waren, sondern einzelne PDX-positive Elemente mit unterschiedlicher Größe und Dichte detektiert

wurden, was insbesondere bei Patient*innen mit wenig Urinzellen der Fall war. Daher sind die in dieser Arbeit Podocalyxin-positiven Zellen ein Surrogat für Podozyten und mit Vorsicht als Podozytenpopulation zu interpretieren.

5.3 Korrelation der Biomarker mit Biopsieergebnissen

Die Hypothese, dass Immunzellen im Urin mit histologischen Elementen korrelieren, wurde durch einen Vergleich mit den Bewertungskriterien der BANFF-Klassifikation von 2013 untersucht. Es konnte bestätigt werden, dass Immunzellen histologisch festgestellte Inflammation reflektieren. So zeigte sich, dass Makrophagen und T-Zellen mit diagnostizierter Tubulitis korrelieren und dass Makrophagen eine interstitielle Entzündung widerspiegeln. Die Bedeutung einer negativen Korrelation von Makrophagen mit histologischer Glomerulokapillaritis ist derweilen unklar. Die negative Korrelation von Podozyten mit chronischer Transplantatglomerulopathie ließe sich demgegenüber möglicherweise auf die Weise interpretieren, dass es in niedrigeren Stadien der Transplantatglomerulopathie zur Schädigung und dem damit einhergehenden Verlust von Podozyten über den Urin kommt, während in fortgeschritteneren Stadien bereits der fibrotische Umbau stattgefunden hat und die Podozytenanzahl in großem Maße reduziert ist. Die Ursache für eine negative Korrelation von Podozyten mit Glomerulitis ist zum jetzigen Zeitpunkt ebenfalls unklar.

5.4 Interpretation der Unterschiede der Gesamtzellzahlen in der Biopsiekohorte

In der Annahme, dass eine Rejektion mit vermehrter Zerstörung und damit Ausscheidung von Zellen über den Urin einhergeht, erschien die Gesamtzellzahlverteilung der Biopsiekohorte überraschend. Dass die höchste Gesamtzellzahl bei Patient*innen ohne Bestätigung einer Transplantatabstoßung in der Biopsie detektiert wurde, war nicht vermutet worden. Jedoch muss bei der Interpretation bedacht werden, dass diese Patient*innen ebenfalls intrarenale Pathologien aufweisen und aufgrund des klinischen Verdachts einer Abstoßungsreaktion biopsiert wurden. Das heißt, dass diese Patient*innen keineswegs klinisch gesund waren und andere Prozesse, abgesehen von einer Rejektion, die erhöhte Absonderung von Zellen in den Urin als Folge haben können.

Für Podozyten wurde eine solche erhöhte Podozytenabsonderung bereits als Prozess der Anpassung bei einer Nierentransplantation als Übergangsprozess von einer

Versorgung des Organismus von zwei Nieren auf die alleinige Versorgung durch das von nun an isoliert arbeitende Transplantat beschrieben.⁶⁷ Dennoch ist dies eine Vermutung, welche das gegenwärtig teilweise unklare Ergebnis interpretiert.

Im Übrigen bestätigte die Studie jedoch die Erwartungen und es zeigte sich die größte Menge an T-Zellen bei Patient*innen mit zellulärer Rejektion. Im Urin von Patient*innen mit antikörpervermittelter Abstoßung waren die untersuchten Zellpopulationen erwartungsgemäß niedrig.

5.5 Anwendung der Biomarker in der klinischen Praxis für Patient*innen mit Verdacht auf Rejektion

Die Analyse von Urinzellen mit Durchflusszytometrie bei Patient*innen mit Verdacht auf Abstoßungsreaktion hat großes Potential für die Diagnostik im Klinischen Alltag. Die Diagnostik könnte sich auf diese Weise schneller und nicht-invasiv gestalten, zumal Urin bei nierentransplantierten Patient*innen standardgemäß auf Proteinurie und Kreatinin im Urin analysiert wird. Daher ist die Probenakquise bereits in der Klinik integriert. Des Weiteren könnte die Methode zur individuellen Anpassung der immunsuppressiven Therapie herangezogen werden.

Einzelne Zellpopulationen zeigten in dieser Arbeit eine nur mäßige Separation der Patient*innen mit Rejektion von jenen ohne Rejektion. Daher lautet die Schlussfolgerung, dass die Biomarkerkombination eine präzisere Diagnostik erlauben könnte. Dadurch, dass Patient*innen ohne Abstoßung quantitativ mehr Podozyten, jedoch weniger T-Zellen im Urin aufweisen als Patient*innen mit Rejektion, erlaubt der Quotient aus T-Zellen durch Podozyten die Stratifizierung von Patient*innen. Die Risiken, welche mit einer Biopsie einhergehen, ließen sich eventuell vermeiden. Zum aktuellen Zeitpunkt wäre es aber zu vorschleunigend, die Biopsie durch die Urin-Durchflusszytometrie vollständig zu ersetzen. Eine weitere unabhängige Bestätigungsstudie mit größerer Patientenzahl sollte zu diesem Zweck durchgeführt werden und ist bereits in Planung. Dabei könnte zusätzlich das Therapieansprechen bei einer Abstoßungstherapie analysiert werden. Die Fallzahlberechnung für diese Bestätigungsstudie zur Rejektions-Prädiktion mit Biomarkern mit einer Sensitivität von 80% und einer Spezifität von 90% ergab das Ergebnis, dass der Einschluss von 295 Patient*innen erfolgen muss. Die Grundlage der Berechnung war eine Festlegung der Power auf 80% und ein adjustiertes

Signifikanzniveau (aufgrund der Messung mehrerer Marker) von $\alpha^*=0.016$. Positive Ergebnisse der geplanten Bestätigungsstudie von 295 Patient*innen vorausgesetzt, könnte die etablierte Methode zunächst zum Beispiel dazu angewendet werden, um Patient*innen auszuwählen, bei welchen eine Biopsie indiziert scheint. Nierentransplantierte Patient*innen, welche also mit klinischen Hinweisen und einem Kreatininanstieg heute umgehend eine Nierenbiopsie erhalten, könnten zuerst eine Urinprobe für die durchflusszytometrische Untersuchung abgeben. Innerhalb weniger Stunden würde die Untersuchung der Zellpopulationen im Urin vorliegen und anhand eines erhöhten Quotienten von T-Zellen durch Podozyten die Entscheidung zu Biopsie getroffen werden. Patient*innen mit niedriger Anzahl von T-Zellen pro Podozyten im Urin könnten zunächst in erweitertem Maße andere diagnostische Methoden vorgeschlagen werden, zum Beispiel ausgedehnte Blutuntersuchungen auf Virusinfektionen oder die erweiterte Fokussuche nach extrarenalen Erkrankungen als Grund für die Transplantatfunktionsverschlechterung. Eine solche Translation der Ergebnisse könnte nicht notwendige Biopsien und damit einhergehende Risiken für Patient*innen und Transplantate vermeiden.

5.6 Biomarker zur Funktionsprognose und Verlaufsbeurteilung

In dieser Arbeit wurde darüber hinaus untersucht, ob sich die Durchflusszytometrie von Urinzellen für Prognosen für die Funktionsaufnahme eines Nierentransplantats und zur Beurteilung des Verlaufs unmittelbar nach einer Nierentransplantation eignet. Die Analyse des Urins als Längsschnittstudie von frischtransplantierten Patient*innen zeigte heterogene Ergebnisse bei Betrachtung der Zellpopulationen. Eine Trennung von Patient*innen mit guter Funktionsaufnahme von solchen mit verzögerter Funktionsaufnahme bzw. problematischem Verlauf erwies sich als schwierig. Die analysierten Zellpopulationen zeigten keine bedeutenden signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen und ein Muster in der Entwicklung der Populationsgrößen von Urinzellen konnte nicht erkannt werden.

Die Erwartung, dass Patient*innen mit verzögerter Funktionsaufnahme oder anderen Komplikationen größere Mengen an Immunzellen und Podozyten im Urin ausscheiden, ließ sich nicht bestätigen, jedoch auch nicht ausschließen. Eine Schwierigkeit liegt

sicherlich in der Tatsache, dass durch die Transformation von der Transplantatniere auf ein von nun an alleinig arbeitendes Organ, unabhängig davon, wie sich der Verlauf der Funktionsaufnahme gestaltet, intrarenale Umstrukturierungen stattfinden. Solche Umstrukturierungen konnten für die Podozyten nach Transplantation schon gezeigt werden und frischtransplantierte Patient*innen zeigten (unabhängig vom Verlauf) durchschnittlich sechsfach erhöhte Podozytenmengen im Urin im Vergleich zu Kontrollen mit zwei Nieren.⁶⁷ Dies ließ sich in unseren Untersuchungen ebenfalls nachweisen.

Es lassen sich mehrere Überlegungen für das gezeigte Ergebnis anführen. Zum einen scheint die Nierentransplantation als solche und damit die Zeit kurz nach der Transplantation eine instabile Transitionszeit zu sein, in der sich komplexe intrarenale Prozesse abspielen, welche schwer darzustellen und zu detektieren sind. Zum anderen lässt sich daher möglicherweise zu solch einem frühen Zeitpunkt nach Transplantation keine prognostische Aussage ermitteln, da die Entwicklung des Transplantats auf vielen Variablen beruht. Die Urinanalyse gestaltet sich zu diesem Zeitpunkt ebenfalls schwierig, da viele Patient*innen eine Makrohämaturie aufweisen und der Urin stets durch einen Blasenkatheter abläuft, was mit erhöhter Kontaminierung einhergeht. Durch den operativen Eingriff wurde an den ableitenden Harnwegen manipuliert, sodass hierdurch zusätzliche Fragmente im Urin detektierbar sein könnten. Daneben könnte die Auswahl der hier analysierten Marker nicht suffizient für diese Patientenkohorte sein. Andere Zellpopulationen könnten auch durch Durchflusszytometrie quantifiziert werden und eventuell mehr Aufschluss geben, zum Beispiel proximale und distale Epithelzellen, B-Zellen oder andere Marker für T-Zellen (zum Beispiel ICAM, CXCR3) oder weitere Marker für Podozyten (Podocin, Nephtrin). Daher lässt sich zusammenfassen, dass die Methode zur Verlaufsbeurteilung bei Nierentransplantierten weitere Etablierung bedarf und für die Translation in die Klinik noch nicht reif ist. Weitere explorative Studien sind hier definitiv empfehlenswert, da die Methode für diese Patientenkohorte ebenfalls eine vielversprechende Monitoringmethode darstellen könnte.

5.7 Durchflusszytometrie von Urin als Monitoringmethode für nierentransplantierte Patient*innen

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit die Quantifizierung von Urinzellen mittels Durchflusszytometrie als geeignete Methode für das Monitoring von nierentransplantierten Patient*innen dargelegt. Der Nachweis größerer T-Zell-

Populationen bei Patient*innen mit T-Zell-vermittelter Transplantatrejektion bestätigen die Hypothese, dass sich intrarenale Prozesse im Urin widerspiegeln und analysierbar sind. Makrophagen und Podozyten sind ebenfalls durch die etablierte Methode nachweisbar, lassen sich aber nur bedingt einzelnen Pathologien zuordnen. Die Bedeutung der Unterschiede in jenen Populationen bleibt zum aktuellen Zeitpunkt unklar. Die Kombination aus T-Zellen und Podozyten in Form eines Quotienten erlaubt die Trennung von Patient*innen mit Abstoßungsreaktion von jenen ohne Rejektion und stellt damit eine geeignete Biomarkerkombination für die non-invasive Diagnostik und das Monitoring von nierentransplantierten Patient*innen dar.

Prognosen bezüglich des Verlaufs oder der Funktionsaufnahme bei frischtransplantierten Patient*innen lassen sich mit der Methode noch nicht treffen und bedürfen weiterer Studien zur Etablierung.

Schlussendlich ließ sich eine Methode mit großem Potential für den klinischen Nutzen zum Monitoring entwickeln, welche die Diagnostik bei nierentransplantierten Patient*innen innovieren kann. Eine schnellere und nicht-invasive Möglichkeit, Patient*innen mit Abstoßung von jenen ohne Transplantatabstoßung stratifizieren zu können, wird in dieser Arbeit vorgestellt. Eine Bestätigungsstudie ist vor der Einführung in den klinischen Alltag erforderlich und bereits geplant. Eine Fallzahlberechnung hat stattgefunden und weitere Aspekte des Transplantatmonitorings könnten in diese geplante Studie integriert werden. So möchten wir herausfinden, ob sich anhand der Biomarker bei Rejektion eine Vorhersage über die Transplantatfunktion nach sechs Monaten nach Rejektion treffen lässt. Des Weiteren werden wir qualitative Merkmale zu den aktuellen Markern hinzunehmen. Die urinären T-Zellen könnten anhand CCR7, HLA-DR und CD28 genauer charakterisiert werden und möglicherweise Rückschlüsse auf die Aktivierung der T-Zellen getroffen werden. Ebenfalls ist geplant, Epithelzellen im Urin mittels der beschriebenen Technik zu analysieren. Wir konnten mit gleicher Methode bereits Epithelzellen im Urin nachweisen und mittels CD10 und CD236 auf proximale oder distale Tubulusherkunft analysieren. Weitere interessante Marker wären hier auch CD13, KIM-1 und NGAL. Zusätzlich sollte die Podozytenanalyse im Urin weiter etabliert werden. Hier wäre eine Integration von Podocin, Nephrin und Synaptopodin in die aktuellen Analysen eine Möglichkeit. Eine weitere Studie zur genaueren Charakterisierung der Podozyten oder Podozytenfragmente im Urin sollte neben der Bestätigungsstudie geplant werden.

Zusammenfassend lässt sich schließen, dass die beschriebene Monitoringmethode schon zeitnah in der Klinik eingeführt werden und so eine Entscheidungshilfe bieten könnte, welche Patient*innen biopsiert werden sollten und welche nicht. Auf diese Weise könnte vielen Patient*innen zumindest eine unnötige Biopsie mit Blutungsrisiko, bis hin zum möglichen Transplantatverlust durch Schädigung bei Biopsie, erspart bleiben, was mit einer erhöhten Lebensqualität nierentransplantierte Patient*innen einherginge.

Die in dieser Arbeit beschriebene Ratio aus T-Zellen und PDX-positiven Zellen zur Diagnostik einer Nierentransplantat-Rejektion wurde als Patent des europäischen Patentamtes angemeldet (EP17190719.9).

6 Literaturverzeichnis

- 1 Wolfe, R.A., Ashby, V.B., Milford, E.L., Ojo, A.O., Ettenger, R.E., Agodoa, L.Y., Held, P.J. & Port, F.K. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* **341**, 1725-1730, doi:10.1056/NEJM199912023412303 (1999).
- 2 Purnell, T.S., Auguste, P., Crews, D.C., Lamprea-Montealegre, J., Olufade, T., Greer, R., Ephraim, P., Sheu, J., KostECKI, D., Powe, N.R., Rabb, H., Jaar, B. & Boulware, L.E. Comparison of life participation activities among adults treated by hemodialysis, peritoneal dialysis, and kidney transplantation: a systematic review. *Am J Kidney Dis* **62**, 953-973, doi:10.1053/j.ajkd.2013.03.022 (2013).
- 3 Abecassis, M., Bartlett, S.T., Collins, A.J., Davis, C.L., Delmonico, F.L., Friedewald, J.J., Hays, R., Howard, A., Jones, E., Leichtman, A.B., Merion, R.M., Metzger, R.A., Pradel, F., Schweitzer, E.J., Velez, R.L. & Gaston, R.S. Kidney transplantation as primary therapy for end-stage renal disease: a National Kidney Foundation/Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF/KDOQITM) conference. *Clin J Am Soc Nephrol* **3**, 471-480, doi:10.2215/CJN.05021107 (2008).
- 4 Stevens, P.E. & Levin, A. K. D. I. G. O. C. K. D. G. D. W. G. Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. *Ann Intern Med* **158**, 825-830, doi:10.7326/0003-4819-158-11-201306040-00007 (2013).
- 5 Mehta, R.L., Kellum, J.A., Shah, S.V., Molitoris, B.A., Ronco, C., Warnock, D.G. & Levin, A. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* **11**, R31, doi:10.1186/cc5713 (2007).
- 6 Agarwal, R. Defining end-stage renal disease in clinical trials: a framework for adjudication. *Nephrol Dial Transplant* **31**, 864-867, doi:10.1093/ndt/gfv289 (2016).
- 7 ERA-EDTA, R. Annual Report 2016. (ERA-EDTA Registry, Amsterdam UMC, location AMC, Department of Medical Informatics, Amsterdam, the Netherlands, 2018). ISBN 978-90-817480-9-4

- 8 Mange, K.C., Joffe, M.M. & Feldman, H.I. Effect of the use or nonuse of long-term dialysis on the subsequent survival of renal transplants from living donors. *N Engl J Med* **344**, 726-731, doi:10.1056/NEJM200103083441004 (2001).
- 9 Halloran, P.F. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* **351**, 2715-2729, doi:10.1056/NEJMra033540 (2004).
- 10 Meier-Kriesche, H.U., Ojo, A.O., Hanson, J.A., Cibrik, D.M., Punch, J.D., Leichtman, A.B., & Kaplan, B. Increased impact of acute rejection on chronic allograft failure in recent era. *Transplantation* **70**, 1098-1100 (2000).
- 11 Meier-Kriesche, H.U., Schold, J.D., Srinivas, T.R. & 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* **4**, 378-383 (2004).
- 12 Matas, A.J., Gillingham, K.J., Payne, W.D. & Najarian, J.S. The impact of an acute rejection episode on long-term renal allograft survival (t1/2). *Transplantation* **57**, 857-859 (1994).
- 13 Reeve, J. Sellarés, J., Mengel, M., Sis, B., Skene, A., Hidalgo, L., de Freitas, D.G., Famulski, K.S. & Halloran, P. F. Molecular diagnosis of T cell-mediated rejection in human kidney transplant biopsies. *Am J Transplant* **13**, 645-655, doi:10.1111/ajt.12079 (2013).
- 14 Colvin, R.B. Pathology of chronic humoral rejection. *Contrib Nephrol* **162**, 75-86, doi:10.1159/000170814 (2009).
- 15 Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group (Kasiske, B.L., Zeier, M.G., Craig, J.C., Ekberg, H., Garvey, C.A., Green, M.D., Jha, V., Josephson, M.A., Kiberd, B.A., Kreis, H.A., McDonald, R.A., Newmann, J.M., Obrador, G.T., Chapman, J.R., Vincenti, F.G., Balk, E.M., Wagner, M., Raman, G., Earley, A. & Abariga, S.) K. D. I. G. O. K. T. W. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant* **9 Suppl 3**, S1-155, doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02834.x (2009).
- 16 Pasala, S. & Carmody, J.B. How to use... serum creatinine, cystatin C and GFR. *Arch Dis Child Educ Pract Ed* **102**, 37-43, doi:10.1136/archdischild-2016-311062 (2017).
- 17 Wilczek, H.E. Percutaneous needle biopsy of the renal allograft. A clinical safety evaluation of 1129 biopsies. *Transplantation* **50**, 790-797 (1990).

- 18 Menon, M.C., Murphy, B. & Heeger, P.S. Moving Biomarkers toward Clinical Implementation in Kidney Transplantation. *J Am Soc Nephrol* **28**, 735-747, doi:10.1681/ASN.2016080858 (2017).
- 19 Gwinner, W. Renal transplant rejection markers. *World J Urol* **25**, 445-455, doi:10.1007/s00345-007-0211-6 (2007).
- 20 Eikmans, M. Gielis, E.M., Ledeganck, K.J., Yang, J., Abramowicz, D., & Claas, F.F.J. Non-invasive Biomarkers of Acute Rejection in Kidney Transplantation: Novel Targets and Strategies. *Front Med (Lausanne)* **5**, 358, doi:10.3389/fmed.2018.00358 (2018).
- 21 Sellarés, J. Reeve, J., Loupy, A., Mengel, M., Sis, B., Skene, A., de Freitas, D.G., Kreepala, C., Hidalgo, L.G., Famulski, K.S. & Halloran, P.F. Molecular diagnosis of antibody-mediated rejection in human kidney transplants. *Am J Transplant* **13**, 971-983, doi:10.1111/ajt.12150 (2013).
- 22 Roedder, S., Sigdel, T., Salomonis, N., Hsieh, S., Dai, H., Bestard, O., Metes, D., Zeevi, A., Gritsch, A., Cheeseman, J., Macedo, C., Peddy, R., Medeiros, M., Vincenti, F., Asher, N., Salvatierra, O., Shapiro, R., Kirk, A., Reed, E.F. & Sarwal, M.M. The kSORT assay to detect renal transplant patients at high risk for acute rejection: results of the multicenter AART study. *PLoS Med* **11**, e1001759, doi:10.1371/journal.pmed.1001759 (2014).
- 23 Lo, Y. M., Tein, M. S., Pang, C.C., Yeung, C.K., Tong, K.L., & Hjelm, N.M. Presence of donor-specific DNA in plasma of kidney and liver-transplant recipients. *Lancet* **351**, 1329-1330, doi:10.1016/s0140-6736(05)79055-3 (1998).
- 24 Bloom, R.D., Bromberg, J.S., Poggio, E.D., Bunnapradist, S., Langone, A.J., Sood, P., Matas, A.J., Mehta, S., Mannon, R.B., Sharfuddin, A., Fischbach, B., Narayanan, M., Jordan, S.C., Cohen, D., Weir, M.R., Hiller, D., Prasad, P., Woodward, R.N., Grskovic, M., Sninsky, J.J., Yee, J.P. & Brennan, D.C. Cell-Free DNA and Active Rejection in Kidney Allografts. *J Am Soc Nephrol* **28**, 2221-2232, doi:10.1681/ASN.2016091034 (2017).
- 25 Bromberg, J.S., Brennan, D.C., Poggio, E., Bunnapradist, S., Langone, A., Sood, P., Matas, A.J., Mannon, R.B., Mehta, S., Sharfuddin, A., Fischbach, B., Narayanan, M., Jordan, S.C., Cohen, D.J., Zaky, Z.S., Hiller, D., Woodward, R.N., Grskovic, M., Sninsky,

J.J., Yee, J.P. & Bloom, R.D. Biological Variation of Donor-Derived Cell-Free DNA in Renal Transplant Recipients: Clinical Implications. *The Journal of Applied Laboratory Medicine* **2**, 309-321, doi:10.1373/jalm.2016.02273 (2017).

26 Freue, G.V., Sasaki, M., Meredith, A., Günther, O.P., Bergman, A., Takhar, M., Mui, A., Balshaw, R.F., Ng, R.T., Opushneva, N., Hollander, Z., Li, G., Borchers, C.H., Wilson-McManus, J., McManus, B.M., Keown, P.A. & McMaster, W.R. Proteomic signatures in plasma during early acute renal allograft rejection. *Mol Cell Proteomics* **9**, 1954-1967, doi:10.1074/mcp.M110.000554 (2010).

27 Singh, N., Samant, H., Hawxby, A. & Samaniego, M.D. Biomarkers of rejection in kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* **24**, 103-110, doi:10.1097/MOT.0000000000000606 (2019).

28 Koscielska-Kasprzak, K., Drulis-Fajdasz, D., Kaminska, D., Mazanowska, O., Krajewska, M., Gdowska, W., Bieniecki, W., Chudoba, P., Polak, W., Janczak, D., Patrzalek, D., & Klinger, M. Pretransplantation cellular alloreactivity is predictive of acute graft rejection and 1-year graft function in kidney transplant recipients. *Transplant Proc* **41**, 3006-3008, doi:10.1016/j.transproceed.2009.07.086 (2009).

29 Crespo, E., Cravedi, P., Martorell, J., Luque, S., Melilli, E., Cruzado, J.M., Jarque, M., Meneghini, M., Manonelles, A., Donadei, C., Lloberas, N., Gomà, M., Grinyó, J.M., Heeger, P. & Bestard, O. Posttransplant peripheral blood donor-specific interferon- γ enzyme-linked immune spot assay differentiates risk of subclinical rejection and de novo donor-specific alloantibodies in kidney transplant recipients. *Kidney Int* **92**, 201-213, doi:10.1016/j.kint.2016.12.024 (2017).

30 Lefaucheur, C., Viglietti, D., Bentelejewski, C., Duong van Huyen, J.P., Vernerey, D., Aubert, O., Verine, J., Jouven, X., Legendre, C., Glotz, D., Loupy, A. & Zeevi, A. IgG Donor-Specific Anti-Human HLA Antibody Subclasses and Kidney Allograft Antibody-Mediated Injury. *J Am Soc Nephrol* **27**, 293-304, doi:10.1681/ASN.2014111120 (2016).

31 Vasconcellos, L.M., Schachter, A.D., Zheng, X.X., Vasconcellos, L.H., Shapiro, M., Harmon, W.E. & Strom, T.B. Cytotoxic lymphocyte gene expression in peripheral blood leukocytes correlates with rejecting renal allografts. *Transplantation* **66**, 562-566 (1998).

32 Suthanthiran, M., Schwartz, J.E., Ding, R., Abecassis, M., Dadhania, D., Samstein, B., Knechtle, S.J., Friedewald, J., Becker, Y.T., Sharma, V.K., Williams, N.M., Chang,

C.S., Hoang, C., Muthukumar, T., August, P., Keslar, K.S., Fairchild, R.L., Hricik, D.E., Heeger, P.S., Han, L., Liu, J., Riggs, M. & Ikle, D.N., Bridges, N.D., Shaked, A.,. Urinary-cell mRNA profile and acute cellular rejection in kidney allografts. *N Engl J Med* **369**, 20-31, doi:10.1056/NEJMoa1215555 (2013).

33 Afaneh, C., Muthukumar, T., Lubetzky, M., Ding, R., Snopkowski, C., Sharma, V.K., Seshan, S., Dadhania, D., Schwartz, J.E. & Suthanthiran, M. Urinary cell levels of mRNA for OX40, OX40L, PD-1, PD-L1, or PD-L2 and acute rejection of human renal allografts. *Transplantation* **90**, 1381-1387, doi:10.1097/TP.0b013e3181ffbadd (2010).

34 Muthukumar, T. Dadhania, D., Ding, R., Snopkowski, C., Naqvi, R., Lee, J.B., Hartono, C., Li, B., Sharma, V.K., Seshan, S.V., Kapur, S., Hancock, W.W., Schwartz, J.E. & Suthanthiran, M. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med* **353**, 2342-2351, doi:10.1056/NEJMoa051907 (2005).

35 Maluf, D.G., Dumur, C.I., Suh, J.L., Scian, M.J., King, A.L., Cathro, H., Lee, J.K., Gehrau, R.C., Brayman, K.L., Gallon, L. & Mas, V.R. The urine microRNA profile may help monitor post-transplant renal graft function. *Kidney Int* **85**, 439-449, doi:10.1038/ki.2013.338 (2014).

36 Lorenzen, J.M., Volkmann, I., Fiedler, J., Schmidt, M., Scheffner, I., Haller, H., Gwinner, W. & Thum, T. Urinary miR-210 as a mediator of acute T-cell mediated rejection in renal allograft recipients. *Am J Transplant* **11**, 2221-2227, doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03679.x (2011).

37 O'Riordan, E., Orlova, T.N., Podust, V.N., Chander, P.N., Yanagi, S., Nakazato, M., Hu, R., Butt, K., Delaney & V. Goligorsky, M.S. Characterization of urinary peptide biomarkers of acute rejection in renal allografts. *Am J Transplant* **7**, 930-940, doi:10.1111/j.1600-6143.2007.01733.x (2007).

38 Hricik, D.E. Nickerson, P., Formica, R.N., Poggio, E.D., Rush, D., Newell, K.A., Goebel, J., Gibson, I.W., Fairchild, R.L., Riggs, M., Spain, K., Ikle, D., Bridges, N.D. & Heeger, P.S. Multicenter validation of urinary CXCL9 as a risk-stratifying biomarker for kidney transplant injury. *Am J Transplant* **13**, 2634-2644, doi:10.1111/ajt.12426 (2013).

39 Rabant, M. Amrouche, L., Lebreton, X., Aulagnon, F., Benon, A., Sauvaget, V., Bonifay, R., Morin, L., Scemla, A., Delville, M., Martinez, F., Timsit, M.O., Duong Van Huyen, J.P., Legendre, C., Terzi, F. & Anglicheau, D. Urinary C-X-C Motif Chemokine 10

Independently Improves the Noninvasive Diagnosis of Antibody-Mediated Kidney Allograft Rejection. *J Am Soc Nephrol* **26**, 2840-2851, doi:10.1681/ASN.2014080797 (2015).

40 Rabant, M., Amrouche, L., Morin, L., Bonifay, R., Lebreton, X., Aouni, L., Benon, A., Sauvaget, V., Le Vaillant, L., Aulagnon, F., Sberro, R., Snanoudj, R., Mejean, A., Legendre, C., Terzi, F. & Anglicheau, D. Early Low Urinary CXCL9 and CXCL10 Might Predict Immunological Quiescence in Clinically and Histologically Stable Kidney Recipients. *Am J Transplant* **16**, 1868-1881, doi:10.1111/ajt.13677 (2016).

41 Sigdel, T.K., Kaushal, A., Gritsenko, M., Norbeck, A.D., Qian, W.J., Xiao, W., Camp, D.G., Smith, R.D. & Sarwal, M.M. Shotgun proteomics identifies proteins specific for acute renal transplant rejection. *Proteomics Clin Appl* **4**, 32-47, doi:10.1002/prca.200900124 (2010).

42 Lee, P.H., Huang, M.T. & Lee, C.S. Analysis of urine cytology by flow cytometry in renal transplantation. *Transplant Proc* **24**, 1543-1544 (1992).

43 Enghard, P., Rieder, C., Kopetschke, K., Klocke, J.R., Undeutsch, R., Biesen, R., Dragun, D., Gollasch, M., Schneider, U., Aupperle, K., Humrich, J.Y., Hiepe, F., Backhaus, M., Radbruch, A.H., Burmester, G.R. & Riemekasten, G. Urinary CD4 T cells identify SLE patients with proliferative lupus nephritis and can be used to monitor treatment response. *Ann Rheum Dis* **73**, 277-283, doi:10.1136/annrheumdis-2012-202784 (2014).

44 Enghard, P., Humrich, J.Y., Rudolph, B., Rosenberger, S., Biesen, R., Kuhn, A., Manz, R., Hiepe, F., Radbruch, A., Burmester, G.R. & Riemekasten, G. CXCR3+CD4+ T cells are enriched in inflamed kidneys and urine and provide a new biomarker for acute nephritis flares in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum* **60**, 199-206, doi:10.1002/art.24136 (2009).

45 Nanni-Costa, A., Iannelli, S., Vangelista, A., Buscaroli, A., Liviano, G., Raimondi, C., Todeschini, P., Lamanna, G., Stefoni, S. & Bonomini, V. Flow cytometry evaluation of urinary sediment in renal transplantation. *Transpl Int* **5 Suppl 1**, S8-12 (1992).

46 Galante, N.Z., Câmara, N.O., Kallas, E.G., Salomão, R., Pacheco-Silva, A., & Medina-Pestana, J.O. Noninvasive immune monitoring assessed by flow cytometry and

real time RT-PCR in urine of renal transplantation recipients. *Transpl Immunol* **16**, 73-80, doi:10.1016/j.trim.2006.03.014 (2006).

47 Yu, D.S., Sun, G.H., Lee, S.S., Wu, C.J., Ma, C.P., & Chang, S.Y. Flow-cytometric measurement of cellular changes in urine: a simple and rapid method for perioperatively monitoring patients after kidney transplantation. *Urol Int* **62**, 143-146, doi:10.1159/000030378 (1999).

48 Habara, P., Marecková, H., Sopková, Z., Malícková, K., Zivorová, D., Zima, T., & Tesar, V. A novel method for the estimation of podocyte injury: podocalyxin-positive elements in urine. *Folia Biol (Praha)* **54**, 162-167 (2008).

49 Asao, R., Asanuma, K., Kodama, F., Akiba-Takagi, M., Nagai-Hosoe, Y., Seki, T., Takeda, Y., Ohsawa, I., Mano, S., Matsuoka, K., Kurosawa, H., Ogasawara, S., Hirayama, Y., Sekine, S., Horikoshi, S., Hara, M. & Tomino, Y. Relationships between levels of urinary podocalyxin, number of urinary podocytes, and histologic injury in adult patients with IgA nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* **7**, 1385-1393, doi:10.2215/CJN.08110811 (2012).

50 Imaizumi, T., Nakatochi, M., Akiyama, S., Yamaguchi, M., Kurosawa, H., Hirayama, Y., Katsuno, T., Tsuboi, N., Hara, M. & Maruyama, S. Urinary Podocalyxin as a Biomarker to Diagnose Membranous Nephropathy. *PLoS One* **11**, e0163507, doi:10.1371/journal.pone.0163507 (2016).

51 Siedlecki, A., Irish, W. & Brennan, D. C. Delayed graft function in the kidney transplant. *Am J Transplant* **11**, 2279-2296, doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03754.x (2011).

52 Baer, P.C., Nockher, W.A., Haase, W. & Scherberich, J.E. Isolation of proximal and distal tubule cells from human kidney by immunomagnetic separation. Technical note. *Kidney Int* **52**, 1321-1331 (1997).

53 Zola, H., Swart, B., Boumsell, L. & Mason, D.Y.; IUIS/WHO Subcommittee. Human Leucocyte Differentiation Antigen nomenclature: update on CD nomenclature. Report of IUIS/WHO Subcommittee. *J Immunol Methods* **275**, 1-8 (2003).

54 Haas, M., Sis, B., Racusen, L.C., Solez, K., Glotz, D., Colvin, R.B., Castro, M.C., David, D.S., David-Neto, E., Bagnasco, S.M., Cendales, L.C., Cornell, L.D., Demetris, A.J., Drachenberg, C.B., Farver, C.F., Farris, A.B., Gibson, I.W., Kraus, E., Liapis, H.,

Loupy, A., Nickleit, V., Randhawa, P., Rodriguez, E.R., Rush, D., Smith, R.N., Tan, C.D., Wallace, W.D. & Mengel, M. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant* **14**, 272-283, doi:10.1111/ajt.12590 (2014).

55 Müller-Deile, J. & Schiffer, M. Podocytes from the diagnostic and therapeutic point of view. *Pflugers Arch* **469**, 1007-1015, doi:10.1007/s00424-017-1993-z (2017).

56 Skoberne, A., Konieczny, A. & Schiffer, M. Glomerular epithelial cells in the urine: what has to be done to make them worthwhile? *Am J Physiol Renal Physiol* **296**, F230-241, doi:10.1152/ajprenal.90507.2008 (2009).

57 Nielsen, J.S. & McNagny, K.M. The role of podocalyxin in health and disease. *J Am Soc Nephrol* **20**, 1669-1676, doi:10.1681/ASN.2008070782 (2009).

58 Achenbach, J., Mengel, M., Tossidou, I., Peters, I., Park, J.K., Haubitz, M., Ehrich, J.H., Haller, H. & Schiffer, M. Parietal epithelia cells in the urine as a marker of disease activity in glomerular diseases. *Nephrol Dial Transplant* **23**, 3138-3145, doi:10.1093/ndt/gfn235 (2008).

59 Müller-Deile, J., Kümpers, P., Achenbach, J., Park, J.-K., Mengel, M., Haller, H., & Schiffer, M. Podocalyxin-positive glomerular epithelial cells in urine correlate with a positive outcome in FSGS. *Journal of nephrology* **25**, 802-809, doi:10.5301/jn.5000068 (2012).

60 Hara, M., Yanagihara, T. & Kihara, I. Urinary podocytes in primary focal segmental glomerulosclerosis. *Nephron* **89**, 342-347, doi:10.1159/000046097 (2001).

61 Garovic, V.D., Wagner, S.J., Turner, S.T., Rosenthal, D.W., Watson, W.J., Brost, B.C., Rose, C.H., Gavrilova, L., Craigo, P., Bailey, K.R., Achenbach, J., Schiffer, M. & Grande, J.P. Urinary podocyte excretion as a marker for preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* **196**, 320.e321-327, doi:10.1016/j.ajog.2007.02.007 (2007).

62 Kandasamy, Y., Smith, R., Lumbers, E.R. & Rudd, D. Nephrin - a biomarker of early glomerular injury. *Biomark Res* **2**, 21, doi:10.1186/2050-7771-2-21 (2014).

63 Dolf, S., Abdulahad, W.H., Arends, S., van Dijk, M.C., Limburg, P.C., Kallenberg, C.G., & Bijl, M. Urinary CD8+ T-cell counts discriminate between active and inactive lupus nephritis. *Arthritis Res Ther* **15**, R36, doi:10.1186/ar4189 (2013).

- 64 Abdulahad, W.H., Kallenberg, C.G., Limburg, P.C. & Stegeman, C.A. Urinary CD4+ effector memory T cells reflect renal disease activity in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum* **60**, 2830-2838, doi:10.1002/art.24747 (2009).
- 65 Zheng, M., Lv, L.L., Ni, J., Ni, H.F., Li, Q., Ma, K.L., & Liu, B.C. Urinary podocyte-associated mRNA profile in various stages of diabetic nephropathy. *PLoS One* **6**, e20431, doi:10.1371/journal.pone.0020431 (2011).
- 66 Wang, G., Lai, F.M., Tam, L.S., Li, K.M., Lai, K.B., Chow, K.M., Li, K.T. & Szeto, C.C. Messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in urinary sediment of patients with lupus nephritis. *J Rheumatol* **34**, 2358-2364 (2007).
- 67 Yang, Y., Hodgins, J.B., Afshinnia, F., Wang, S.Q., Wickman, L., Chowdhury, M., Nishizono, R., Kikuchi, M., Huang, Y., Samaniego, M. & Wiggins, R.C. The two kidney to one kidney transition and transplant glomerulopathy: a podocyte perspective. *J Am Soc Nephrol* **26**, 1450-1465, doi:10.1681/ASN.2014030287 (2015).
- 68 Nakamura, T., Ushiyama, C., Suzuki, S., Hara, M., Shimada, N., Sekizuka, K., Ebihara, I. & Koide, H. Urinary podocytes for the assessment of disease activity in lupus nephritis. *Am J Med Sci* **320**, 112-116 (2000).
- 69 Toyoda, H., Nagai, Y., Kojima, A. & Kinoshita-Toyoda, A. Podocalyxin as a major pluripotent marker and novel keratan sulfate proteoglycan in human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Glycoconj J* **34**, 817-823, doi:10.1007/s10719-017-9801-8 (2017).

7 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Nina Görlich, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Entwicklung von Biomarkern zum Monitoring nierentransplantierter Patienten mittels Durchflusszytometrie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Nina Görlich hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation:

Nina Goerlich, Hannah Antonia Brand, Valerie Langhans, Sebastian Tesch, Thomas Schachtner, Benjamin Koch, Alexander Paliege, Wolfgang Schneider, Andreas Grützkau, Petra Reinke & Philipp Enghard;

Kidney transplant monitoring by urinary flow cytometry: Biomarker combination of T cells, renal tubular epithelial cells, and podocalyxin-positive cells detects rejection;

Scientific Reports; 2020.

Beitrag im Einzelnen:

- In Zusammenarbeit mit der Biomarker-Forschung von Hannah Antonia Brand wurden die in dieser Monographie beschriebenen Biomarker mit Hannah Antonia Brands Daten von CD8-positiven T-Zellen und Epithelzellen im Urin genutzt, um kombinierte Biomarker zu entwickeln, welche in der genannten Publikation beschrieben werden.
- Aus der Entwicklung der Methodik zur Gating-Strategie und aus der Analyse der Isotypkontrollen der Podozytenfärbung sind die Abbildungen 1 und 3 der Publikation entstanden.
- Die statistischen Analysen der Zellpopulationen sind in die Abbildung 3 eingeflossen. Die repräsentativen Biopsiebilder der Monographie wurden ebenfalls für die Abbildung 2 der Publikation verwendet. Aus den Ergebnissen der statistischen Auswertung sind die Abbildungen 4, 5 und 6 entstanden.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

8 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9 Publikation

- Nina Goerlich, Hannah Antonia Brand, Valerie Langhans, Sebastian Tesch, Thomas Schachtner, Benjamin Koch, Alexander Paliege, Wolfgang Schneider, Andreas Grützkau, Petra Reinke & Philipp Enghard. Kidney transplant monitoring by urinary flow cytometry: Biomarker combination of T cells, renal tubular epithelial cells, and podocalyxin-positive cells detects rejection. *Sci Rep* 10, 796, doi:10.1038/s41598-020-57524-7 (2020).

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei jenen bedanken, die mich in diesen herausfordernden und spannenden Jahren, in welchen diese Arbeit entstanden ist, begleitet haben.

Ich danke allen Patient*innen, die sich für diese Arbeit zur Verfügung gestellt haben.

Besonderer Dank gilt Philipp Enghard, meinem Doktorvater und Betreuer dieser Arbeit. Auf seine Unterstützung konnte ich jeder Zeit zählen, er hat es stets geschafft mich für neue Fragestellungen und Herausforderungen dieser Arbeit zu begeistern. Durch ihn habe ich große Freude an der Forschung entwickeln können und auch in herausfordernden Phasen Motivation erhalten. Er hat mich auf meinem Weg in die Nephrologie begleitet. Eine bessere Betreuung hätte ich mir nicht vorstellen können.

Bei Hannah Brand bedanke ich mich für die fruchtbare und kollegiale Zusammenarbeit.

Ich danke der Stiftung der deutschen Wirtschaft- durch mein Stipendium konnte ich mir die Zeit für diese Arbeit nehmen, mich an zahlreichen, weltweiten Kongressen beteiligen und meinen Auslandsaufenthalt an der Yale University finanzieren.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei meinen Freunden Arman, Natalie, Niko und Lisa. Sie haben meine Studienzeit außerordentlich bereichert, wussten mich zu motivieren und die Zeit abseits dieser Dissertation durchweg lebenswert zu gestalten.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung und Erziehung, durch die ich diesen spannenden Weg gehen konnte. Meinen Geschwistern, Christine & Sebastian, danke ich für ihre unendliche Liebe.

Mein größter Dank gilt meinem Partner Daniel. Ohne seine bedingungslose Liebe und Unterstützung wäre ich niemals dort hingekommen, wo ich heute bin. Selbst in Zeiten, in denen ich an mir zweifle, glaubst du an mich.