

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

DISSERTATION

Durchflusszytometrisch gemessene CD8 T-Zellen und
Tubulusepithelzellen als Urin-Biomarker für
Nierentransplantat-Abstoßung

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Hannah Antonia Brand

aus Berlin

Datum der Promotion: 5. März 2021

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Scientific Reports, 21. Januar 2020; 10(1): 796.

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

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

*geteilte Erstautorenschaft

Link: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-57524-7> (letzter Zugriff: 04.04.2020, 13:20 Uhr)

Lizenz: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.de>

Für die vorliegende Arbeit wurden gestalterische Änderungen an den Abbildungen vorgenommen und neue Abbildungen entworfen.

Patentanmeldung

Antragssteller/Inhaber: Charité – Universitätsmedizin Berlin

Titel: Urine flow cytometry as biomarker of renal diseases.

Erfinderteam: Philipp Enghard, Nina Görlich, **Hannah Antonia Brand**, Valerie Langhans, Petra Reinke.

Veröffentlichungsnummern der Patentanmeldung:

- WO2018177949 (Weltorganisation für geistiges Eigentum 04.10.2018)
- EP3602045 (Europäisches Patentamt 05.02.2020)
- US2020018748 (United States Patent and Trademark Office 16.01.2020)
- CN110506206 (Chinesisches Patentamt 26.11.2019)

Stand: 18.04.2020

ISN World Congress of Nephrology (Abstract, Poster und 10-minütiger Symposium-Vortrag)

Flow cytometric monitoring of urine among kidney transplant patients.

Hannah Brand, Nina Dworschak, Philipp Enghard.

Mexico City, 21.04.-25.04.2017

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
1 Abstract	10
1.1 Abstract in Deutsch	10
1.2 Abstract in Englisch	11
2 Einleitung	13
2.1 Was ist eine Nierentransplantat-Abstoßung?	13
2.1.1 Histopathologie	13
2.1.2 Pathophysiologie der TCMR	17
2.1.3 Pathophysiologie der ABMR	18
2.2 Monitoring nach Nierentransplantation	19
2.3 Nicht-invasive Biomarker für Nierentransplantat-Abstoßung	20
2.3.1 Biomarker im Urin	20
2.3.2 Biomarker im Blut	26
2.4 Durchflusszytometrie von Urinzellen	28
2.5 Fragestellungen	29
3 Material und Methodik	30
3.1 Einführung	30
3.2 Ethikvotum und Einverständniserklärungen	31
3.3 Technik und Auswahl der Biomarker im Urin	31
3.4 Längsschnittkohorte: Verlaufsbeobachtung nach Transplantation	32
3.4.1 Patientencharakteristika	32
3.5 Querschnittkohorte: Analyse histopathologischer Kriterien	34
3.5.1 Erläuterung zu ausgewählten Banff-Scores	34

3.5.2 Patientencharakteristika	36
3.6 Urinabnahme und Transport	40
3.7 Färbung der CD8 T-Zellen	40
3.7.1 Vorbereitung der Urinproben	40
3.7.2 Zellfärbung	41
3.7.3 Messung am Durchflusszytometer	42
3.7.4 Gating-Strategie	43
3.8 Färbung der TEC	45
3.8.1 Vorbereitung der Urinproben	45
3.8.2 Zellfixierung	45
3.8.3 Zellfärbung	45
3.8.4 Isotypkontrollen	47
3.8.5 Messung am Durchflusszytometer	47
3.8.6 Gating-Strategie	47
3.9 Präsentation der Daten und statistische Verfahren	48
3.9.1 Längsschnittkohorte	49
3.9.2 Querschnittskohorte	49
4 Ergebnisse.....	51
4.1 Längsschnittkohorte: Verlaufsbeobachtung nach Transplantation.....	51
4.1.1 Übersicht der Zellzahlen im zeitlichen Verlauf	51
4.1.2 Zellzahlen bei Patienten mit chirurgischen Komplikationen.....	51
4.1.3 Vergleich der Zellzahlen im zeitlichen Verlauf	51
4.1.4 Urinzellen als potenzielle Biomarker für Delayed Graft Function.....	55
4.2 Querschnittskohorte: Analyse histopathologischer Kriterien	57
4.2.1 Korrelationen mit histopathologischen Banff-Scores	57
4.2.2 Zellzahlen bei Verdacht auf Abstoßung.....	59
4.2.3 Zellzahlen der Kontrollgruppe.....	59
4.2.4 Urinzellen als potenzielle Biomarker für Abstoßung	61

5 Diskussion	63
5.1 Ischämie und Aktivierung des Immunsystems nach Transplantation	63
5.2 CD8 T-Zellen und TEC als Urin-Biomarker für Abstoßung.....	64
5.3 Ursachen von Komplikationen und Transplantatdysfunktion.....	68
5.3.1 Delayed Graft Function.....	68
5.3.2 No RX.....	69
5.4 Technische Herausforderungen	70
5.4.1 Hintergrundsignale	70
5.4.2 Positive Zellpopulationen.....	71
5.4.3 Multiples Testen	71
5.5 Resümee.....	72
Literaturverzeichnis	73
Eidesstattliche Versicherung	83
Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	84
Lebenslauf	85
Vollständige Publikationsliste	85
Danksagung	87

Abkürzungsverzeichnis

ABMR	antibody-mediated rejection (Antikörper-vermittelte Rejektion)
ANCA	Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	area under the curve (Fläche unter der Kurve)
Bax	BCL-2-associated X Proteine
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 Proteine
BK-Virus	Humanes Polyomavirus 1
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL2	CC-Chemokin-Ligand-2
CCL5	CC-Chemokin-Ligand-5
CCR1	C-C Chemokin-Rezeptor-Typ-1
CCR5	CC-Chemokin-Rezeptor-Typ-5
CD	Cluster of Differentiation (Unterscheidungsgruppen)
CTOT	Clinical Trial in Organ Transplantation
CXCL10	C-X-C-Motiv-Chemokin-Ligand-10
CXCL11	C-X-C-Motiv-Chemokin-Ligand-11
CXCL9	C-X-C-Motiv- Chemokin-Ligand-9
CXCR3	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor-3
DAMPs	damage-associated molecular patterns (schadensassoziierte molekulare Strukturen)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol Dihydrochlorid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DSA	donorspezifische HLA-Antikörper
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPCAM	epithelial cell adhesion molecule (epitheliales Zelladhäsionsmolekül)
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	forward scatter (Vorwärts-Streulicht)
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IFN-gamma	Interferon-gamma
IFTA	interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie
i-IFTA	Inflammation begleitet von IFTA

IL	Interleukin
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcome
KIM-1	Kidney-Injury-Molecule-1
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
miRNA	micro-ribonucleic acid (Mikro-Ribonukleinsäure)
mRNA	messenger ribonucleic acid (Messenger-Ribonukleinsäure)
NGAL	Neutrophil Gelatinase-assoziiertes Lipocalin
NKG2D	Natürlicher-Killer-Gruppe-2-Member-D
NOS2	NO-Synthase 2
PBS	phosphate-buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PI-9	Serin Proteinase Inhibitor 9
	real-time quantitative polymerase chain reaction (quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion)
qPCR	
RCF	relative centrifugal force (relative Zentrifugalbeschleunigung)
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROC	Receiver-Operating-Characteristic
RPM	revolutions per minute (Umdrehungen per Minute)
SSC	side scatter (Seitwärts-Streulicht)
TCMR	T cell-mediated rejection (T-Zell-vermittelte Rejektion)
TEC	tubular epithelial cells (Tubulusepithelzellen)
TGF-beta	Transforming-Growth-Faktor-beta
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha
u.a.	unter anderem
VEGF	vascular endothelial growth factors (vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren)
z.B.	zum Beispiel
18S rRNA	18S ribosomal ribonucleic acid (18S ribosomale Ribonukleinsäure)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Histopathologie bei Transplantatabstoßung.....	16
Abbildung 2: Ursachen und Risikofaktoren für Transplantatverlust	20
Abbildung 3: Targets aktueller T-Zell-Biomarker.....	21
Abbildung 4: Der Weg von CD8 T-Zellen und TEC in den Urin.....	29
Abbildung 5: Patientenzahlen der Kohorten	30
Abbildung 6: Gating der CD8 T-Zellen	44
Abbildung 7: Gating und Isotypkontrolle der TEC	48
Abbildung 8: Übersicht der Zellzahlen im Verlauf	52
Abbildung 9: Delayed Graft Function und chirurgische Komplikationen.....	53
Abbildung 10: Vergleich von Good Graft Function und Delayed Graft Function ..	54
Abbildung 11: ROC-Kurven zur Identifikation von Delayed Graft Function	56
Abbildung 12: Korrelationen von Urinzellen mit Banff-Scores	58
Abbildung 13: Urinzellen bei verschiedenen Diagnosen	60
Abbildung 14: ROC-Kurven zur Identifikation von Transplantatabstoßung.....	62
Abbildung 15: Vereinfachtes Schema zur Interaktion von Leukozyten und TEC ..	67
Abbildung 16: Differentialdiagnosen bei Transplantatdysfunktion	70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Spektrum potenzieller Biomarker für Abstoßung	27
Tabelle 2: Patientencharakteristika der Längsschnittkohorte	33
Tabelle 3: Anzahl analysierter Urinproben zu verschiedenen Zeiträumen	34
Tabelle 4: Patientencharakteristika der Querschnittskohorte	37
Tabelle 5: Immunsuppressiva der Querschnittskohorte	38
Tabelle 6: Laborwerte der Querschnittskohorte	39
Tabelle 7: Banff-Scores der Querschnittskohorte	40
Tabelle 8: Rezept für PBS und PBS/BSA	41
Tabelle 9: Antikörper zur Färbung der CD8 T-Zellen	42
Tabelle 10: Antikörper zur Färbung der proximalen und distalen TEC	46
Tabelle 11: Werte der ROC AUC zur Identifikation von Delayed Graft Function	56
Tabelle 12: Werte der ROC AUC zur Identifikation von Transplantatabstoßung ...	62

1 Abstract

1.1 Abstract in Deutsch

Titel: Durchflusszytometrisch gemessene CD8 T-Zellen und Tubulusepithelzellen als Urin-Biomarker für Nierentransplantat-Abstoßung.

Einleitung: Eine Abstoßung ist eine gefürchtete Komplikation nach Nierentransplantation. Die klinischen Symptome sind unspezifisch, wie auch Serum-Kreatinin als wichtigster Laborparameter zur Verlaufskontrolle. Die Diagnose gelingt bis heute nur histologisch nach Biopsie. CD8 T-Zellen und Tubulusepithelzellen (TEC) sind an den pathologischen Prozessen der Nierentransplantat-Abstoßung beteiligt. Ihre Zellpopulationen sind im Urin messbar und Biomarker-Kandidaten für das Monitoring von transplantierten Patienten.

Methodik: CD8 T-Zellen (DAPI- CD3+ CD8+), proximale TEC (CD10+ Cytokeratin intrazellulär+) und distale TEC (EPCAM+ Cytokeratin intrazellulär+) wurden mittels Durchflusszytometrie im Urin von Patienten nach Nierentransplantation bestimmt. In einer Längsschnittkohorte (n = 31) wurden Patienten mit „Guter Transplantatfunktion“ (engl. Good Graft Function) und „Verzögerter Transplantatfunktion“ (engl. Delayed Graft Function“) bis zu 110 Tage nach Transplantation untersucht. In einer Querschnittskohorte (n = 63) wurden Patienten mit Verdacht auf Abstoßung biopsiert und anhand der Histologie in die Gruppen T-Zell-vermittelte Rejektion (TCMR), Antikörper-vermittelte Rejektion (ABMR) und keine Rejektion (No RX) eingeteilt. Die Zellzahlen wurden mit Banff-Scores korreliert. Des Weiteren wurde eine klinisch unauffällige Kontrollgruppe analysiert.

Ergebnisse: Patienten mit Delayed Graft Function hatten an Tag 6-10 postoperativ mehr CD8 T-Zellen im Urin als die Vergleichsgruppe ($p < 0,5$). Interstitielle Entzündung und Tubulitis im Transplantat korrelierten mit CD8 T-Zellen im Urin (interstitielle Entzündung: Spearman $r = 0,73$; $p < 0,001$; Tubulitis: Spearman $r = 0,48$; $p < 0,05$). Patienten mit TCMR hatten mehr CD8 T-Zellen als Patienten mit ABMR ($p < 0,05$). Bei No RX waren die TEC höher als bei TCMR ($p < 0,01$), ABMR (CD10+ TEC: $p < 0,001$; EPCAM+ TEC: $p < 0,01$) und der Kontrollgruppe (CD10+ TEC: $p < 0,0001$; EPCAM TEC: $p < 0,001$). Der

beste Biomarker zur Detektion von Abstoßung waren CD10+ TEC mit einer Spezifität von 100% und einer Sensitivität von 72% (Cut-Off: <642 Zellen/100 ml; AUC = 0,91).

Schlussfolgerung: CD8 T-Zellen und TEC sind potenzielle Urin-Biomarker zur Verlaufskontrolle nach Nierentransplantation. Sie zeigten gute Ergebnisse zur Detektion von Delayed Graft Function und Transplantatabstoßung. Möglicherweise erzielen die Zellen in Kombination mit anderen Biomarkern noch bessere Ergebnisse. Zur Validierung dieser explorativen Studie sind größere Patientenzahlen erforderlich.

1.2 Abstract in Englisch

Title: Flow cytometrically measured CD8 T cells and tubular epithelial cells as urine biomarkers for kidney graft rejection.

Introduction: Rejection is a feared complication after kidney transplantation. The clinical symptoms are non-specific, as is serum creatinine as the most important laboratory parameter for monitoring. To date, the diagnosis is only possible histologically after a biopsy. CD8 T cells and tubular epithelial cells (TEC) are involved in the pathological processes of renal graft rejection. The cell populations can be measured in urine and are biomarker candidates for monitoring transplanted patients.

Methods: The presence of CD8 T cells (DAPI- CD3+ CD8+), proximal TEC (CD10+ Cytokeratin intracellular+) and distal TEC (EPCAM+ Cytokeratin intrazellular+) in the urine of patients after kidney transplantation was determined using flow cytometry. The technique of flow cytometry was used for the measurement. In a longitudinal cohort (n = 31), patients with “good graft function“ and “delayed graft function“ were examined up to 110 days after transplantation. In a cross-sectional cohort (n = 63) patients suspected of rejection were biopsied and divided into the groups T cell-mediated rejection (TCMR), Antibody-mediated rejection (ABMR) and No Rejection (No RX). The cell numbers were correlated with Banff-Scores. A clinically normal control group was also analyzed.

Results: Patients with delayed graft function had more CD8 T cells in the urine than the comparison group on day 6-10 postoperatively (p < 0,05). Interstitial inflammation and tubulitis in the graft correlated with CD8 T cells in the urine (interstitial inflammation: Spearman r = 0,73; p < 0,001; tubulitis: Spearman r = 0,48; p < 0,05). Patients with TCMR

had more CD8 T cells than patients with ABMR ($p < 0,05$). No RX had more TEC than TCMR ($p < 0,01$), ABMR (CD10+ TEC: $p < 0,001$; EPCAM+ TEC: $p < 0,01$) and the control group (CD10+ TEC: $p < 0,0001$; EPCAM TEC: $p < 0,001$). The best biomarker for the detection of rejection were CD10+ TEC with a specificity of 100% and a sensitivity of 72% (cut-off: <642 Zellen/100 ml; AUC 0,91).

Conclusion: CD8 T cells and TEC are potential urine biomarkers for follow-up after kidney transplantation. They showed good results for the detection of delayed graft function and graft rejection. In combination with other biomarkers, the cells may achieve even better results. Larger numbers of patients are required to validate this explorative study.

2 Einleitung

In dieser Arbeit sind personenbezogene Benennungen in der männlichen Form angegeben, wenn mehrere Geschlechter gemeint sind oder eine unspezifische Person beschrieben wird. Dies dient ausschließlich einem besseren Lesefluss.

Renale Abstoßung erhöht das Risiko für Dysfunktion und Verlust des Nierentransplantats.¹⁻³ Trotz verbesserter Immunsuppression tritt bei 6-10% der Nierentransplantationen noch innerhalb des ersten Jahres nach Operation eine akute Abstoßung auf.⁴ Am häufigsten beginnt sie in den ersten Wochen nach Transplantation.⁵ Daher ist eine Nachsorge mit früher Diagnosestellung und Therapieintervention erstrebenswert. Leider sind die nicht-invasiven Möglichkeiten eines gezielten Screenings eingeschränkt. Unspezifische Zeichen für Abstoßung sind ein hoher Kreatinin-, Cystatin C- und Harnstoffwert im Serum, Proteinurie, pathologische Befunde in der Nierensonografie oder klinische Symptome wie Anurie, Ödeme, Fieber, Müdigkeit und Appetitlosigkeit. Der Goldstandard zur Diagnose ist die histopathologische Untersuchung einer Nierenbiopsie. Der Eingriff erfordert Fachpersonal und oftmals eine stationäre Aufnahme im Krankenhaus. Wie bei allen invasiven Eingriffen bestehen Risiken. Die häufigsten Komplikationen einer Nierenbiopsie sind Hämaturie und Blutungen.⁶ Wichtige Kontraindikationen sind unkontrollierter Hypertonus und Blutungsneigung. Wissenschaftler sind schon lange auf der Suche nach nicht-invasiven Biomarkern in der Transplantationsmedizin. Sie sollen Abstoßung zuverlässig und frühzeitig identifizieren und das Transplantationsergebnis verbessern. Trotz vielversprechender Ansätze und weltweiter intensiver Forschung konnte noch kein idealer Biomarker gefunden werden.

2.1 Was ist eine Nierentransplantat-Abstoßung?

2.1.1 Histopathologie

Anfang der 1990er Jahre wurde die erste Banff-Klassifikation eingeführt.⁷ Ziel war eine international einheitliche Einteilung für Nierentransplantat-Abstoßungen. Die Klassifikation diente der Diagnose auf semiquantitativer histopathologischer Basis. Zu Beginn basierte die Banff-Klassifikation auf der Detektion von T-Zell-vermittelter Rejektion (engl. T-cell mediated rejection, TCMR), die damals „akute Rejektion“ genannt wurde. Antikörper-vermittelte Rejektion (engl. antibody-mediated rejection, ABMR) wurde nur am Rande erwähnt und als „hyperakute Rejektion“ bezeichnet. Im Laufe der Zeit

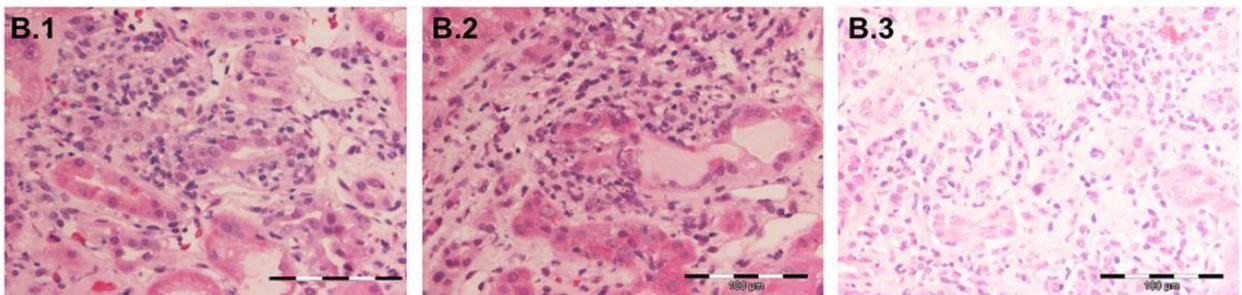
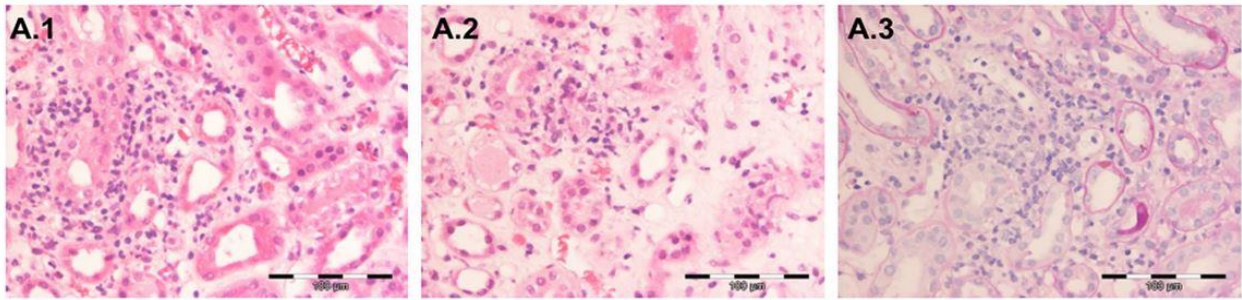
wurden die Kriterien regelmäßig überarbeitet. Die aktuelle Banff-Klassifikation setzt sich aus sogenannten „Banff Lesion Scores“ und zusätzlichen diagnostischen Parametern zusammen. Jeder Score reicht von 0-3 Punkten. Zusätzliche diagnostische Parameter sind der Klinik, Serologie, molekularen und anderen histopathologischen Untersuchungen zu entnehmen. Die Gesamtheit der erhobenen Indikatoren ergibt die Diagnose nach Banff.⁸ Kategorie 1 beschreibt eine normale Biopsie oder unspezifische Veränderungen. Kategorie 2 umfasst alle Subgruppen der ABMR. Sie werden unterteilt in aktive ABMR, chronisch aktive ABMR und chronische ABMR. Die wichtigsten Banff-Scores sind hier Glomerulitis, peritubuläre Kapillaritis und die C4d+ Färbung von Endothelzellen. C4d+ Färbung ohne Rejektionsnachweis werden in einer letzten Subgruppe zusammengefasst. Zu ihren diagnostischen Kriterien zählen intimale Arteriitis, akute thrombotische Mikroangiopathie und akute Tubulusnekrose bei Abwesenheit anderer Ursachen. Kategorie 3 beschreibt die TCMR vom Borderline-Typ. TCMR ist in Kategorie 4 zusammengefasst. Sie wird in akute TCMR (Grad I-III) und chronisch aktive TCMR (Grad I-II) unterschieden. Die wichtigsten Banff-Scores für TCMR sind interstitielle Entzündung, Tubulitis und intimale Arteriitis. Interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie (IFTA) umgeben von Inflammation (i-IFTA) ist ein Zeichen für chronisch aktive TCMR. Kategorie 5 grenzt milde, mittelgradige und schwere IFTA voneinander ab. Die letzte Kategorie 6 beschreibt andere histopathologische Veränderungen, die nicht von akuter oder chronischer Abstoßung verursacht sind. Genannt werden Nephropathien durch Humanes Polyomavirus 1 (BK-Virus), lymphoproliferative Erkrankungen nach Transplantation, Calcineurin-Inhibitor-Toxizität, akute Tubulusnekrose, Rezidiverkrankung, De-novo-Glomerulopathie, Pyelonephritis und medikamenten-induzierte interstitielle Nephritis.⁸

In der klinischen Praxis ist die histologische Interpretation oft komplex, da chronische pathologische Vorgänge die Diagnosestellung erschweren. Die zellulären Veränderungen können einer Abstoßung vorausgehen und sie bedingen, oder aber unabhängig von ihr auftreten.⁹ Letztlich stellen Biopsien nur einen Teilausschnitt zur Verteilung der Läsionen dar. Weitere Limitationen sind Fehler im Probenmaterial und Interobserver-Variabilität zwischen den Pathologen.¹⁰ Abbildung 1 zeigt histopathologische Aufnahmen bei TCMR und ABMR. Sie stammen von Studienteilnehmern, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. Die Bilder wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Wolfgang Schneider (Institut für Pathologie, Charité –

Universitätsmedizin Berlin) zur Verfügung gestellt und zusammen mit den Ergebnissen dieser Dissertation veröffentlicht.¹¹

Histopathologie bei Transplantatabstoßung

TCMR



ABMR

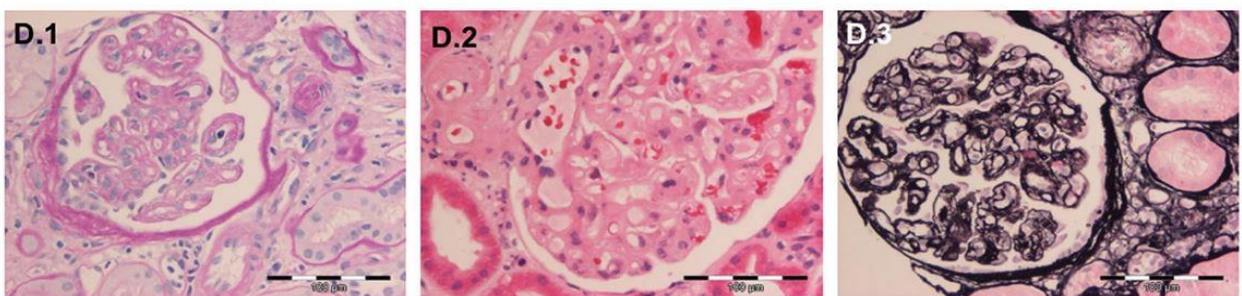
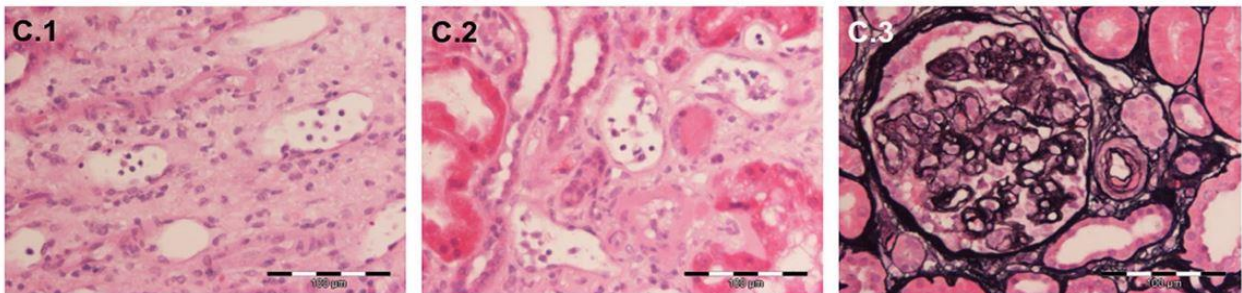


Abbildung 1: Histopathologie bei Transplantatabstoßung.

Repräsentative Nierenbiopsiebilder von Patienten der Charité. A: Borderline Läsionen suspekt für TCMR. A.1-A.2: HE; A.3: PAS. B: TCMR. B.1-B.3: HE. C-D: ABMR. C.1-C.2: HE; C.3: Jones' stain. D.1: PAS; D.2 HE; D.3 Jones' stain. HE: Hematoxylin and eosin stain; PAS: Periodic acid–Schiff reaction.

2.1.2 Pathophysiologie der TCMR

Die Alloantigene eines Transplantatspenders aktivieren 1-10% des totalen T-Zell-Repertoires des Empfängers.¹² Antigenpräsentierende Zellen sensibilisieren die T-Zellen in tertiären lymphoiden Organen des Transplantats oder in der Peripherie.^{13,14} Neben Dendritischen Zellen treten Makrophagen und B-Zellen als antigenpräsentierende Zellen auf.¹³ Die Zell-Zell-Interaktionen sind von äußeren Faktoren mit Zytokinen und Mediatoren abhängig. Die Komplementfaktoren C3a und C5a triggern ebenfalls eine Aktivierung der T-Zellen.¹⁵ Zielstrukturen der T-Zellen sind antigenpräsentierende tubuläre und endotheliale Zellen der Transplantatniere.^{13,16,17} Es werden eine direkte, indirekte und semidirekte Allogenerkennung unterschieden.

Bei der direkten Allogenerkennung wandern antigenpräsentierende Zellen des Spenders in sekundäre lymphatische Gewebe des Empfängers. Da die Lymphdrainage vom Transplantat unterbrochen ist, wandern die Zellen über die angeschlossenen Blutgefäße. Schließlich aktivieren sie die T-Zellen des Empfängers in Lymphknoten oder in der Milz.¹⁸ Bei der indirekten Allogenerkennung nehmen antigenpräsentierende Zellen des Empfängers allogene Peptide des Spenders auf, präsentieren sie auf Haupthistokompatibilitätskomplexen (engl. major histocompatibility complex, MHC) und aktivieren dann T-Zellen. Dieser Weg ist besonders im langfristigen Verlauf entscheidend, wenn die antigenpräsentierenden Zellen des Spenders nicht mehr nachweisbar sind. Bei der semidirekten Aktivierung nehmen antigenpräsentierende Zellen Membranfragmente mit Humanen Leukozyten Antigen (HLA) anderer Zellen auf und präsentieren sie T-Zellen.¹³

Antigenspezifische T-Zellen infiltrieren das Nierentransplantat und proliferieren im Interstitium. Sie können anhand immunphänotypischer Oberflächenmerkmale – genannt „Unterscheidungsgruppen“ (engl. Cluster of Differentiation, CD) – differenziert werden. Aktivierte CD4 T-Zellen setzen lösliche Mediatoren frei, wie zum Beispiel (z.B.) Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha). Er fördert die Apoptose von Endothel- und Tubuluszellen. Aktivierte CD8 T-Zellen setzen Perforin und Granzym A und B frei. Perforin ist ein zytolytisches Protein und zerstört Zellmembranen im Transplantat. Die Granzyme dringen in die Zielzellen ein und induzieren Caspase-vermittelte Apoptose.¹³ Die T-Zellen aktivieren auch Entzündungszellen im Transplantat, unter anderem (u.a.) Makrophagen. Langfristig sind aktivierte Makrophagen an Parenchymschaden im Rahmen einer chronischen Abstoßung beteiligt. CD8 T-Zellen tragen wahrscheinlich

auch zur Bildung von donorspezifischen HLA-Antikörper (DSA) bei.¹⁸ Im Verlauf der Abstoßung überschreiten CD8 T-Zellen die Zellemembran der Tubuli, proliferieren, und induzieren über den Fas-Liganden spezifische Apoptose von Tubulusepithelzellen (engl. tubular epithelial cells, TEC). Geschädigte TEC transformieren zu primitiven mesenchymalen Myofibroblasten und fördern interstitielle Fibrose. Das Absterben von TEC führt zu tubulärer Atrophie, Abstoßung und letztlich Transplantatverlust.¹³

2.1.3 Pathophysiologie der ABMR

DSA sind bei 13-30% der Nierentransplantierten beschrieben.¹⁹ Die meisten Empfänger haben vor Transplantation keine DSA im Blut, außer sie waren in ihrer Vergangenheit schon einmal Alloantigenen ausgesetzt, z.B. bei einer Schwangerschaft, Bluttransfusion oder früheren Transplantation.¹³ Bereits vor Transplantation zirkulierende Antikörper sind häufiger mit akuter Abstoßung assoziiert, de novo gebildete Antikörper eher mit chronischer Abstoßung.¹⁹ DSA binden an Gefäßendothelzellen im Transplantat und aktivieren das Komplementsystem.²⁰ Alternativ binden sie mit dem Fc-Fragment an Neutrophile, Makrophagen oder Natürliche Killerzellen. Dann bewirken sie Degranulation, Freisetzung von lytischen Enzymen und lokalen Zellschaden.¹⁹ Eines der histopathologischen Kernelemente von ABMR ist die Bildung von neuen Basalmembranen durch Endothelzellen.²¹ Antikörper im Transplantat erhöhen die lokale Produktion von vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (vascular endothelial growth factors, VEGF). Daraufhin proliferieren Endothelzellen und exprimieren vermehrt Fibroblast-Growth-Factor Rezeptor. Durch eine erhöhte Ligandenbindung wird die zelluläre Rekrutierung verstärkt. Dieser Pathomechanismus kann zur Vaskulopathie sowie Glomerulopathie in der Histologie von ABMR beitragen.¹⁹

In der Banff-Klassifikation von 2013 wird die ABMR über die Kombination von histopathologischen und serologischen Kriterien definiert. Sie erfordert den Nachweis von drei Eigenschaften, die jeweils durch verschiedene Marker erfüllt werden können: chronische Gewebsläsionen, Antikörperinteraktion mit vaskulärem Endothel und DSA in der Serologie.²² Die Banff-Klassifikation von 2017 sieht vor, dass ABMR auch diagnostiziert werden kann, wenn der Test auf DSA nicht verfügbar oder potenziell falsch negativ ist. Grund hierfür ist, dass mit den verfügbaren Testmethoden wahrscheinlich nicht alle potenziell schädigenden Antikörper gefunden werden können und bei diesen Patienten trotzdem ein therapeutisches Vorgehen indiziert ist.²³ Entscheidend für die histopathologische Diagnostik der ABMR sind mikrovaskuläre Veränderungen. In

Empfehlungen der Vergangenheit sollte die Zellkomposition in den Mikrokapillaren beschrieben werden, da angenommen wurde, dass Monozyten/Makrophagen, Natürliche Killerzellen und Neutrophile mit hyperakuter Abstoßung assoziiert sind.²⁴ Inzwischen wurde diese Empfehlung zurückgenommen.²¹ In einer Studie mit 749 Nierenbiopsien von Kozakowski et al. stellte sich heraus, dass nicht die fokale Anwesenheit dieser Zellen, sondern vielmehr eine diffuse peritubuläre Kapillaritis mit Transplantatverlust assoziiert ist.²⁵ Die Abgrenzung von akuter zu chronischer ABMR ist unabhängig vom klinischen Erscheinungsbild des Patienten und basiert ausschließlich auf histopathologischen Merkmalen des Nierentransplantats.⁸

2.2 Monitoring nach Nierentransplantation

Die Leitlinie der Kidney Disease: Improving Global Outcome (KDIGO) empfiehlt für alle nierentransplantierte Patienten eine Kontrolle von Serum-Kreatinin, Urin-Protein, Blutbild, Lipiden, Diabetes mellitus, BK-Virus, Epstein-Barr-Virus, Blutdruck, Puls, Größe, Gewicht und Zigarettenkonsum.²⁶ Erhöhtes Serum-Kreatinin ist ein unspezifischer Marker für Abstoßung, der auch bei Nierenarterienstenose, chronischer Transplantatinsuffizienz, Rezidiverkrankungen, neuen Nierenerkrankungen und transienten Prozessen erhöht sein kann.²⁷ Das Serum-Kreatinin und die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) sind keine guten Prädiktoren für frühe histopathologische Veränderungen im Nierentransplantat.²⁸ Eine Proteinurie von >150 mg/24 Stunden ist mit reduziertem Transplantatüberleben assoziiert, unabhängig von glomerulären Pathologien.²⁹ Tritt sie im ersten Jahr nach Transplantation auf, ist das Risiko für Transplantatverlust erhöht. Der Parameter dient besonders der Identifikation von rekurrenten Nierenerkrankungen wie z.B. der fokalen segmentalen Glomerulosklerose.²⁷ Wichtige Ursachen und Risikofaktoren für Transplantatverlust umfassen alloimmune Prozesse, aber auch nicht-immune Aspekte von Spender und Empfänger. Die wichtigsten Risiken und Faktoren, die in der Nachsorge von nierentransplantierten Patienten bedacht werden müssen, sind in Abbildung 2 zusammengefasst.

Ursachen und Risikofaktoren für Transplantatverlust

<u>Nicht-immune Faktoren</u>	<u>Alloimmune Faktoren</u>
Spender-assoziiert	- Kinder und Jugendliche
- Leichenspende	- Ethnizität mit geänderter Disposition für Immunsuppressiva
- Spender älter als 60 Jahre, weiblich, vaskuläre Komorbiditäten	- Variierende Medikation durch Malabsorption oder Non-compliance
- Ischämische Reperfusionsschaden	- Genetische alloimmun und inflammatorische Antwort
- Lange Ischämiezeit	- Histoinkompatibilität (HLA-Mismatch)
Empfänger-assoziiert	- Empfänger-Präsensibilisierung
- Weibliche Empfängerin	- Donor-spezifische Antikörper
- Mismatch bezüglich Größe	- Akute Rejektion
- BMI > 30	- Subklinische Rejektion
- Aszendierende Harnwegsinfektion	- Chronische TCMR
- Transplantat-Pyelonephritis	- Späte de novo HLA-Antikörper Formation
- Ureterobstruktion des Transplantats	- Chronische ABMR mit Glomerulopathie
- BK-Virusnephropathie	
- Calcineurin-Inhibitor Nephrotoxizität	
- Rezidivierende renale Erkrankungen	
- Glomerulonephritis	
- Hypertonus	
- Hyperlipidämie	
- Rauchen	
- Proteinurie	
- Diabetes mellitus	

Abbildung 2: Ursachen und Risikofaktoren für Transplantatverlust

Nach Nankivell et al.³⁰. BMI: Body-Maß-Index.

2.3 Nicht-invasive Biomarker für Nierentransplantat-Abstoßung

Ein idealer Biomarker sollte eine Abstoßung schnell, kostengünstig und möglichst differenziert erkennen. Neben hoher Sensitivität und Spezifität sollte er eine Fläche unter der Kurve (engl. area under the curve, AUC) nahe 1,0 erreichen.³¹ Die aktuellen Ansätze umfassen Analysen auf zellulärer, biochemischer, molekularer und genetischer Ebene. Die Probenentnahme erfolgt aus dem Blut oder Urin.

2.3.1 Biomarker im Urin

T-Zell-assoziierte Moleküle

Jede Station der T-Zellaktivierung bietet Möglichkeiten für potenzielle Biomarker für Nierentransplantat-Abstoßung: von der Antigenerkennung, über Gentranskription bis hin zur Translation und Regulation (Abbildung 3). Zielstrukturen sind einzelne Gene,

Messenger-Ribonukleinsäure (engl. messenger ribonucleic acid, mRNA), Proteine oder andere beteiligte Moleküle.

Targets aktueller T-Zell-Biomarker

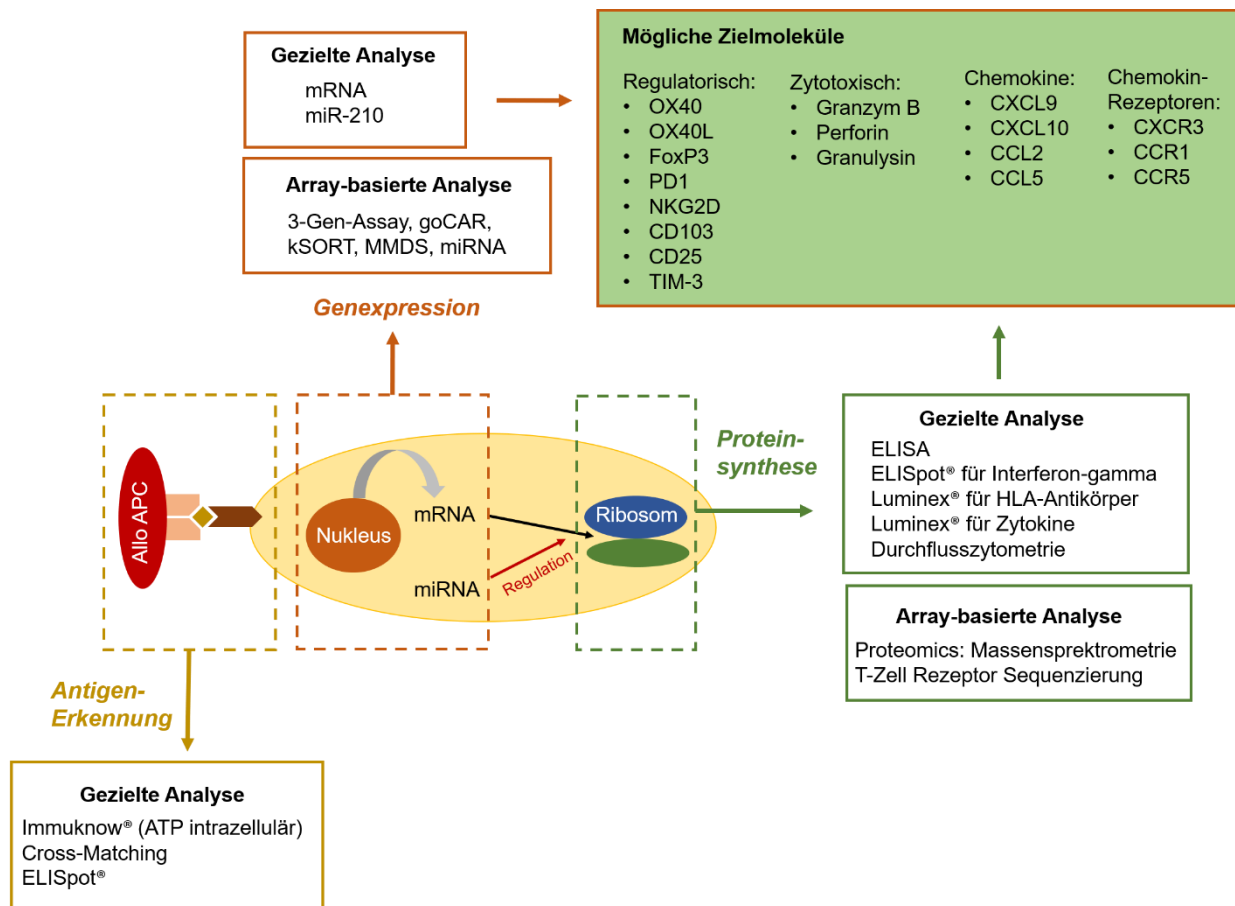


Abbildung 3: Targets aktueller T-Zell-Biomarker

Zur Identifikation von Patienten mit Transplantatabstoßung sind unterschiedliche Targets der T-Zell-Aktivierung von Interesse: Antigenerkennung, Gentranskription, Gentranslation und Genregulierung. ELISpot: Enzyme Linked Immuno Spot Assay; MMDS: Modern Massive Datasets; GoCAR: Genomics of Chronic Allograft Rejection; APC: antigenpräsentierende Zelle. Gestaltung der Abbildung inspiriert durch Saha, K. et al.³².

Besonderes Augenmerk liegt auf den Signalwegen der CD8 T-Zellen. Die Gruppe um Suthanthiran analysierte die mRNA zytotoxischer Proteine im Urin von 85 nierentransplantierten Patienten. Die mRNA Level der CD8 T-Zellproteine Perforin und

Granzym B waren bei Patienten mit akuter Rejektion erhöht.³³ In einer Metaanalyse zur Signifikanz von Granzym B und Perforin wurden 16 Studien ausgewertet mit dem Ergebnis, dass die Proteine allein als Biomarker für akute Abstoßung nicht überzeugten.³⁴ Suthanthiran und seine Kollegen beschrieben weiterhin eine erhöhte Konzentration von Serin Proteinase Inhibitor 9 (PI-9) im Urin von Patienten mit akuter Rejektion. Sie bezeichneten PI-9 als Granzym B Antagonisten, der die Vitalität von zytotoxischen T-Zellen im Transplantat steigert.³⁵ Außerdem fand die Gruppe um Suthanthiran erhöhte CD103 mRNA in Urinzellen von Patienten mit akuter Rejektion.³⁶ CD103 ist ein Oberflächenprotein auf intraepithelialen CD8 T-Zellen und mehrfach in Assoziation mit Tubulitis beschrieben.^{36,37} Insgesamt erreichte der Biomarker eine Spezifität von 75% und eine Sensitivität von 59% bei der Erkennung von akuter Rejektion.³⁶ Ein anderes CD8 T-Zell-assoziiertes Molekül ist Granulylin. Kotsch et al. zeigten, dass mehrere Wochen vor detektierter TCMR die mRNA von Granulylin im Urin erhöht war. Sie untersuchten auch Granzym B, Perforin, Fas-Ligand, TNF-alpha, CC-Chemokin-Ligand-5 (CCL5), Interleukin (IL)-1, IL-10, Interferon-gamma (IFN-gamma), Transforming-Growth-Faktor-beta (TGF-beta), CD3 und C-C Chemokin-Rezeptor-Typ-1 (CCR1). Diese T-Zell-assoziierten Moleküle waren in ihrer Studie jedoch weniger spezifisch und sensitiv.³⁸ Natürlicher-Killer-Gruppe-2-Member-D (NKG2D) wurde ursprünglich als Transmembranprotein auf Natürlichen Killerzellen entdeckt. Inzwischen ist bekannt, dass NKG2D die mRNA kostimulierender CD8 Lymphozyt-Rezeptoren kodiert. Seiler et al. fanden erhöhte NKG2D mRNA Expression in den Nierenbiopsien von Patienten mit akuter Abstoßung. Die NKG2D+ Zellen waren in tubulointerstitiellen Räumen lokalisiert, die auch CD8 T-Zellen enthielten. Daher postulierten sie eine NKG2D+ Subgruppe von CD8 T-Zellen bei Nierentransplantierten. Die Gruppe wies retrospektiv erhöhte NKG2D mRNA im Urinsediment von Patienten mit Abstoßung nach. Der Marker war bereits 2-3 Tage vor bioptisch bestätigter Diagnose positiv. Die Sensitivität lag bei 85%, die Spezifität bei 74%.³⁹

Ein wichtiges Steuermolekül auf regulatorischen T-Zellen ist Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3). In einer Studie von Muthukumar et al. war die FoxP3 mRNA im Urin bei Patienten mit akuter Rejektion höher als bei chronischer Nephropathie. Die Sensitivität lag bei 90%, die Spezifität bei 73%. Weiterhin zeigten Patienten mit erhöhter FoxP3 mRNA eine bessere Therapieresponse, und eine niedrigere Wahrscheinlichkeit für Transplantatverlust innerhalb von 6 Monaten.⁴⁰ In einer anderen Studie wurde die Kombination von FoxP3 mRNA mit Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1) mRNA

analysiert.⁴¹ PD-1 ist ein inhibitorischer Rezeptor auf aktivierten T-Zellen.⁴² Beide Urin-Biomarker waren bei Patienten mit akuter Abstoßung höher als bei Patienten mit stabiler Transplantatfunktion⁴¹. Auch Afeneh et al. beschrieben erhöhte FoxP3 mRNA und PD-1 mRNA im Urin als Prädiktoren für akute Rejektion. Außerdem fanden sie erhöhte mRNA zweier positiv kostimulierender Moleküle im Urin von Patienten mit akuter Rejektion (Tumornekrosefaktor-Rezeptor OX40 und sein Ligand OX40L).⁴³

Interferonabhängige Chemokine wurden in vielen Studien als potenzielle Urin-Biomarker für Abstoßung analysiert. Aktivierte T-Zellen und Natürliche Killerzellen exprimieren den Chemokinrezeptor CXC-Motiv-Chemokinrezeptor-3 (CXCR3). CXCR3 bindet an C-X-C-Motiv-Chemokin-Ligand-9 (CXCL9) und C-X-C-Motiv-Chemokin-Ligand-10 (CXCL10).⁴⁴ In mehreren Studien war bei akuter renaler Abstoßung die Expression von CXCL9 und CXCL10 erhöht. Die Chemokine waren immunhistochemisch in Tubuli und infiltrierenden Zellen nachweisbar. CXCL9 war zusätzlich in Glomeruli detektierbar.^{45,46} 2006 wurde in einer retrospektiven Studie von Matz et al. gezeigt, dass erhöhte mRNA- und Proteinkonzentration von CXCL10 mit akuter Rejektion korrelierte. Die CXCL10-Expression stieg noch vor Kreatinin und vor histopathologischer Diagnose an.⁴⁷ Die mRNA Konzentration von CXCL10 und seinem Rezeptor CXCR3 wurden auch von Tatapudi et al. untersucht. Beide Biomarker zeigten erhöhte mRNA-Level im Urin, wenn akute Rejektion vorlag. Die Studie umfasste insgesamt 82 Patienten. CXCL10 war der bessere Biomarker mit einer Sensitivität von 100% bei einer Spezifität von 78% zur Erkennung von akuter Rejektion.⁴⁵ Die Gruppe um Schaub schlug CXCL10 und CXCL9 als Screening-Marker für subklinische Tubulitis vor.⁴⁸ Ho et al. untersuchten CXCL10 im Urin von 91 Nierentransplantierten mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Das Verhältnis von CXCL10 zu Kreatinin diskriminierte Borderline Tubulitis, subklinische Tubulitis und klinische Tubulitis von normaler Histologie und IFTA.⁴⁹ Jackson et al. analysierten Urinproben von 110 Erwachsenen und 46 Kindern. In ihrer Veröffentlichung von 2011 beschrieben sie eine erhöhte CXCL9- und CXCL10-Konzentration bei Patienten mit akuter Abstoßung und BK-Virusinfektion. Die Chemokine waren bei Patienten mit stabiler Transplantatfunktion, Calcineurin-Inhibitor-Toxizität oder IFTA nicht erhöht. Die Chemokine konnten akute Abstoßung nicht von einer BK-Virusinfektion unterscheiden.⁵⁰ In einer größeren Studie mit 216 Patienten wurde CXCL10 im Urin weiter validiert. Der Biomarker korrelierte mit tubulo-interstitieller Inflammation und ermöglichte eine „CXCL10-gelenkte Strategie“ zur Reduktion von Biopsien nach Nierentransplantation.⁵¹ Hirt-Minkowski et al. schlussfolgerten in ihrem Review, dass

CXCR3-Chemokine vorrangig bei der Identifikation von subklinischer Rejektion helfen könnten.⁵¹

VEGF

VEGF sind Mitogene, die u.a. von T-Zellen und renalen Zellen exprimiert werden. Sie fördern die Adhäsion und Migration von Leukozyten am Transplantatendothel.⁵² Peng et al. fanden erhöhte VEGF im Urin von Patienten mit akuter Rejektion. Sie untersuchten 199 Nierentransplantierte, davon 67 Patienten mit akuter Rejektion. Bei einem Cut-Off von 4,69 mg/μmol Kreatinin erreichten VEGF eine Sensitivität von 84,6% und eine Spezifität von 79,8%.⁵³ Shahbazi et al. identifizierten Patienten mit speziellen Genotypen, deren VEGF-Expression erhöht war. Sie hatten ein erhöhtes Risiko für akute Rejektion.⁵²

TEC-assoziierte Moleküle

Andere potenzielle Biomarker markieren spezifisch Veränderungen in der tubulären Struktur. Gluthation-S-Transferase ist ein Enzym im Zytosol proximaler TEC. Ein Anstieg ausgewählter Subtypen wurde mehrfach bei akuter Rejektion beschrieben.^{54,55} In einer Studie von Sundberg et al. stieg der Urin-Biomarker schon 1-2 Tage vor Kreatinin an.⁵⁵ Ein anderer Biomarker für geschädigte Tubuli ist das Glykoprotein Kidney-Injury-Molecule-1 (KIM-1). Das Transmembranprotein wird von geschädigten proximalen TEC exprimiert. Patienten mit akuter Rejektion und chronischer Transplantatdysfunktion hatten höhere KIM-1 mRNA im Urin und Serum als Patienten mit guter Transplantatfunktion. Zu diesem Schluss kamen Shahbaz et al. nach einer Studie mit 85 nierentransplantierten Patienten.⁵⁶ In einer anderen Publikation korrelierten KIM-1 sowie N-Acetyl-beta-Glukosaminodase negativ mit sechsmonatiger und zwölfmonatiger Transplantatfunktion.⁵⁷ Ting et al. veröffentlichten ein Review zu potenziellen TEC-Biomarkern. Darin stellten sie fest, dass bisherige TEC-Biomarker ihr höchstes Potenzial erreichen, wenn sie mit anderen Biomarkern kombiniert werden. So könnten gemeinsame Analysen über TEC und Immunzellen einen wichtigen Beitrag beim Monitoring von transplantierten Patienten leisten.⁵⁸

Multizentrische Studien

Einige erfolgversprechende Biomarker der mRNA Diagnostik wurden bereits in multizentrischen Studien über das Clinical Trial in Organ Transplantation (CTOT) Programm untersucht. In einer großen prospektiven Studie mit 485 Patienten wurden eine Reihe an spezifischen mRNA-Molekülen in Urinzellen gemessen. Die Dreier-

Kombination von CD3 Epsilon mRNA, CXCL10 mRNA und 18S ribosomaler RNA (engl. 18S ribosomal ribonucleic acid, 18S rRNA) diskriminierte Patienten mit akuter zellulärer Rejektion von Patienten ohne Rejektion mit einer AUC von 0,85. Die Marker stiegen bereits bis zu 20 Tage vor histologischer Diagnose an. Allerdings konnte kein überzeugendes Fazit für ABMR gezogen werden, da nur 10 Patienten mit ABMR eingeschlossen wurden.⁵⁹ Kurze Zeit später wurde eine deutlich kleinere, nicht multizentrische Studie zu mRNA Kombinationen veröffentlicht, die 26 Patienten mit ABMR umfasste. Die Kombination CD3 Epsilon, CD105, CD14, CD46 und 18S rRNA diskriminierte TCMR von ABMR mit einer AUC von 0,81. Eine andere Kombination, bestehend aus CD3 Epsilon, CD105, Toll-Like-Rezeptor 4, CD14, Komplementfaktor B und Vimentin, diskriminierte akute Rejektion von akuter Tubulusnekrose mit einer AUC von 0,92.⁶⁰ Eine weitere multizentrische CTOT-Studie untersuchte prospektiv CCR1, CC-Chemokin-Rezeptor-Typ-5 (CCR5), CXCR3, CCL5, CXCL9, CXCL10, Perforin und Granzym B. CXCL9 war der überzeugendste Marker für akute Rejektion mit negativen prädiktiven Werten von 83% für die mRNA und 92% für das Protein. Niedriges CXCL9 6 Monate nach Transplantation klassifizierte stabile Transplantate mit der geringsten Wahrscheinlichkeit für akute Rejektion oder GFR-Abnahme in den Monaten 6-24 nach Transplantation.⁶¹

Bioinformatik

Pisitkun et al. identifizierten bei einer Analyse von Urin-Exosomen über 1000 potenzielle Biomarker bei Patienten mit Abstoßung oder tubulärem Transplantatschaden.⁶² In einer bioinformatischen Auswertung wurden die Proteine mit bekannten pathologischen Genen und Signalwegen verglichen. Auch andere Autoren schlagen Datenbankanalysen als wichtige Hilfsmittel bei der Entdeckung neuer Biomarker vor. Die STRING Database sammelt Informationen zu bekannten Protein-Proteininteraktionen von Zellen. Bei einer Analyse zu Signalwegen bei renaler Transplantatabstoßung wurden in der Datenbank viele Proteine identifiziert, die bereits als potenzielle Urin-Biomarker bekannt sind: IFN-gamma, CXCL-9, IP-10, CXCR3, Fas-Ligand, Granzym B, IL-18, CD30, Perforine und VEGF-9. Zudem fielen Hepatozyten Growth Faktor und Epidermaler Growth Factor auf.⁶³

Herausforderungen bei der Analyse von Proteinen und mRNA

Die Normalisierung von intra- und interindividueller Variabilität der Protein- und mRNA-Konzentrationen im Urin stellt immer noch ein Problem dar.^{63,64} Die Proteinmenge im Urin kann aufgrund unterschiedlicher pathologischer Prozesse verändert sein. Hohe

Proteinkonzentrationen entstehen sowohl bei intakter („Overflow Proteinurie“), als auch bei geschädigter („glomeruläre Proteinurie“) Filtrationsbarriere. Andere Ursachen für erhöhte Proteinkonzentrationen sind in veränderter Sekretion und Rückresorption im Tubulussystem begründet. Proteine können auch direkt aus dem geschädigten Nierenparenchym stammen, z.B. bei diabetischer Nephropathie. Darüber hinaus erhöhen Nieren- und Uroepithelzellen über Exosome und Mikropartikel die Proteinkonzentration im Urin.⁶³ Einige Herausforderungen bei der Analyse von Urin-mRNA konnten inzwischen bewältigt werden. So liegen Standardisierungen und Kontrollgene vor. Für Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid, RNA)-Analysen bleibt der Zeitfaktor limitierend. RNA sollte möglichst innerhalb von 4 Stunden nach Urinabgabe verarbeitet werden.³¹ Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (engl. real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR) von Urin ist noch nicht großflächig kommerziell verfügbar.

2.3.2 Biomarker im Blut

Bei der Suche nach geeigneten Blut-Biomarkern basieren viele Forschungsprojekte auf der Pathophysiologie der TCMR. Meist werden Zellzahlen detektiert oder die mRNA von ausgewählten Zellbestandteilen gemessen. Zudem untersuchen Wissenschaftler die Genexpression über Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid, DNA) Mikroarrays, Mikro-Ribonukleinsäure (engl. micro-ribonucleic acid, miRNA) und zellfreie DNA von Spendern. Außerdem kann auf DSA als Hinweis für eine ABMR getestet werden. Eine Übersicht zum großen Spektrum potenzieller Biomarker in Urin und Blut listet Tabelle 1 auf. Bisher konnte noch keiner dieser Marker flächendeckend in der klinischen Praxis etabliert werden und eine histopathologische Untersuchung ersetzen.

Spektrum potenzieller Biomarker für Abstoßung

Biomarker	Maßeinheit	Klinischer Kontext	AUC	Patienten	Ref.
Urin					
Perforin, Granzym B	mRNA	akute Rejektion	k.A.	85	33
Serin Proteinase Inhibitor 9	mRNA	akute Rejektion	0,76	87	35
Granulysin	mRNA	akute Rejektion	k.A.	35	38
OX40, OX40L, PD-1, FoxP3	mRNA	akute Rejektion	0,98	46	43
NKG2D	mRNA	akute Rejektion	0,66	94	39
CXCL10	mRNA	ABMR / gemischte Rejektion	0,70 / 0,80	247	65
CXCR3	mRNA	akute Rejektion	0,76	58	45
CD103	mRNA	akute Rejektion	0,73	79	36
CD3 Epsilon, CD25, FoxP3	mRNA	akute Rejektion	0,58 – 0,85	83	40
CD3 Epsilon, CXCL10, 18S rRNA	mRNA	akute TCMR	0,74	485	59
miR-210	miRNA	akute Rejektion	0,70	81	66
CXCL9	Protein/mRNA	Banff>1 / TCMR	0,86	255 / 247	61,65
CCL2, Kreatinin	Protein	Transplantatfunktion nach 5 Jahren	0,62	185	67
TIM-3	mRNA	akute Rejektion	0,98	85	56
KIM-1	mRNA	akute Rejektion	0,99	85	56
Gluthathion Transferase-Pi	Protein	akute Rejektion	k.A.	145	55
NGAL	Protein	akute Rejektion	0,98	182	68
VEGF	Protein	akute / subklinische Rejektion	0,87	279	53
Lymphozyten, TEC	Zellzahl	akute Rejektion	k.A.	176	69
Lymphozyten/Granulozyten	Zellzahl	akute Rejektion	k.A.	42	70
Blut					
TEMRA CD8 T-Zellen	Zellzahl	akute Rejektion/ Transplantatversagen	k.A.	185	71
Interferon-gamma- ELISPOT	Zellzahl	akute Rejektion/ Transplantatversagen	0,80	23	72
Immuknow®	intrazelluläres ATP	akute Rejektion	0,34 – 0,99	642	73
Perforin, Granzym B	mRNA	akute Rejektion	k.A.	25	74
Regulatorische T-Zellen	Zellzahl	akute Rejektion	k.A.	75	75
B Zell Phänotyp	Zellzahl	akute Rejektion/ chronische ABMR	k.A.	73	76
kSORT	mRNA	akute Rejektion	0,94	436	77
DNA Mikroarrays	RNA	akute Rejektion	0,84 – 0,89	148	78
miRNA Profile	miRNA	TCMR	0,76 – 0,97	161	79
Zellfreie DNA des Donors	zellfreie DNA	aktive Rejektion	0,74	102	80
TIM-3	mRNA	akute Rejektion	1,0	85	56
KIM-1	mRNA	akute Rejektion	1,0	85	56
Fractalkine, CXCL10	Protein	akute Rejektion	0,86	52	81

Tabelle 1: Spektrum potenzieller Biomarker für Abstoßung

Auswahl von relevanten Studien. Weitere Publikationen zu gleichen oder anderen Markern können vorliegen. AUC: area under the curve; k.A.: keine Angabe; Ref.: Referenz.

2.4 Durchflusszytometrie von Urinzellen

Lee et al. beschrieben die Transplantatniere als „in vivo Durchflusszytometer“, die den Übertritt von rejektionsbeteiligten Zellen in den Urin ermöglicht.⁸² In den letzten Jahren wurden einige Publikationen zu durchflusszytometrischen Urin-Biomarkern bei inflammatorischen Entzündungsprozessen der Niere veröffentlicht. Sie berichteten über erhöhte CD4 T-Zellen und CD8 T-Zellen bei Patienten mit aktiver Lupusnephritis⁸³⁻⁸⁵ oder erhöhte CD4 T-Zellen bei aktiver Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper (ANCA)-assoziiertes Vaskulitis.⁸⁶ Eine Veröffentlichung von 2018 beschrieb durchflusszytometrisch messbare T-Zellen im Nierentransplantat. Der Quotient CD8/CD4 > 1,2 war prädiktiv für Abstoßung. Er detektierte sie früher als die Mikroskopie. Erhöhte CD45+ Leukozyten und erhöhte IL-Level waren prädiktiv für schweren Zellschaden.⁸⁷ Schon zu den Anfängen der renalen Transplantationsmedizin gab es durchflusszytometrische Analysen von Zellpopulationen im Urin. Veränderte Lymphozyten-⁸⁸⁻⁹¹ und TEC⁹²⁻⁹⁴ Urinkonzentrationen wurden mehrfach bei Patienten mit Abstoßung beschrieben. Der Ansatz soll in dieser Arbeit mit teils neuen Markern weiterverfolgt werden. Grundlage ist die Annahme, dass interstitielle und kapilläre CD8 T-Zellen in das Tubulussystem übertreten und zusammen mit TEC ausgeschieden werden (Abbildung 4).

Der Weg von CD8 T-Zellen und TEC in den Urin

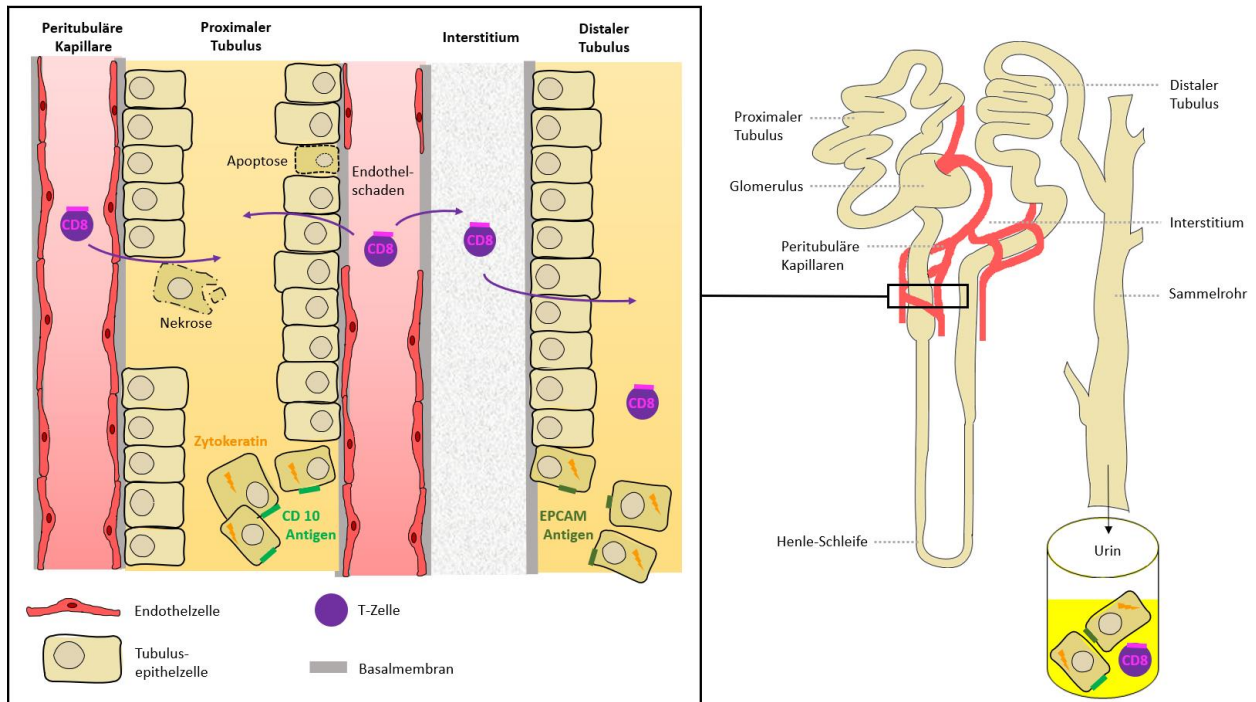


Abbildung 4: Der Weg von CD8 T-Zellen und TEC in den Urin

Dargestellt sind pathophysiologische Vorgänge nach Transplantation. CD8 T-Zellen gelangen über das Interstitium oder peritubuläre Kapillaren in den Tubulus. TEC unterliegen apoptotischen oder nekrotischen Vorgängen und gelangen ebenfalls ins Tubulussystem. Zusätzlich kann das Endothel geschädigt sein. Gestaltung der Abbildung inspiriert durch Abuelo et al.⁹⁵.

2.5 Fragestellungen

Diese Arbeit untersucht die Zahl an CD8 T-Zellen und TEC bei Patienten nach Nierentransplantation. Als Konsequenz immunologischer Vorgänge werden diese Zellen mit dem Urin ausgeschieden und durchflusszytometrisch messbar. Um das Potenzial von CD8 T-Zellen und TEC als nicht-invasive Biomarker zu charakterisieren, sollen die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Wie verhalten sich die Biomarker nach Transplantation?
2. Korrelieren die Biomarker mit histopathologischen Kriterien?
3. Können die Biomarker Transplantatabstoßung detektieren?

3 Material und Methodik

3.1 Einführung

Auf der Suche nach neuen Biomarkern wurden CD8 T-Zellen und TEC im Urin von nierentransplantierten Patienten analysiert. In einer Verlaufsstudie wurden die Biomarker an verschiedenen Zeitpunkten nach Operation bestimmt (Längsschnittkohorte). Sie bestand aus den Gruppen „Gute Transplantatfunktion“ (engl. Good Graft Function) und „Verzögerte Transplantatfunktion“ (engl. Delayed Graft Function).

In einer Querschnittskohorte wurden die gleichen Biomarker unabhängig vom Operationszeitpunkt bestimmt. Bei Patienten mit klinischer Verschlechterung und Biopsieindikation wurden die Urinzellen mit dem Banff-Score korreliert und mit den histopathologischen Diagnosen TCMR, ABMR und keine Rejektion (No RX) verglichen. Zudem wurde eine klinisch unauffällige Kontrollgruppe untersucht. Insgesamt wurden 94 Patienten untersucht (Abbildung 5).

Patientenzahlen der Kohorten

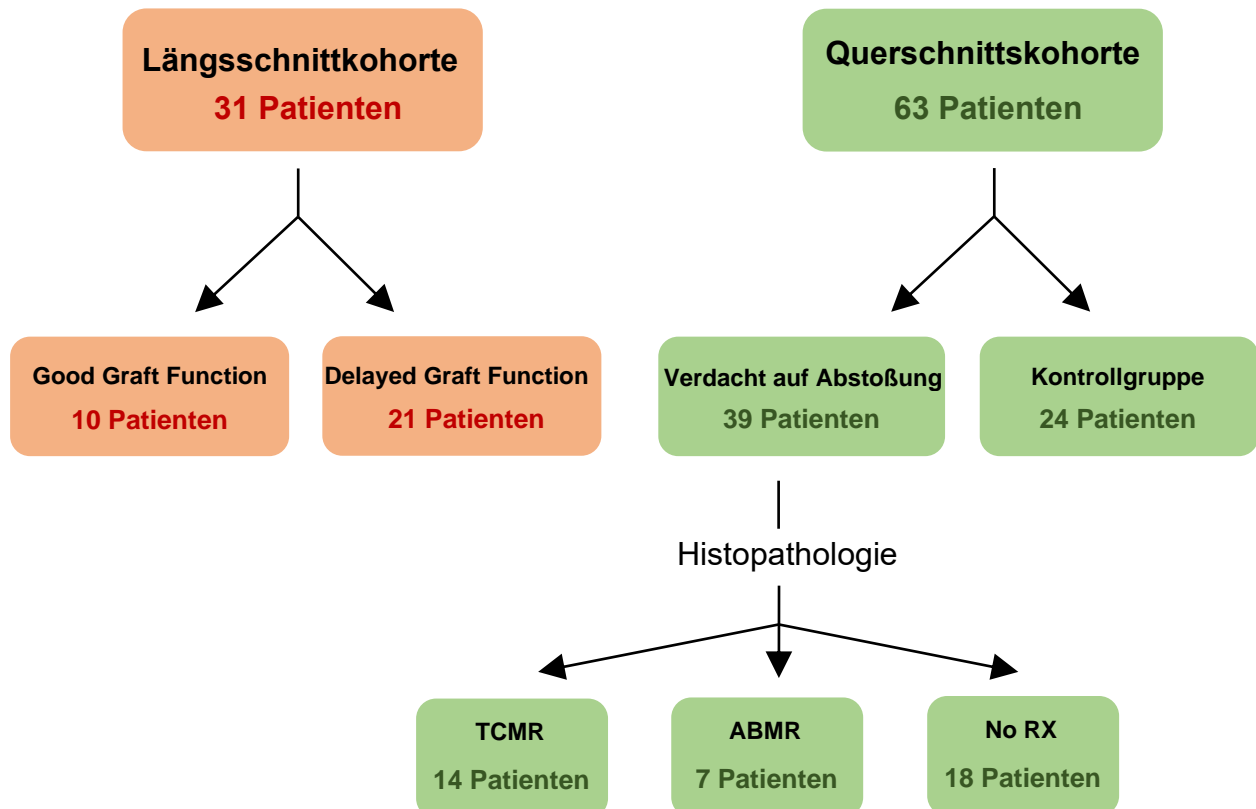


Abbildung 5: Patientenzahlen der Kohorten

3.2 Ethikvotum und Einverständniserklärungen

Die Studie wurde unter Zustimmung der Ethikkommission der Charité durchgeführt (EA1/152/16). Alle teilnehmenden Patienten gaben ihre schriftliche Einwilligung zur Durchführung der Studie und Veröffentlichung der Ergebnisse.

3.3 Technik und Auswahl der Biomarker im Urin

Im Durchflusszytometer fließen Zellen einzeln an einem Laserstrahl vorbei. Dabei werden die Lichtstreuung und Fluoreszenzemissionen gemessen. Das Vorwärts-Streulicht (engl. forward scatter, FSC) verläuft in gleicher Achse zum Laser und ist proportional zur Größe der Zelloberfläche. Das Seitwärts-Streulicht (engl. side scatter, SSC) wird in ca. 90 Grad zum Laserstrahl gemessen. Es ist proportional zur Granularität einer Zelle. Die Zellmarkierung erfolgt über fluoreszenzgekoppelte Antikörper. Durch den Laser angeregte Fluorochrome absorbieren einen Teil der Lichtenergie und emittieren Fluoreszenzlicht einer höheren Wellenlänge. So gelingt die Unterscheidung der Farbstoffe durch die Zuordnung spezifischer Wellenlängen. Zusammengefasst ist mit Hilfe der Durchflusszytometrie ein Rückschluss auf Größe, Granularität und Antikörper-Bindungsstellen möglich.⁹⁶ All diese Parameter erlauben eine gezielte Zelldifferenzierung. Für einen Marker positive Zellen sind in dieser Arbeit mit einem Plus (+) gekennzeichnet, negative Zellen mit einem Minus (-). CD8 T-Zellen und TEC wurden über intra- und extrazelluläre Strukturen identifiziert:

Erkennung von lebenden CD8 T-Zellen:	4',6-Diamidin-2-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI)- CD3+ CD8+
Erkennung von proximalen TEC:	Cytokeratin(intrazellulär)+ CD10+
Erkennung von distalen TEC:	Cytokeratin(intrazellulär)+ epitheliales Zelladhäsionsmolekül (engl. epithelial cell adhesion molecule, EPCAM)+

3.4 Längsschnittkohorte: Verlaufsbeobachtung nach Transplantation

3.4.1 Patientencharakteristika

Alle Patienten erhielten ihre Nierentransplantation an der Charité – Universitätsmedizin Berlin (Campus Charité Mitte oder Campus Charité Virchow-Klinikum). Einzelheiten zu den Patientencharakteristika sind in Tabelle 2 dargestellt. Die Erhebung der Patientendaten erfolgte in Zusammenarbeit mit Nina Görlich (Klinik für Nephrologie und Intensivmedizin, Charité – Universitätsmedizin Berlin). Die Kriterien für Delayed Graft Function umfassten Aspekte zu Dialyse und Serum-Kreatinin.⁹⁷⁻¹⁰⁰ Folgende Definition wurde für diese Arbeit festgelegt:

Good Graft Function:

- innerhalb der ersten 7 Tage nach Operation wurde keine Dialyse durchgeführt und
- an den ersten 3 Tagen nach Operation sank das Serum-Kreatinin um mindestens 10%/Tag oder lag bei $\leq 1,25$ mg/dl.

Delayed Graft Function:

Die Kriterien für Good Graft Function wurden nicht erfüllt, denn

- innerhalb der ersten 7 Tage nach Operation wurde eine Dialyse durchgeführt oder
- an den ersten 3 Tagen nach Operation sank das Serum-Kreatinin nicht um mindestens 10%/Tag und lag bei $> 1,25$ mg/dl.

Der Urin wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation analysiert. Die Messintervalle waren kürzer, je näher sie am Operationsdatum lagen. Zur Auswertung wurden 6 verschiedene Messzeiträume festgelegt. 15 Patienten konnten an mindestens 3 verschiedenen Zeiträumen gemessen werden. 2 Patienten konnten nur einmalig gemessen werden. 3 Patienten wurden in jeweils einem Zeitraum doppelt analysiert. Bei ihnen wurde der Mittelwert ausgewertet. Die meisten Urinanalysen konnten an Tag 1-2 und Tag 6-10 analysiert werden. Insgesamt wurden 91 Urinproben ausgewertet. Die Anzahl ausgewerteter Messungen ist in Tabelle 3 dargestellt.

Patientencharakteristika der Längsschnittkohorte

Gruppe	Good Graft Function	Delayed Graft Function
Patienten	10	21
Weiblich/ männlich	3/7	9/12
Alter, Mittelwert (\pm SD)	51 (\pm 12)	48 (\pm 15)
Lebendspende/Leichenspende	8/2	12/8, 1 x unbekannt
Grunderkrankung	3 x IgA Nephropathie 3 x Glomerulonephritis 2 x Hypertensive Nephropathie 1 x Chronische tubulointerstitielle Nephritis 1 x Unbekannt	4 x Kombinierte diabetische und medikamenten-induzierte Nephropathie 3 x Glomerulonephritis 2 x ADPKD 1 x Kongenitale Hydronephrose 1 x Hypertensive Nephropathie 1 x Alport Syndrom 1 x Lupusnephritis 2 x IgA Nephropathie 1 x Kombinierte Glomerulosklerose und tubulointerstitielle Nephritis 1 x Chronische Pyelonephritis 4 x Unbekannt
Urinmenge, Mittelwert (\pm SD)	104 (\pm 44) ml	101 (\pm 40) ml
U-Stix: Proteine, Median (Spw.)	0 (30) mg/dl	30 (300) mg/dl
U-Stix: Leukozyten, Median (Spw.)	0 (75) WBC/ μ l	0 (125) WBC/ μ l
U-Stix: Erythrozyten, Median (Spw.)	200 (200) RBC/ μ l	200 (200) RBC/ μ l
U-Stix: Nitrit positiv = 1, Median (Spw.)	0 (0)	0 (1)

Tabelle 2: Patientencharakteristika der Längsschnittkohorte

ADPKD: autosomal-dominante Polyzystische Nierenerkrankung; SD:

Standardabweichung; WBC: white blood cell count; RBC: red blood cell count.

Anzahl analysierter Urinproben zu verschiedenen Zeiträumen

Zeitraum	Anzahl Urinproben
Tag 1-2	25
Tag 3-5	14
Tag 6-10	26
Tag 11-35	8
Tag 36-59	8
Tag 60-100	10
Total	91

Tabelle 3: Anzahl analysierter Urinproben zu verschiedenen Zeiträumen

Die Urinproben wurden zu 6 verschiedenen Zeiträumen nach Transplantation requiriert.

3.5 Querschnittskohorte: Analyse histopathologischer Kriterien

Der Zusammenhang zwischen Urinzellzahl und histopathologischen Merkmalen wurde bei allen Patienten mit Verdacht auf Abstoßung untersucht. Für die Analyse wurden die Banff-Scores zu interstitieller Entzündung, Tubulitis, Glomerulitis, peritubulärer Kapillaritis und chronischer Glomerulopathie ausgewählt. Sie sind pathophysiologisch bedeutsam für den Abstoßungsprozess und werden im Anschluss an diesen Absatz näher erläutert. Die biopsierten Patienten wurden anhand ihrer Diagnose in die Gruppen TCMR, ABMR oder No RX eingeteilt. Sie wurden untereinander und mit der klinisch unauffälligen Kontrollgruppe verglichen.

3.5.1 Erläuterung zu ausgewählten Banff-Scores

Interstitielle Entzündung (i)

Der Score beschreibt den prozentualen Anteil an Entzündungszellen in nicht vernarbtem Kortexparenchym. Fibrotische Areale, angrenzende subkapsuläre Kortexareale und die Adventitia an großen venösen oder lymphatischen Gefäßen sind von der Beurteilung ausgeschlossen. Interstitielle Entzündung ist ein klassisches Zeichen der akuten TCMR.⁸ Bei Nierentransplantat-Abstoßung sind T-Zellen und Makrophagen die dominanten Zellpopulationen im Infiltrat. Sie können von Plasmazellen oder Granulozyten umgeben sein.¹⁰¹ In einer großen Studie mit 2055 Biopsien zeigten 31,6% aller Indikationsbiopsien eine interstitielle Entzündung. Die Prävalenz für den Score betrug 18,2% bei akuter Rejektion und 67,4% bei subklinischer Rejektion.¹⁰² Interstitielle Entzündung tritt auch bei

anderen pathologischen Entitäten auf, u.a. bei BK-Virusnephropathie oder akuter Tubulusnekrose.¹⁰²

Tubulitis (t)

Der Score beschreibt die Quantität mononukleärer Leukozyten am Epithel kortikaler Tubuli. Die Entzündungsprozesse sind ein wichtiger Indikator für die TCMR. Zytotoxische CD8 T-Zellen nehmen eine Schlüsselrolle bei der Zerstörung tubulärer Strukturen ein.¹⁰³ Bei schwerer Tubulitis wird die Basalmembran geschädigt, die Nierenfunktion und das glomeruläre Feedback nehmen ab.^{102,104} Seit der Banff-Klassifikation von 2017 sind stark atrophe Tubuli von der Beurteilung ausgeschlossen, da die Bedeutsamkeit von Tubulitis bei ihnen weitgehend unklar ist.⁸

Glomerulitis (g):

Glomerulitis ist eine Form der mikrovaskulären Inflammation und gilt als wichtiges Zeichen einer ABMR. Der Score beschreibt die Anzahl betroffener Glomeruli in Prozent. Die Entzündung ist gekennzeichnet durch Leukozyteninfiltration und Endothelzellvergrößerung. Die Morphologie ähnelt der einer Glomerulonephritis.⁸ Besonders die IgA-Nephropathie gleicht dem Erscheinungsbild einer Transplantat-Glomerulitis durch Abstoßung. Zur Differenzierung kann die Ablagerung von Immunglobulin und Komplement durch Immunfluoreszenz evaluiert werden.²²

Peritubuläre Kapillaritis (ptc):

Die peritubuläre Kapillaritis ist eine mikrovaskuläre Inflammation und Zeichen für ABMR. Ab ptc1 zeigen mindestens 10 % der peritubulären Kapillaren Entzündungsinfiltrate. Für den Score werden die Leukozyten innerhalb des kapillären Lumens gezählt. Peritubuläre Kapillaren sind definitionsgemäß im Kortex der Niere lokalisiert. Das Äquivalent im Nierenparenchym sind die Vasa recta. Sie sind für diesen Score nicht relevant. Bereiche mit Pyelonephritis oder Nekrose sind von der Beurteilung ausgeschlossen. Auch Entzündungsinfiltrate nahe lymphatischer Gefäße sollen nicht in den Score eingehen, um eine Verwechslung zu vermeiden. Am besten erfolgt die Beurteilung an tubulären Querschnitten. Peritubuläre Kapillaritis kann auch bei TCMR auftreten.⁸

Chronische Glomerulopathie (cg):

Die chronische Glomerulopathie beschreibt eine mehrschichtige Membrankontur in einem ausgewählten, stark geschädigten Glomerulus. Sie ist ein Zeichen einer ABMR.

Der Score beschreibt die betroffenen Kapillarschlingen in Prozent. Bei leichter chronischer Glomerulopathie kann die Elektronenmikroskopie zur Verifizierung eingesetzt werden, ansonsten reicht die Beschreibung mittels Lichtmikroskopie aus. Die chronische Glomerulopathie tritt auch bei Hepatitis C, hypertensiver Glomerulopathie und Glomerulonephritis auf.⁸

3.5.2 Patientencharakteristika

Patienten mit Biopsie

Für die Arbeit wurde der Spontanurin von 39 Patienten analysiert, die stationär auf der Nephrologie der Charité Berlin (Campus Charité Mitte oder Campus Virchow-Klinikum) aufgenommen wurden. Alle Patienten zeigten eine klinische Verschlechterung der Nierenfunktion und erhielten differentialdiagnostisch eine Biopsie. Die Urinproben wurden bis zu 3 Tage vor oder nach der Biopsie eingesammelt. Die histopathologische Bewertung der Biopsien erfolgte durch das Institut für Pathologie der Charité. Zur Rejektionsbeurteilung wurde die damals gültige Banff-Klassifikation von 2013 herangezogen. Eine gesicherte Harnwegsinfektion, akute interstitielle Nephritis, membranöse Glomerulonephritis, fokale segmentale Glomerulosklerose oder das Rezidiv einer IgA-Nephropathie waren Ausschlusskriterien. Auch Patienten mit makroskopischer Hämaturie oder Nitrit-positivem U-Stix wurden nicht eingeschlossen.

Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe bestand aus 24 randomisierten Patienten mit Zustand nach Nierentransplantation, die zur Kontrolle ihres Serum-Kreatinins in die nephrologische Ambulanz der Charité kamen. Die Urinanalyse erfolgte am gleichen Tag. Keiner der Patienten hatte zum Untersuchungszeitpunkt einen Blasenkatheter. Alle eingeschlossenen Patienten hatten eine gute Transplantatfunktion. Diese war definiert als:

- 1) Stabiles Serum-Kreatinin (Schwankungen unter 25%) oder Kreatininabfall in regulären Kontrollterminen in der Ambulanz und
- 2) keine stationäre Aufnahme aufgrund von nephrologischen oder im Zusammenhang mit dem Nierentransplantat stehenden Ursachen in den letzten 6 Monaten.

1 Patient zeigte 4 Wochen vor Urinanalyse einen unklaren Anstieg des Serum-Kreatinins, der innerhalb einer Woche wieder fiel. Bei 5 Patienten (im Median 8 Jahre nach Transplantation) wurde der Kreatininwert der letzten 6 Monate nicht bestimmt, da die Kontrolltermine wegen guter Transplantatfunktion seltener stattfanden. Einzelheiten zu allen Patientencharakteristika dieser Kohorte sind in den Tabellen 4, 5, 6 und 7 dargestellt. Die Erhebung der Patientendaten erfolgte in Zusammenarbeit mit Nina Görlich (Klinik für Nephrologie und Intensivmedizin, Charité – Universitätsmedizin Berlin).

Patientencharakteristika der Querschnittskohorte

Gruppe	TCMR	ABMR	No RX	Kontrolle
Patienten	14	7	18	24
Weiblich/ männlich	4/10	1/6	6/12	10/14
Alter, Mittelwert (±SD)	49 (± 18)	58 (± 18)	56 (± 13)	47 (± 14)
Tage nach NTX, Median (±SD)	67 (±9524)	3368 (±1833)	105 (±5970)	2064 (±7349)
Lebendspende/ Leichenspende	6/6 2 x unbekannt	2/4 1 x unbekannt	6/11, 1 x unbekannt	10/14
Grunderkrankung	2 x IgA Nephropathie 2 x Diabetische Nephropathie 1 x Fancony Syndrom 2 x Glomerulo- nephritis 1 x Reflux mit Megaureter 6 x Unbekannt	1 x Hypertensive Nephropathie 1 x Alport Syndrom 1 x IgA Nephropathie 1 x Glomerulo- nephritis 1 x Diabetische Nephropathie 2 x Unbekannt	1x Glomerulo- nephritis 1 x Lupusnephritis 4 x IgA Nephropathie 1x Kardiorenales Syndrm 5 x Diabetische Nephropathie 1 x Alport Syndrom 1 x Hypertensive Nephropathie 2 x ADPKD 2 x Unbekannt	4 x ADPKD 2 x IgA Nephropathie 2 x Reflux Nephropathie 1 x Nierenzell karzinom 4 x Glomerulo- nephritis 2 x Alport Syndrom 1 x Medikamenten- induzierte Nephritis 2 x Diabetische Nephropathie 2 x Hypertensive Nephropathie 1 x Atypisches hämolytisches urämisches Syndrom 3 x Unbekannt

Tabelle 4: Patientencharakteristika der Querschnittskohorte

ADPKD: autosomal-dominante Polyzystische Nierenerkrankung; SD: Standardabweichung; NTX: Nierentransplantation.

Immunsuppressiva der Querschnittskohorte

Gruppe	TCMR	ABMR	No RX	Kontrolle
Therapie gegen Transplantat-abstoßung	7 x Methylprednisolon 3 x Antithymocyten Globulin + Methylprednisolon 1 x Antithymocyten Globulin 1 x Methylprednisolon + IgG Therapie 2 x Keine spezifische Therapie	1 x Methylprednisolon 1 x Cyclophosphamid 1 x Plasmapherese + IgG Therapie + Antithymocyten Globulin 1 x Methylprednisolon + Plasmapherese 3 x Keine spezifische Therapie	5 x Methylprednisolon 1 x Antithymocyten Globulin 12 x Keine spezifische Therapie	-
Immun-suppression	4 x Tacrolimus + Mycophenolat + Prednison 5 x Tacrolimus + Mycophenolat 3 x Tacrolimus + Mycophenolat 1 x Tacrolimus 1 x Cyclosporin	3 x Tacrolimus + Mycophenolat + Cyclosporin 1 x Tacrolimus + Mycophenolat + Prednison 1 x Everolimus + Mycophenolat + Methylprednisolon 1 x Tacrolimus + Mycophenolat + Methylprednisolon	9 x Tacrolimus + Mycophenolat + Methylprednisolon 4 x Tacrolimus + Mycophenolat + Prednison 2 x Tacrolimus + Mycophenolat 1 x Macophenolat + Cyclosporin 1 x Tacrolimus + Everolimus + Methylprednisolon 1 x Tacrolimus + Azathioprin + Methylprednisolon	9 x Tacrolimus + Mycophenolat + Methylprednisolon 9 x Tacrolimus + Mycophenolat + Cyclosporin 3 x Mycophenolat + Cyclosporin 1 x Everolimus + Mycophenolat 1 x Mycophenolat + Prednison 1 x Keine
Steroidmenge	2 x Methylprednisolon 8 mg 3 x Methylprednisolon 4 mg 1 x Prednison 4 mg 1 x Prednison 5 mg 1 x Prednison 24 mg 1 x Prednison 125 mg	1 x Methylprednisolon 4 mg 1 x Methylprednisolon 2 mg 1 x Prednison 2 mg	9 x Methylprednisolon 4 mg 1 x Methylprednison 8 mg 1 x Methylprednisolon 24 mg 1 x Prednison 2,5 mg 1 x Prednison 4 mg 1 x Prednison 7,5 mg 1 x Prednison 250 mg	1 x Methylprednisolon 10 mg 1 x Methylprednisolon 8 mg 4 x Methylprednisolon 4 mg 3 x Methylprednisolon 2 mg 1 x Prednison 5 mg

Tabelle 5: Immunsuppressiva der Querschnittskohorte

Die Therapie gegen Abstoßung wurde ab 5 Tagen vor Biopsie begonnen und bis zu 19 Tage nach Biopsie fortgeführt.

Laborwerte der Querschnittskohorte

Gruppe	TCMR	ABMR	No RX	Kontrolle
Calcineurin-Inhib.-Spiegel (Spw.) ng/ml	7,90 (9,74)	5,6 (0,7)	13,97 (21,6)	6,19 (11,86)
GFR (Spw.) ml/min/1,73m ²	23,57 (77)	21,28 (32)	13,97 (54)	53,34 (93)
Kreatinin (Spw.) mg/dl	7,82 (44,95)	3,1 (2,39)	3,66 (10,14)	1,54 (3,39)
Harnstoff (Spw.) mg/dl	95,37 (208,8)	133,71 (96)	105,33 (165)	57 (119)
Protein-Kreatinin Ratio im Urin (Spw.) mg/g Kreatinin	547,5 (1808)	1357,2 (1918)	1523,4 (4588)	426,4 (4298)
Urinmenge (± SD)	111 (± 39)	120 (±59)	84 (±45)	76 (±34)
U-Stix: Proteine (Spw.) mg/dl	30 (100)	65 (300)	22,5 (2000)	0 (100)
U-Stix: Leukozyten (Spw.) WBC/μl	0 (125)	0 (0)	0 (70)	0 (70)
U-Stix: Erythrozyten (Spw.) RBC/μl	200 (200)	5 (200)	80 (200)	0 (80)
U-Stix: Nitrit (Spw.), positiv = 1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Tabelle 6: Laborwerte der Querschnittskohorte

Mediane von Serum- und Urinalysen der Patienten und Mittelwert der analysierten Urinmenge. Die Werte für Calcineurin-Inhib.-Spiegel, GFR, Kreatinin, Protein-Kreatinin Ratio und U-Stix wurden am Tag der Urinanalyse bestimmt. Calcineurin-Inhib.-Spiegel: Calcineurin-Inhibitor-Spiegel; WBC: white blood cell count; RBC: red blood cell count; Spw: Spannweite.

Banff-Scores der Querschnittskohorte

Gruppe	TCMR	ABMR	No RX
Interstitielle Entzündung <i>i</i> (\pm SD)	2,0 (\pm 0,6)	0,5 (\pm 0,7)	0,0 (\pm 0,9)
Tubulitis <i>t</i> (\pm SD)	1,3 (\pm 0,8)	0,0 (\pm 0,0)	0,0 (\pm 0,0)
Glomerulitis <i>g</i> (\pm SD)	0,0 (\pm 0,8)	1,0 (\pm 0,5)	0,0 (\pm 0,3)
Chronische Glomerulopathie <i>cg</i> (\pm SD)	0,0 (\pm 0,9)	0,5 (\pm 0,9)	0,0 (\pm 0,0)
Peritubuläre Kapillaritis <i>ptc</i> (\pm SD)	0,0 (\pm 1,1)	3,0 (\pm 0,7)	0,0 (\pm 0,3)
Intimale Arteriitis <i>v</i> (\pm SD)	0,0 (\pm 0,8)	0,0 (\pm 0,7)	0,0 (\pm 0,6)
Arteriolenhyalinose <i>ah</i> (\pm SD)	0,0 (\pm 1,0)	3,0 (\pm 0,4)	1,5 (\pm 1,5)
Mesangiale Expansion <i>mm</i> (\pm SD)	0,0 (\pm 0,9)	0,5 (\pm 0,5)	0,0 (\pm 0,8)
Tubuläre Atrophie <i>ct</i> (\pm SD)	1,3 (\pm 0,9)	1,0 (\pm 0,0)	0,4 (\pm 0,6)
Interstitielle Fibrose <i>ci</i> (\pm SD)	1,6 (\pm 1,0)	1,3 (\pm 0,5)	0,8 (\pm 0,5)

Tabelle 7: Banff-Scores der Querschnittskohorte

Mediane der Banff-Scores. SD: Standardabweichung.

3.6 Urinabnahme und Transport

Die Requisition der Urinproben erfolgte von März 2016 bis März 2017. Es wurde ausschließlich frischer Patientenurin verwendet, der ungekühlt in sterilen Urinbechern transportiert und gelagert wurde. Bei Patienten mit Blasenkatheter wurde der Urin dem unsterilen Teil des Katheterbeutels entnommen. Alternativ gaben die Patienten selbstständig Spontanurin in Urinbechern ab. Die Auswertung von Urinteststreifen und die Urinverarbeitung begann spätestens 8 Stunden nach Requisition.

3.7 Färbung der CD8 T-Zellen

3.7.1 Vorbereitung der Urinproben

Der Urin wurde entsprechend seiner Menge auf 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon®) aufgeteilt. Diese wurden zur Trennung der flüssigen und zellulären Bestandteile bei 4° Celsius (280 g, 8 Minuten) zentrifugiert (Zentrifuge für alle Schritte der Urinvorbereitung: Heraeus® Multifuge® 3 S-R). Der überstehende Urin wurde anschließend abgekippt. Alle Urinsedimente einer Urinprobe wurden in insgesamt 40 ml phosphatgepufferter Salzlösung (engl. phosphate-buffered saline, PBS) und Bovines Serumalbumin (BSA)

gepoolt. Die Zusammensetzung von PBS/BSA ist in Tabelle 8 dargestellt und gilt auch für die anderen Verwendungen. Zur weiteren Analyse der CD8 T-Zellen wurden 30 ml entnommen. Zur Isolierung von mononukleären Zellen wurde 15 ml Ficoll-Paque (Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon®) gegeben. Das Röhrchen wurde in 30° Winkel gehalten. Anschließend wurde der Urin langsam und vorsichtig in sterilen Röhrchen mit einer automatischen Pipette hinzugefügt. Das Ficoll-Paque sammelte sich getrennt vom Urin am Boden des Röhrchens. Das Röhrchen wurde ohne Pause bei 20° Celsius (relative Zentrifugalbeschleunigung (engl. relative centrifugal force, RCF) 2000, 450 g, 20 Minuten) zentrifugiert. Ficoll-Paque hat eine spezifische Dichte von 1,077 g/ml und liegt daher nach Zentrifugation über einem Sediment aus Erythrozyten und Granulozyten. Mononukleäre Zellen haben eine geringere Dichte und liegen in einem weißlichen Buffy Coat über dem Ficoll-Paque.⁹⁶ Der Buffy Coat wurde mit einer 1000 µl Pipette aspiriert und in ein 15 ml Röhrchen überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 4° Celsius (Umdrehungen per Minute (engl. revolutions per minute, RPM) 1300, 280 g, 8 Minuten). Der Überstand wurde abgekippt, das Pellet auf 2 ml PBS/BSA suspendiert und auf 2 Eppendorf Reaktionsgefäße (1,5 ml) mit je 1 ml aufgeteilt. Sie dienen dem Positiv- und Negativnachweis der CD8 T-Zellfärbung.

Rezept für PBS und PBS/BSA

		Molekulargewicht	10fach für 5 Liter	Millimol pro Liter
PBS	NaCl	58,4	500 g	136,9
	KCl	74,5	10 g	2,7
	KH ₂ PO ₄	136,9	10 g	1,5
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	178	71 g	7,9
PBS/BSA	PBS/0,2% BSA (sterilfiltriert)			

Tabelle 8: Rezept für PBS und PBS/BSA

3.7.2 Zellfärbung

Zur Analyse der CD8 T-Zellen wurde eine Positivprobe angefärbt und mit einer Negativprobe verglichen. Nach der Urinvorbereitung wurden beide Eppendorf Reaktionsgefäße bei 4° Celsius (RPM 1300, 300 g, 8 Minuten) zentrifugiert (ab jetzt Zentrifugation mit Heraeus® Labofuge® 400R). Der Überstand wurde abgekippt. Die

Pellets wurden in jeweils 100 µl PBS/BSA mit 10% humanem Immunglobulin G (Flebogamma, Grifols, Langen, Deutschland) suspendiert. Dies diente der Blockade von unspezifischen Fc-Rezeptoren. Zur Färbung der CD8 T-Zellen wurde 10 µl CD3 und 10 µl CD8 Antikörper in die Positivprobe hinzugegeben (Tabelle 9). Die Inkubation erfolgte im Dunkeln auf Eis. In die Negativprobe wurden keine Antikörper gegeben. Nach der Inkubationszeit von 15 Minuten wurden beide Proben mit 1 ml PBS/BSA verdünnt und zentrifugiert (4° Celsius, 1300 RPM, 300 g, 8 Minuten). Der Überstand wurde abgekippt und die Pellets jeweils mit 180 µl PBS/BSA suspendiert.

Antikörper zur Färbung der CD8 T-Zellen

Antikörper	CD3	CD8
Konjugat	PerCP	APC-Vio-770
Klon	BW264/56	BW135/80
Hersteller	Miltenyi Biotec GmbH	Miltenyi Biotec GmbH
Isotyp	Mouse IgG2	Mouse IgG2
Verdünnung	1:10	1:10

Tabelle 9: Antikörper zur Färbung der CD8 T-Zellen

Die Antikörper färben die Antigene CD3 und CD8 auf der Zelloberfläche von CD8 T-Zellen an.

3.7.3 Messung am Durchflusszytometer

Die Messung der Zellzahlen erfolgte am gleichen Tag wie die Zellfärbung. Die Einstellungen am Durchflusszytometer (MACS Quant® Analyzer, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) entsprachen weitgehend den standardisierten Einstellungen zur Analyse von Blutzellen. Es wurden einige Anpassungen am Gerät bezüglich FSC, SSC und den Voreinstellungen zur Kompensation vorgenommen. Die Justierung der Einstellungen erfolgte im Vorfeld durch Messungen mit Urin von nierentransplantierten Patienten. Direkt vor der Messung wurde 1 µl DAPI (Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) in die Positiv- und Negativprobe hinzugegeben. DAPI bindet an intrazelluläre DNA und ist daher ein guter Marker für tote Zellen. Alle Proben wurden vor der Messung für einige Sekunden auf einen Vortexmischer gehalten. Die Aufnahmemenge am Gerät betrug 100 µl. Die Flussgeschwindigkeit lag bei 2000 Zellen pro Sekunde.

3.7.4 Gating-Strategie

Zur Auswertung der Durchflusszytometrie-Bilder wurde FlowJo 10.3 (Tree Star, Ashland, Oregon, USA) verwendet. Das Gating der CD8 T-Zellen erfolgte nach dem folgenden Schema (Abbildung 6):

Gate 1: Auswahl der Singlets (X: FSC-A, Y: FSC-H)

Gate 2: Auswahl der Lymphozyten (X: FSC-A, Y: SSC-A)

Gate 3: Auswahl der DAPI– CD3+Zellen (X: PerCP, Y: PerCP)

Gate 4: Auswahl der CD8+ Zellen (X: APC-Vio-770, Y: PE-Vio770)

Die Bilder der Positivprobe wurden mit denen der Negativprobe verglichen, um ein möglichst präzises Gating zu erreichen.

Gating der CD8 T-Zellen

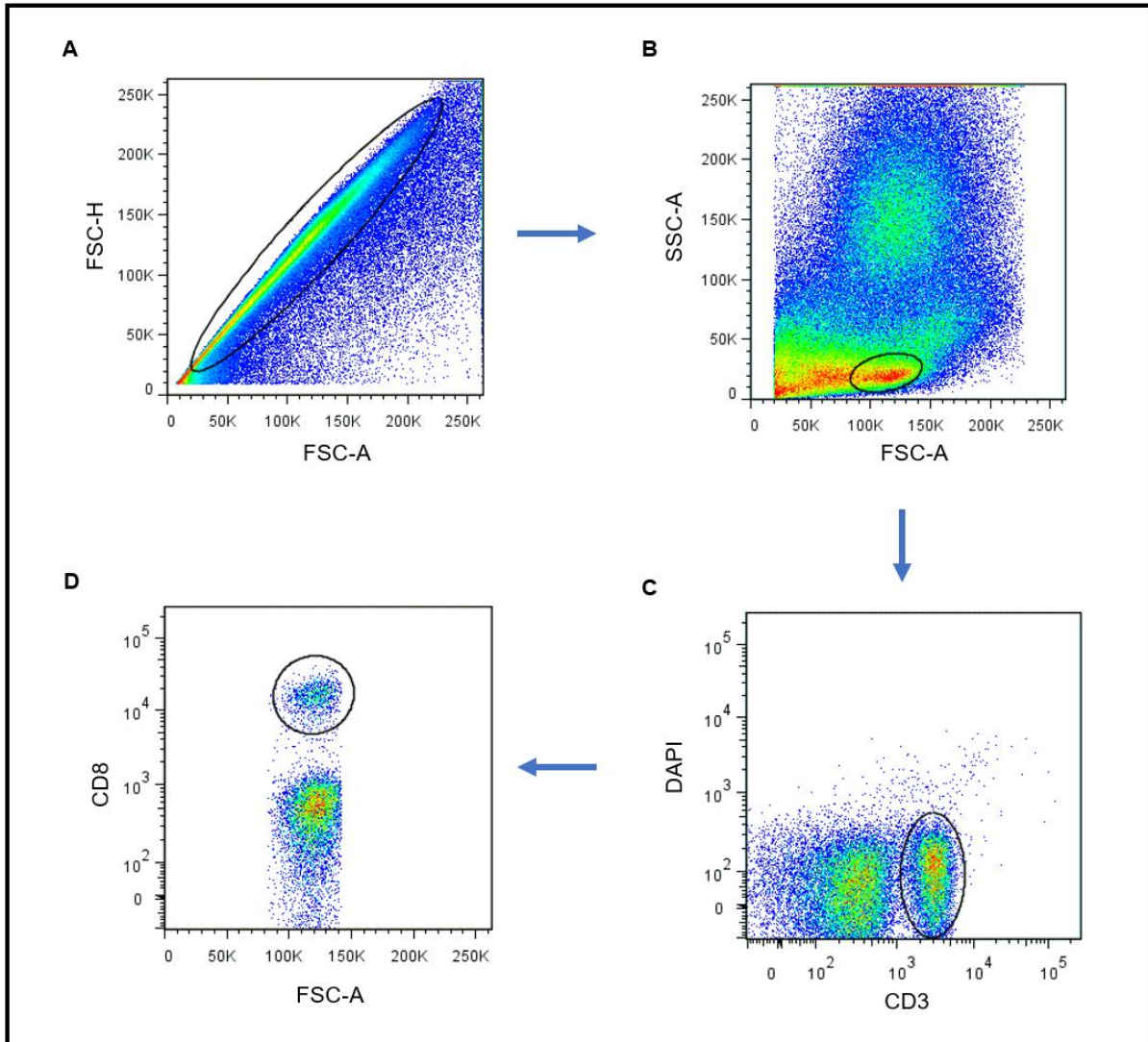


Abbildung 6: Gating der CD8 T-Zellen

Repräsentative Urinprobe eines Patienten nach Nierentransplantation. A: Auswahl der Singlets. B: Auswahl der Lymphozyten. C: Auswahl der DAPI- CD3+ Zellen. D: Auswahl der CD8+ T-Zellen.

3.8 Färbung der TEC

3.8.1 Vorbereitung der Urinproben

Der Urin wurde auf 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon®) aufgeteilt und anschließend bei 4° Celsius (1300 RPM, 280 g, 8 Minuten) zentrifugiert (Zentrifuge zur Urinvorbereitung: Heraeus® Multifuge® 3 S-R). Der Überstand wurde abgekippt. Alle Urinsedimente einer Urinprobe wurden in insgesamt 40 ml PBS/BSA gepoolt. 10 ml wurden zur weiteren Analyse der TEC entnommen. Die 10 ml wurden in ein 15 ml Röhrchen überführt und zentrifugiert (1300 RPM, 4° C, 280 g, 8 Minuten). Der Überstand wurde abgekippt, das Pellet in 1 ml PBS suspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 4° Celsius (1300 RPM, 300 g, 8 Minuten) (ab jetzt Zentrifugation mit Heraeus® Labofuge® 400R). Der Überstand wurde abgekippt und fixiert.

3.8.2 Zellfixierung

Zur Fixierung wurde das Pellet in 100 µl PBS und 100 µl 4% Paraformaldehyd suspendiert und 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die fixierten Zellen wurden anschließend mit 1 ml PBS/BSA verdünnt und bei 4° Celsius zentrifugiert (1300 RPM, 300 g, 8 Minuten). Der Überstand wurde abgekippt. Bei Lagerung über Nacht wurde das Pellet in 20 µl PBS/BSA/0,02% Azid suspendiert. Die Lagerungszeit betrug maximal 5 Tage. Erfolgte die Färbung der TEC am gleichen Tag wie die Fixierung, so wurde direkt mit der Zellfärbung fortgefahren.

3.8.3 Zellfärbung

Nach gründlicher Literaturrecherche wurde intrazelluläres Zytokeratin für die Detektion von TEC gewählt.¹⁰⁵⁻¹⁰⁸ Die ausgewählten pan-reaktiven Antikörper zielen auf Cytokeratin 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 18 und 19 einfacher Epithelzellen. Der Oberflächenmarker CD10 (auch genannt Nephrilysin) färbt proximale TEC^{107,109} und EPCAM distale TEC^{110,111} an. Zur Analyse der TEC wurde jeweils eine Positivprobe gefärbt und mit einer Negativprobe verglichen. Nach der Urinvorbereitung und -fixierung wurde die Zellsuspension (bei Lagerung über Nacht) oder das Pellet (bei Färbung am gleichen Tag) mit 1 ml PBS/BSA verdünnt, bei 4° Celsius zentrifugiert (1300 RPM, 300 g, 8 Minuten) und der Überstand abgekippt. Das Pellet wurde in einer 100 ml Saponinlösung (S7900 Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) mit einer Konzentration

von 0,25 g in 50 ml Benzolboronsäure suspendiert. Saponin ist ein Permeabilisierungsreagenz und wird bei der Markierung intrazellulärer Antigene eingesetzt.⁹⁶ Die Inkubation erfolgte im Dunkeln (4° Celsius, 15 Minuten). Anschließend wurde die Suspension für die Positiv- und Negativprobe auf 2 Eppendorf Reaktionsgefäße aufgeteilt. Diese wurden jeweils mit Saponin auf insgesamt 500 µl aufgefüllt und bei 4° Celsius zentrifugiert (4° Celsius, 1300 RPM, 300 g, 8 Minuten). Der Überstand wurde abgekippt und die Pellets jeweils in 100 µl PBS/BSA mit 10% humanem Immunglobulin G (Flebogamma, Grifols, Langen, Deutschland) resuspendiert. Zur Färbung der TEC wurden je nach Verdünnung 10 µl oder 1 µl Cytokeratin Antikörper, 10 µl CD10 Antikörper und 10 µl EPCAM Antikörper in die Positivprobe hinzugegeben (Tabelle 10). Die Inkubation erfolgte im Dunkeln auf Eis. In die Negativprobe wurden keine Antikörper gegeben. Nach der Inkubation wurde jeweils 1 ml Saponin hinzugefügt und die Reaktionsgefäße bei 4° Celsius (1300 RPM, 300 g, 8 Minuten) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet in 120 µl PBS/BSA suspendiert. Auffällig große Pellets wurden in insgesamt 150 µl PBS/BSA suspendiert, um nach der Filterung eine ausreichende Menge für die Messung am Durchflusszytometer zu haben.

Antikörper zur Färbung der proximalen und distalen TEC

Antikörper	Cytokeratin	CD10	EPCAM
Konjugat	1) FITC 2) Alexa Fluor 647	PE-Vio770	APC-Vio770
Klon	1) CK3-6H5 2) C-11	97C5	HEA-125
Hersteller	1) Miltenyi Biotec GmbH 2) BioLegend	Miltenyi Biotec GmbH	Miltenyi Biotec GmbH
Isotyp	Mouse IgG1	Mouse IgG1	Mouse IgG1
Verdünnung	1) 1:10 2) 1:100	1:10	1:10

Tabelle 10: Antikörper zur Färbung der proximalen und distalen TEC

Das intrazelluläre Cytokeratin und die Antigene CD10 und EPCAM auf der Zelloberfläche von TEC wurden angefärbt.

3.8.4 Isotypkontrollen

Für die Isotypkontrollen wurde der Urin von 3 hospitalisierten Patienten bei Zustand nach Nierentransplantation verwendet. Die Isotypkontrollen wurden für jeden Antikörper der TEC durchgeführt und jeweils mit einer Positivkontrolle des gleichen Patienten verglichen. Die Verdünnung der Isotypen war identisch zur jeweiligen Antikörperkonzentration und betrug 1:10 (10 µl auf 100 µl) oder 1:100 für den Cytokeratin Antikörper von BioLegend. Die CD10 und EPCAM Isotypkontrollen wurden zusätzlich mit Cytokeratin Antikörper angefärbt. Die CD10 Isotypkontrolle wurde zusätzlich mit EPCAM Antikörper angefärbt. Die EPCAM Isotypkontrolle wurde zusätzlich mit CD10 Antikörper angefärbt. Das Protokoll zur Urinverarbeitung und Zellfärbung entsprach dem Protokoll wie bei 3.8.1-3.8.3 beschrieben. Die Messeinstellung am Durchflusszytometer und das Gating in FlowJo erfolgte nach dem Protokoll von 3.8.5 und 3.8.6 (Abbildung 7B).

3.8.5 Messung am Durchflusszytometer

Die Messung der Zellzahlen erfolgte am gleichen Tag wie die Zellfärbung. Die Einstellungen am Durchflusszytometer (MACS Quant Analyzer, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) entsprachen weitgehend den Standardeinstellungen zur Analyse von Blutzellen. Anhand von Voruntersuchungen mit Urin von nierentransplantierten Patienten wurde die Kompensation am Gerät richtig eingestellt. Der FSC und SSC wurden erweitert. Direkt vor der Messung wurden alle Proben mit einem 70 µl Filter gefiltert (PluriStrainer®, pluriSelect Life Science, Leipzig, Deutschland). So wurde Zelldetritus aussortiert und eine Verstopfung des Durchflusszytometers verhindert. Alle Proben wurden vor der Messung für einige Sekunden auf einen Vortexmischer gehalten. Die Aufnahmemenge am Gerät betrug 100 µl. Die Flussgeschwindigkeit wurde auf 2000 Zellen pro Sekunde festgelegt.

3.8.6 Gating-Strategie

Zur Auswertung der Durchflusszytometrie-Bilder wurde FlowJo 10.3 (Tree Star, Ashland, Oregon, USA) verwendet. Das Gating der CD10+ TEC und EPCAM+ TEC erfolgte nach dem folgenden Schema:

Gate 1: Auswahl der Singlets (X: FSC-A, Y: FSC-H) (nicht dargestellt)

Gate 2: Auswahl der Cytokeratin+ Zellen (X: FITC, Y: SSC-A)

Gate 3: Auswahl der CD10+ TEC und EPCAM + TEC (X: PE-Vio770, Y: APC-Vio770)

Die Bilder der Positivprobe wurden mit denen der Negativprobe verglichen, um ein präzises Gating zu erreichen. Die Gating-Strategie ist in Abbildung 7 dargestellt.

Gating und Isotypkontrolle der TEC

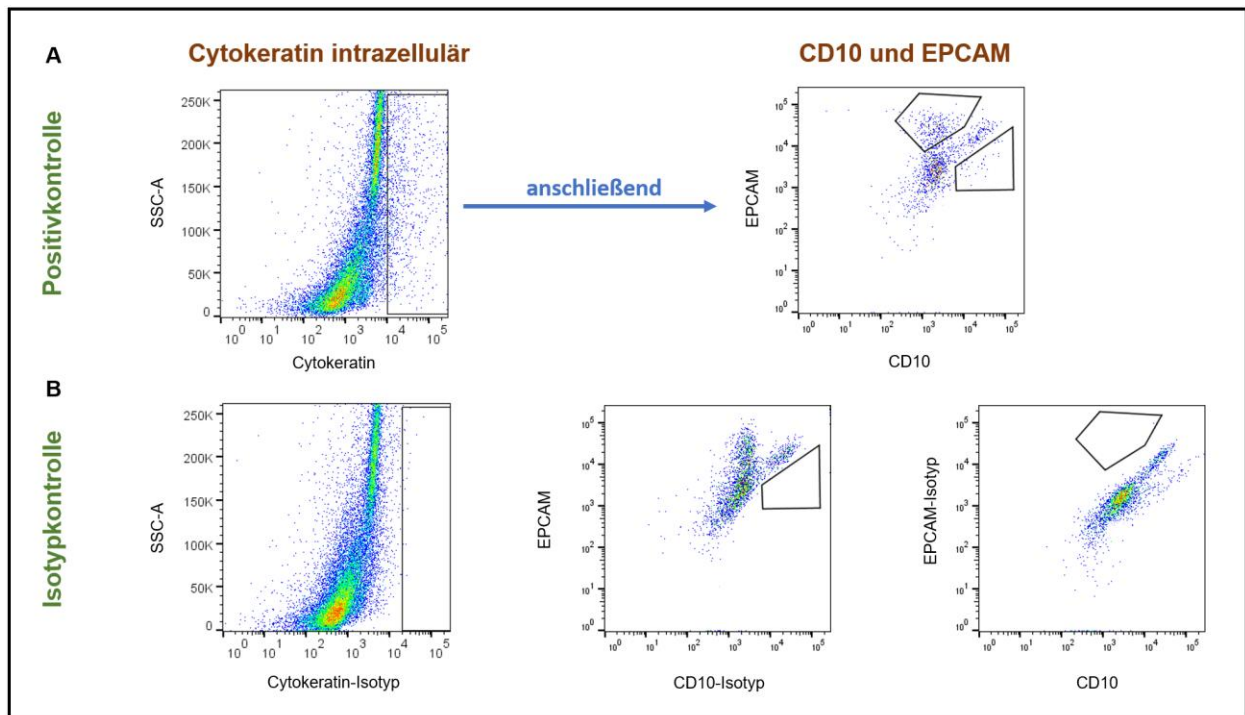


Abbildung 7: Gating und Isotypkontrolle der TEC

Repräsentative Urinprobe eines Patienten nach Nierentransplantation. A: Gating-Strategie für CD10⁺ und EPCAM⁺ TEC. B: Isotypkontrollen für Cytokeratin, CD10 und EPCAM.

3.9 Präsentation der Daten und statistische Verfahren

Die absoluten Zellzahlen wurden in die Einheit Zellzahlen pro 100 ml Urin umgerechnet. Die statistischen Analysen (Median, Mittelwert, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, Korrelationskoeffizient und Receiver-Operating-Characteristic (ROC)-Kurven) sowie die entsprechenden Abbildungen wurden mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software), Excel 2016 (Microsoft Corporation), Adobe Illustrator CS4 (Adobe Systems) und PowerPoint 2016 (Microsoft Corporation) erstellt. Für alle statistischen Tests wurde das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgelegt. Da es sich um eine explorative Arbeit handelt, wurde auf eine Bonferroni-Korrektur verzichtet.

3.9.1 Längsschnittkohorte

Zellzahlen im Verlauf

Zur Darstellung der Zellzahlveränderungen nach Transplantation wurden Abbildungen erstellt, die die Zellzahlen jedes einzelnen Patienten im zeitlichen Verlauf darstellen. Zur besseren Übersicht wurden auch die medianen Zellzahlen beider Gruppen graphisch abgebildet. Die Zellzahlen wurden für jeden Zeitraum am mittleren Tag aufgetragen. Die Zellzahlen aus dem Zeitraum Tag 60-110 wurden zur besseren Übersicht an Tag 60 abgebildet. Eine kleine Subgruppe der Delayed Graft Function wurde getrennt dargestellt. Sie bestand aus 4 Patienten mit chirurgischen Komplikationen. Chirurgische Komplikationen wurden als mögliche Ursache für unerwartete Zellzahlverläufe angesehen. Die Zellzahlen der betroffenen Patienten wurden daher näher analysiert. Die CD8 T-Zellmessung ist bei einem dieser Patienten aus organisatorischen Gründen fehlend.

Zellzahlen verschiedener Gruppen

Der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test wurde genutzt, um die Gruppe Good Graft Function mit Delayed Graft Function zu vergleichen. Weiterhin wurden mit dem Test die Subgruppe (4 Patienten mit chirurgischen Komplikationen) mit den übrigen Patienten aus der Gruppe Delayed Graft Function verglichen. Alle definierten Zeiträume nach Transplantation wurden ausgewertet.

ROC-Kurven der Biomarker

Alle drei Zelltypen und die Kombination aus CD8 T-Zellen pro TEC (jeweils für CD10+ und EPCAM+ TEC) wurden auf ihr Biomarker-Potenzial zur Erkennung von Delayed Graft Function untersucht. Hierfür wurden ROC-Kurven erstellt mit Berechnung der AUC, p-Wert und 95% Konfidenzintervall. Zudem wurden die Sensitivität und Spezifität bestimmt. Zur Auswahl des Cut-Off-Punktes wurde eine Sensitivität von mindestens 70% festgelegt.

3.9.2 Querschnittskohorte

Korrelation der Zellzahlen mit den Banff-Kriterien

Die Zellzahlen der CD8 T-Zellen, CD10+ TEC und EPCAM+ TEC wurden mit fünf verschiedenen Banff-Scores (jeweils Score 0-3) korreliert. Zur Bewertung der Korrelation

wurde der Korrelationskoeffizient Spearman r bestimmt und seine Signifikanz mit dem p -Wert getestet.

Zellzahlen verschiedener Gruppen im Vergleich

Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test untersucht. 5 Patienten mit Verdacht auf Abstoßung mussten aus der statistischen Analyse ausgeschlossen werden, da ihre Diagnosen wegen zu wenig Biopsiematerial „zweifelhaft“ waren. Sie sind in den Abbildungen lediglich als unausgefüllte Kreise dargestellt.

ROC-Kurven der Biomarker

Für den klinischen Einsatz müssen die Biomarker Abstoßung (TCMR und ABMR) erkennen und sicher von No RX abgrenzen. Für diesen Zweck wurden ROC-Kurven erstellt und AUC, p -Wert und 95% Konfidenzintervall berechnet. Die Sensitivität und Spezifität aller Biomarker (und Biomarker-Kombinationen) wurden für ausgewählte Cut-Off-Punkte (Sensitivität mindestens 70%) bestimmt. Die klinisch unauffällige Kontrollgruppe wurde in diese Analyse nicht eingeschlossen.

4 Ergebnisse

4.1 Längsschnittkohorte: Verlaufsbeobachtung nach Transplantation

4.1.1 Übersicht der Zellzahlen im zeitlichen Verlauf

Nach Nierentransplantation stiegen die medianen Zahlen von CD8 T-Zellen, CD10+ TEC und EPCAM+ TEC zuerst an, erreichten ihren Höhepunkt an Tag 3-5 und fielen anschließend wieder ab (Abbildung 8A-C). Dies galt für Patienten mit Good Graft Function und Delayed Graft Function. Einzige Ausnahme war die mediane Zellzahl von EPCAM+ TEC bei Delayed Graft Function. Sie war direkt nach der Transplantation an Tag 1-2 am höchsten und fiel anschließend ab. Die medianen Zellzahlen näherten sich an Tag 6-10 der Zellzahl von Tag 1-2 an oder lagen darunter. Am niedrigsten waren die Zellzahlen in beiden Gruppen ab Tag 60. Das beschriebene Verlaufsmuster traf auf viele Patienten zu, aber nicht auf alle. Dies wird beim Blick auf die Einzelverläufe ersichtlich (Abbildung 8D-I). Bei einigen sank die Zellzahl schon früher ab oder stieg erst später an.

4.1.2 Zellzahlen bei Patienten mit chirurgischen Komplikationen

Die Entwicklung der Zellzahlen von Patienten mit chirurgischen Komplikationen war sehr heterogen mit An- und Abstiegen an Tag 3-5 (Abbildung 8G-I). 1 Patient zeigte einen auffälligen Anstieg der Epithelzellen bis Tag 35. Die Zellzahlen unterschieden sich zu keinem der Zeiträume signifikant zur Zellzahl der übrigen Patienten der Gruppe Delayed Graft Function. Exemplarisch sind die Zellzahlen der Subgruppe an Tag 6-10 in Abbildung 9 dargestellt.

4.1.3 Vergleich der Zellzahlen im zeitlichen Verlauf

CD8 T-Zellen

Patienten der Gruppe Delayed Graft Function hatten an Tag 6-10 signifikant höhere CD8 T-Zellen im Urin als Patienten mit guter Transplantatfunktion ($p < 0,05$) (Abbildung 10A). Der Median betrug zu diesem Zeitraum 5842 Zellen/100 ml bei Delayed Graft Function und 242 Zellen/100 ml bei Good Graft Function. Zu anderen Messzeiträumen gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Epithelzellen

Für CD10+ TEC und EPCAM+ TEC gab es an keinem der Zeiträume signifikante Unterschiede zwischen Good Graft Function und Delayed Graft Function (Abbildung 10B-C).

Übersicht der Zellzahlen im Verlauf

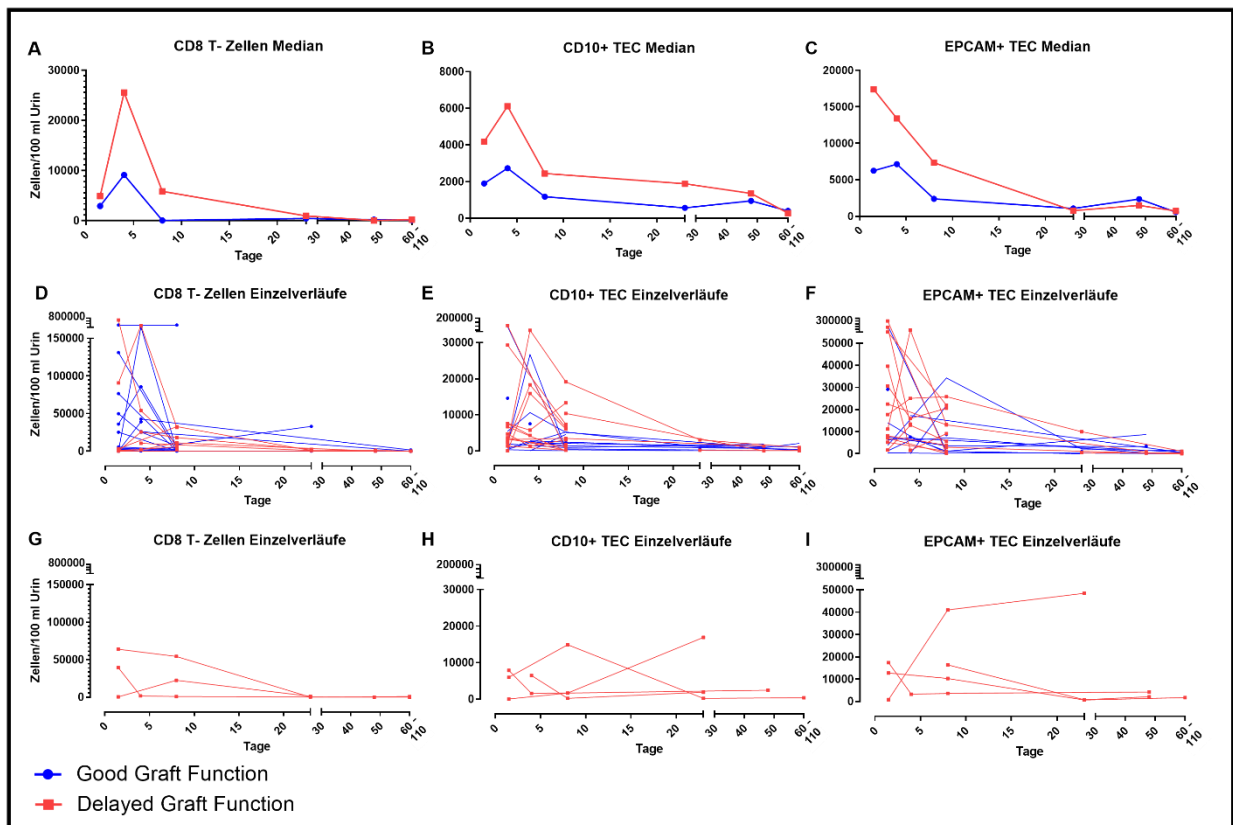


Abbildung 8: Übersicht der Zellzahlen im Verlauf

A-C: Mediane Zellzahl aller Patienten. D-F: Zellzahlen der einzelnen Patienten. G-I: Zellzahlen einer Subgruppe von Patienten mit chirurgischen Komplikationen. Diese Patienten sind in den Abbildungen D-F nicht dargestellt.

Delayed Graft Function und chirurgische Komplikationen

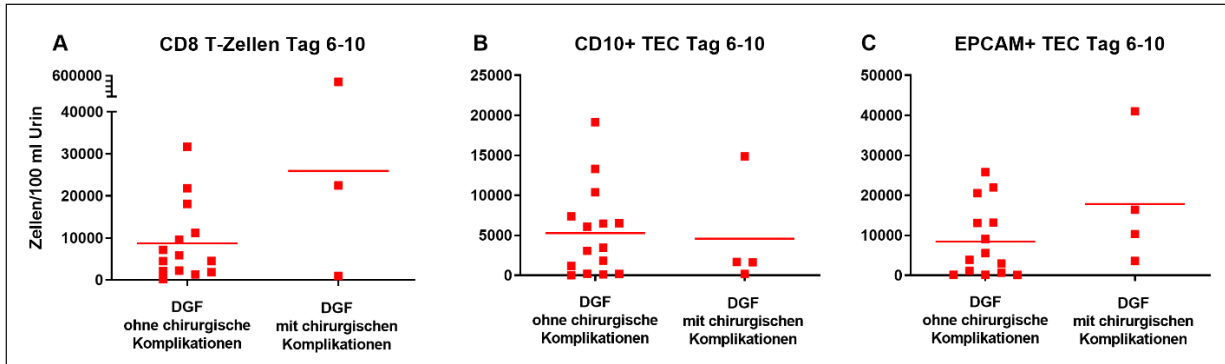


Abbildung 9: Delayed Graft Function und chirurgische Komplikationen

Darstellung der Zellzahlen und Mittelwerte bei DGF ohne chirurgische Komplikationen und mit chirurgischen Komplikationen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Exemplarisch ist der Zeitraum von Tag 6-10 dargestellt. A: CD8 T-Zellen. B: CD10+ TEC. C: EPCAM+ TEC. DGF: Delayed Graft Function.

Vergleich von Good Graft Function und Delayed Graft Function

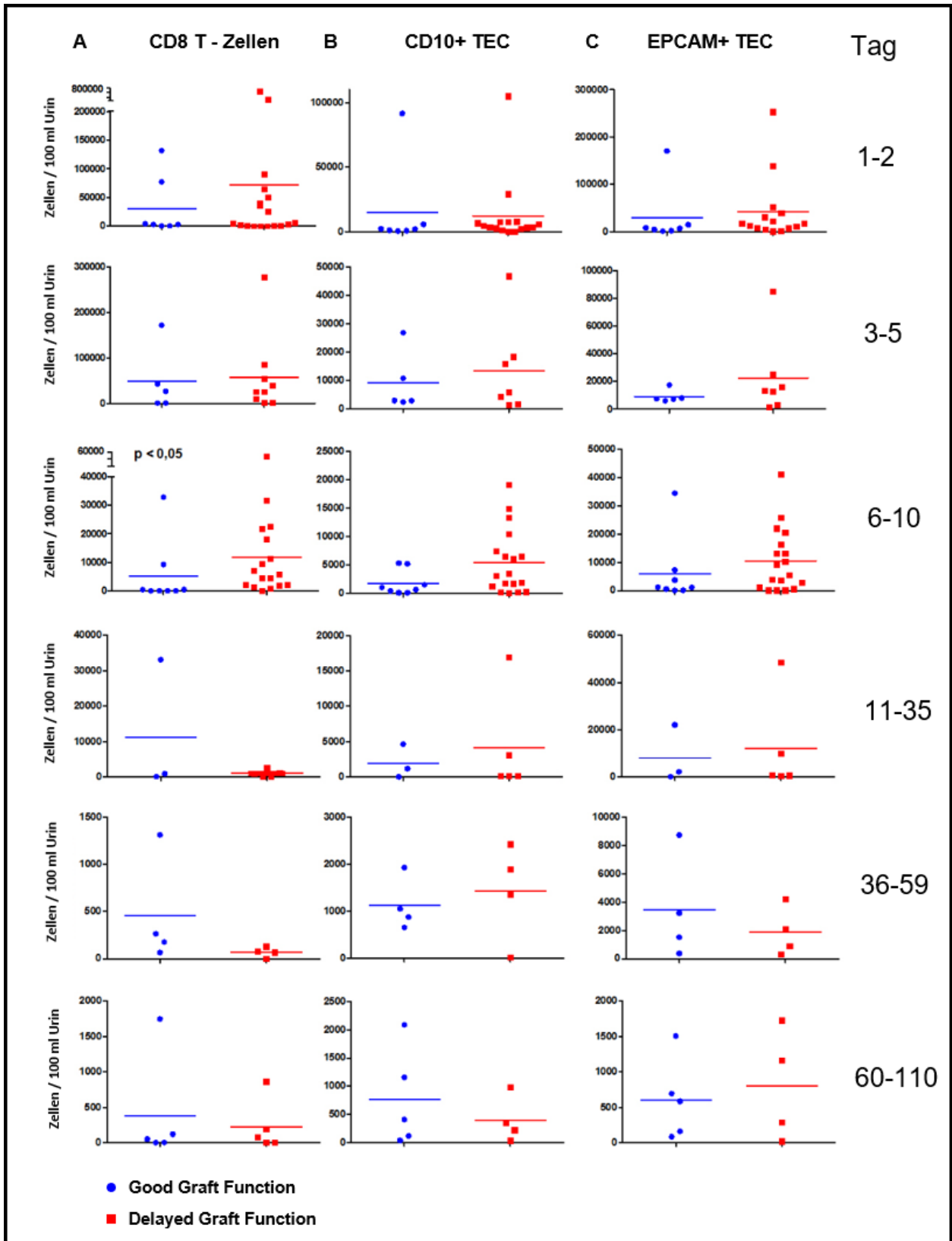


Abbildung 10: Vergleich von Good Graft Function und Delayed Graft Function

Dargestellt sind die einzelnen Zellzahlen und Mittelwerte. Patienten mit Delayed Graft Function hatten an Tag 6-10 signifikant höhere CD8 T-Zellen im Urin. A: CD8 T-Zellen. B: CD10+TEC. C: EPCAM+ TEC.

4.1.4 Urinzellen als potenzielle Biomarker für Delayed Graft Function

Biomarker an Tag 1-5 nach Transplantation

Die Ergebnisse der ROC-Kurven waren nicht signifikant. Kein einzelner Biomarker und keine Biomarker-Kombination unterschied die Gruppen an Tag 1-2 oder Tag 3-5.

Biomarker an Tag 6-10 nach Transplantation

Die ROC-Kurve der CD8 T-Zellen hatte an Tag 6-10 eine AUC von 0,79 bei $p < 0,05$. Der ausgewählte Cut-Off-Wert von >720 Zellen/100 ml Urin entsprach einer Sensitivität von 94% und einer Spezifität von 75% zur Erkennung von Delayed Graft Function. Eine Unterscheidung der beiden Gruppen anhand von CD10+ oder EPCAM+ TEC war nicht möglich.

Sowohl die Kombinationen CD8 T-Zellen/CD10+ TEC (AUC = 0,73; $p < 0,05$) als auch CD8 T-Zellen/EPCAM+ TEC (AUC = 0,78; $p < 0,01$) differenzierte Delayed Graft Function von Good Graft Function. Die Kombination CD8 T-Zellen/EPCAM+ TEC erreichte eine höhere Sensitivität (83%) und Spezifität (75%). Hierfür lag der Cut-Off-Wert bei $>0,185$ Zellen/100 ml Urin. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 und Tabelle 11 dargestellt.

Biomarker an Tag 11-110 nach Transplantation

Kein Zelltyp allein konnte Delayed Graft Function sicher detektieren. Lediglich die Kombination CD8 T-Zellen/CD10+ TEC grenzte Delayed Graft Function an Tag 36-59 ab (AUC = 0,94; $p < 0,05$). Bei einem Cut-Off-Wert $<0,06$ lag die Sensitivität bei 75% und die Spezifität bei 100% (Abbildung 11 und Tabelle 11).

ROC-Kurven zur Identifikation von Delayed Graft Function

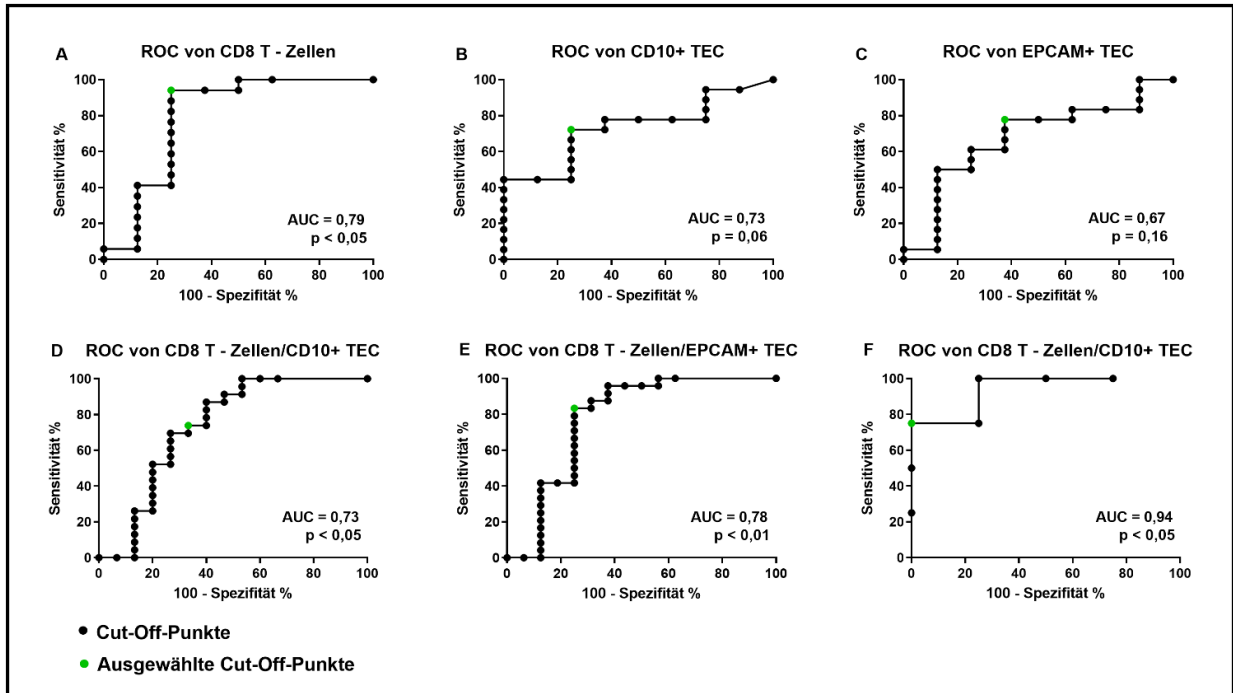


Abbildung 11: ROC-Kurven zur Identifikation von Delayed Graft Function

A-E: Tag 6-10. F: Tag 36-59. Die AUC war signifikant für CD8 T-Zellen und CD8 T-Zell-Kombinationen.

Werte der ROC AUC zur Identifikation von Delayed Graft Function

Biomarker	CD8 T- Zellen	CD10+ TEC	EPCAM+ TEC	CD8 T-Zellen/ CD10+ TEC	CD8 T-Zellen/ EPCAM+ TEC	CD8 T-Zellen/ CD10+ TEC
Tag	6-10	6-10	6-10	6-10	6-10	36-59
AUC	0,79	0,73	0,67	0,73	0,78	0,94
p-Wert	< 0,05	0,06	0,16	< 0,05	< 0,01	< 0,05
95% KI	0,55 – 1,03	0,54 – 0,93	0,44 – 0,90	0,54 – 0,92	0,60 – 0,95	0,76 – 1,11
Sensitivität %	94	72	78	74	83	75
Spezifität %	75	75	63	67	75	100
Cut-Off-Wert	>720	>1533	>1143	>0,353	>0,185	<0,060

Tabelle 11: Werte der ROC AUC zur Identifikation von Delayed Graft Function

Cut-Off-Werte in Urinzellen/100 ml. KI: Konfidenzintervall.

4.2 Querschnittskohorte: Analyse histopathologischer Kriterien

4.2.1 Korrelationen mit histopathologischen Banff-Scores

CD8 T-Zellen

Die Zahl an CD8 T-Zellen im Urin korrelierte stark mit interstitieller Entzündung (Spearman $r = 0,73$; $p < 0,001$) und moderat mit Tubulitis (Spearman $r = 0,48$; $p < 0,05$). Weiterhin korrelierten sie moderat negativ mit chronischer Glomerulopathie (Spearman $r = -0,39$; $p < 0,05$). Keine Korrelation fand sich zu Glomerulitis oder peritubulärer Kapillaritis (Abbildung 12).

Epithelzellen

Die Zahl an Epithelzellen im Urin zeigte eine moderat bis stark negative Korrelation mit chronischer Glomerulopathie (CD10+ TEC: Spearman $r = -0,51$; $p < 0,01$; EPCAM+ TEC: Spearman $r = -0,63$; $p < 0,001$;) und Glomerulitis (CD10+ TEC: Spearman $r = -0,44$; $p < 0,05$; EPCAM+ TEC: Spearman $r = -0,56$; $p < 0,01$). Die Epithelzellen korrelierten nicht mit interstitieller Entzündung, Tubulitis oder peritubulärer Kapillaritis (Abbildung 12).

Korrelationen von Urinzellen mit histopathologischen Banff-Scores

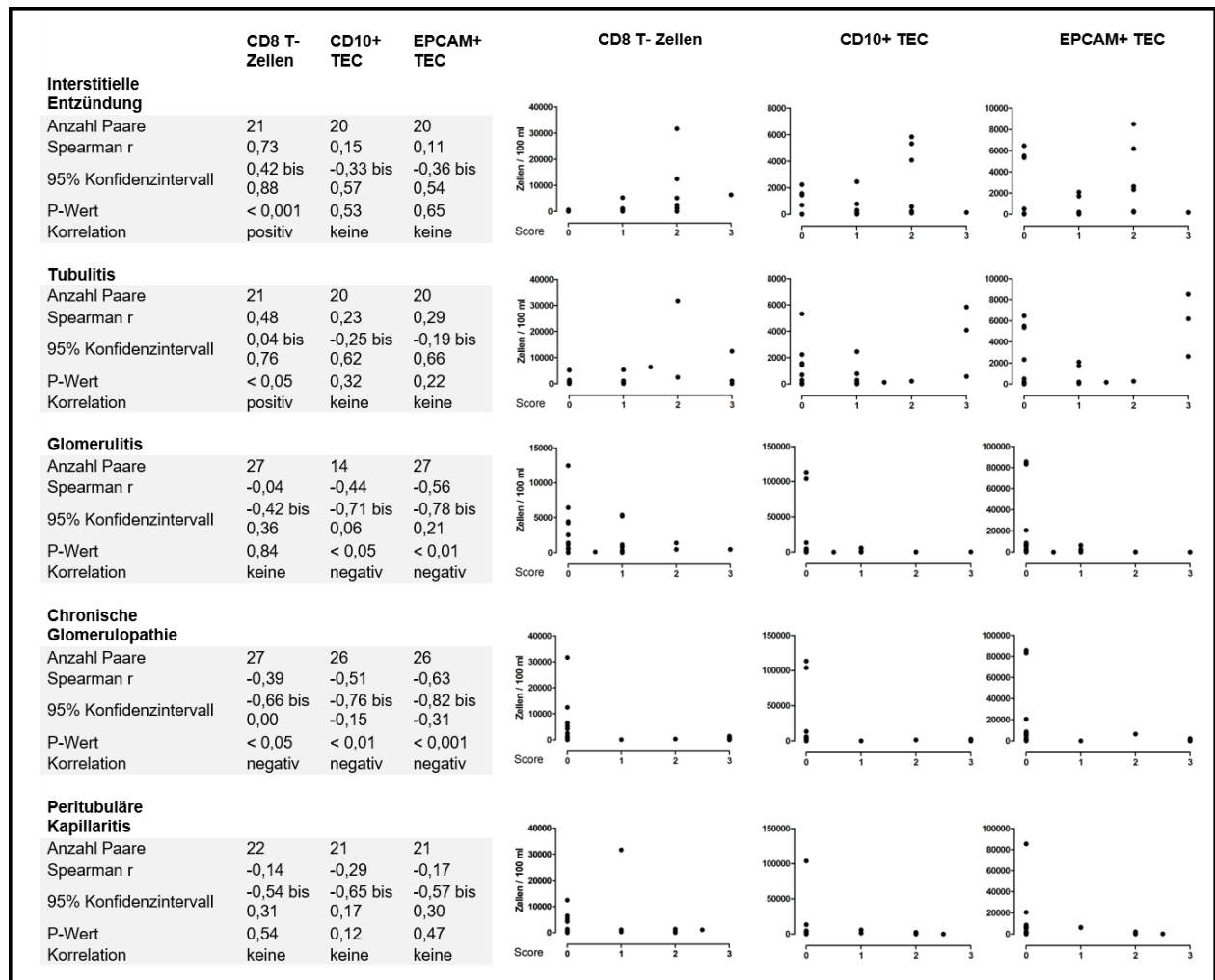


Abbildung 12: Korrelationen von Urinzellen mit Banff-Scores

Korrelationen von CD8 T-Zellen und TEC mit verschiedenen histopathologischen Banff-Scores von 0-3.

4.2.2 Zellzahlen bei Verdacht auf Abstoßung

CD8 T-Zellen

Die CD8 T-Zellen im Urin waren bei Patienten mit TCMR signifikant höher als bei Patienten mit ABMR ($p < 0,05$). Die medianen Zellzahlen bei Patienten mit Abstoßung betragen 1823 Zellen/100 ml für TCMR und 320 Zellen/100ml für ABMR. No Rx hatte einen Median von 1276 Zellen/100 ml. Für die CD8 T-Zellen wurde kein Unterschied zwischen No RX und TCMR oder No RX und ABMR festgestellt (Abbildung 13).

Epithelzellen

Die mediane Zellzahl von CD10+ TEC und EPCAM+ TEC Zahl war bei No RX am höchsten mit 4596 und 1007 Zellen/100 ml Urin. Bei TCMR betrug die mediane Zellzahl/100 ml Urin 289 (CD10+ TEC) und 1149 (EPCAM+ TEC), bei ABMR 90 (CD10+ TEC) und 42 (EPCAM+ TEC). Bei No RX waren CD10+ TEC signifikant höher als bei TCMR ($p < 0,01$) und ABMR ($p < 0,001$). Es gab keinen signifikanten Unterschied bezüglich der CD10+ TEC zwischen TCMR und ABMR. EPCAM+ TEC waren ebenfalls signifikant höher bei No RX als bei TCMR ($p < 0,01$) und ABMR ($p < 0,01$). Gleichzeitig waren EPCAM+ TEC bei TCMR signifikant höher als bei ABMR ($p < 0,05$) (Abbildung 13).

4.2.3 Zellzahlen der Kontrollgruppe

CD8 T-Zellen

Die CD 8 T-Zellen waren in der Kontrollgruppe signifikant niedriger als bei Patienten mit Biopsie (im Vergleich zu TCMR: $p < 0,001$; ABMR: $p < 0,05$; No RX: $p < 0,01$). Ihre mediane Zellzahl betrug 0 Zellen/100ml Urin (Abbildung 13).

Epithelzellen

Die mediane Zellzahl der CD10+ TEC lag bei 338/100 ml. Für EPCAM+ TEC lag die mediane Zellzahl bei 1007 Zellen/100 ml Urin. CD10+ TEC waren in der Kontrollgruppe signifikant niedriger als bei No RX ($p < 0,0001$). Auch EPCAM+ TEC waren in der Kontrollgruppe signifikant niedriger als bei No RX ($p < 0,001$). Außerdem waren EPCAM+ TEC in der Kontrollgruppe signifikant höher als bei ABMR ($p < 0,05$). Es gab keine signifikanten Unterschiede zu den anderen Biopsiegruppen (Abbildung 13).

Urinzellen bei verschiedenen Diagnosen

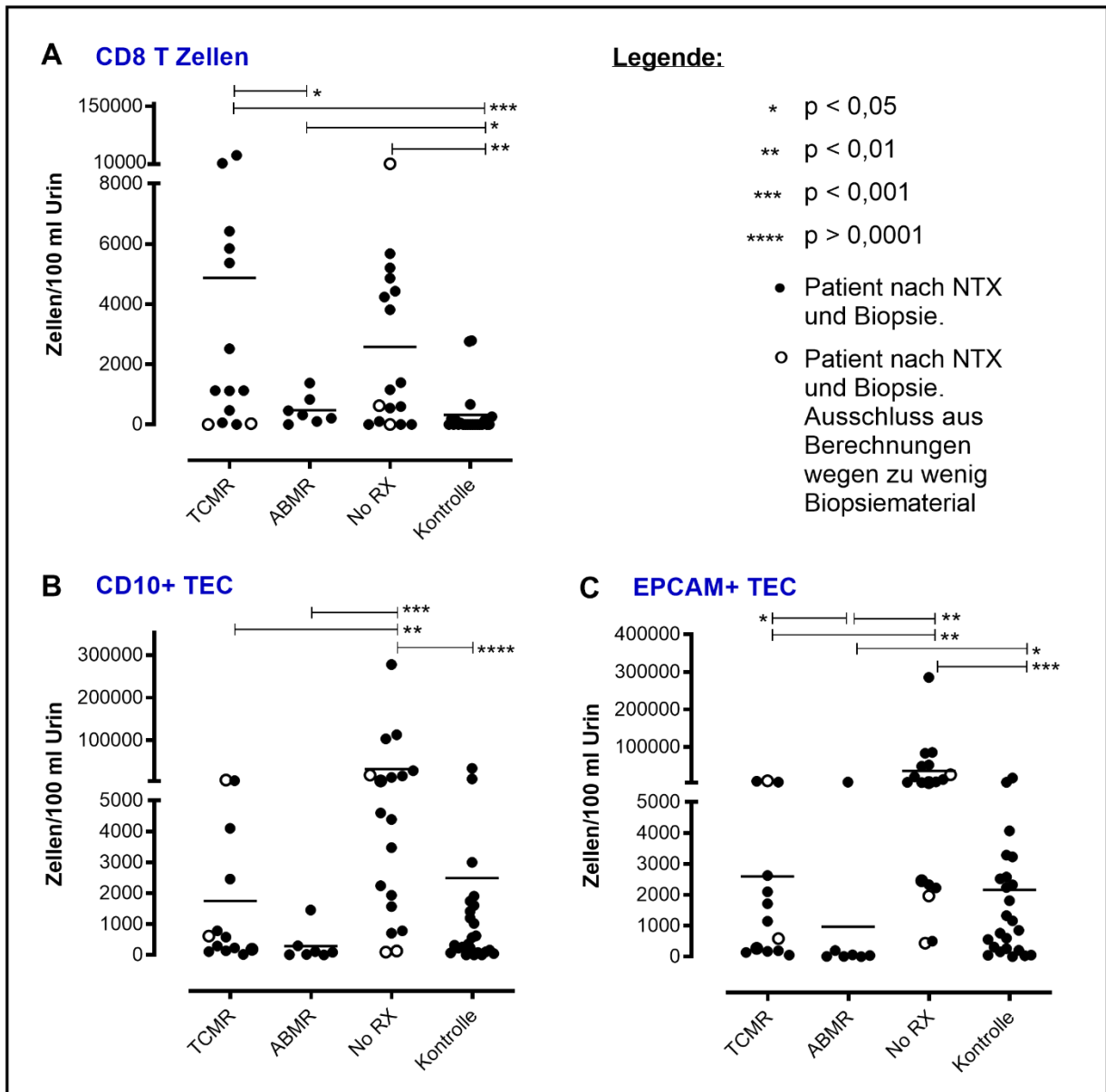


Abbildung 13: Urinzellen bei verschiedenen Diagnosen

Dargestellt sind die einzelnen Zellzahlen und Mittelwerte. NTX: Nierentransplantation.

A: CD8 T-Zellen. B: CD10+ TEC. C: EPCAM+ TEC.

4.2.4 Urinzellen als potenzielle Biomarker für Abstoßung

CD8 T-Zellen

Die Ergebnisse der ROC-Kurven waren nicht signifikant. CD8 T-Zellen grenzten Patienten mit Abstoßung nicht von der Vergleichsgruppe ab (AUC 0,52; $p = 0,88$) (Abbildung 14 und Tabelle 12).

Epithelzellen

Die Epithelzellen grenzten Patienten mit Abstoßung von Patienten ohne Abstoßung ab. Die AUC von CD10+ TEC lag mit 0,91 ($p < 0,0001$) etwas höher als die von EPCAM+ TEC (AUC: 0,89; $p < 0,001$). Bei einem Cut-Off-Wert <642 Zellen/100 ml erreichten CD10+ TEC als Biomarker eine Sensitivität von 72% und eine Spezifität von 100% zur Erkennung von Abstoßung. EPCAM+ TEC erreichten bei einem Cut-Off-Wert von <2164 Zellen/100 ml eine höhere Sensitivität (78%) bei niedrigerer Spezifität (93%) (Abbildung 14 und Tabelle 12).

Biomarker-Kombinationen

Die Biomarker-Kombinationen zeigten keine größeren ROC AUC als die einzelnen Epithelzellen. Die AUC von CD8 T-Zellen/CD10+ TEC lag bei 0,79 ($p < 0,01$) mit einer Sensitivität von 72% und einer Spezifität von 93% beim ausgewählten Cut-Off-Wert $> 0,3$ Zellen/100 ml Urin. Die AUC von CD8 T-Zellen/EPCAM+ TEC lag bei 0,81 ($p < 0,01$) mit gleicher Sensitivität von 72% und niedrigerer Spezifität von 86% (ausgewählter Cut-Off-Wert $>1,035$ Zellen/100 ml Urin) (Abbildung 14 und Tabelle 12).

ROC-Kurven zur Identifikation von Transplantatabstoßung

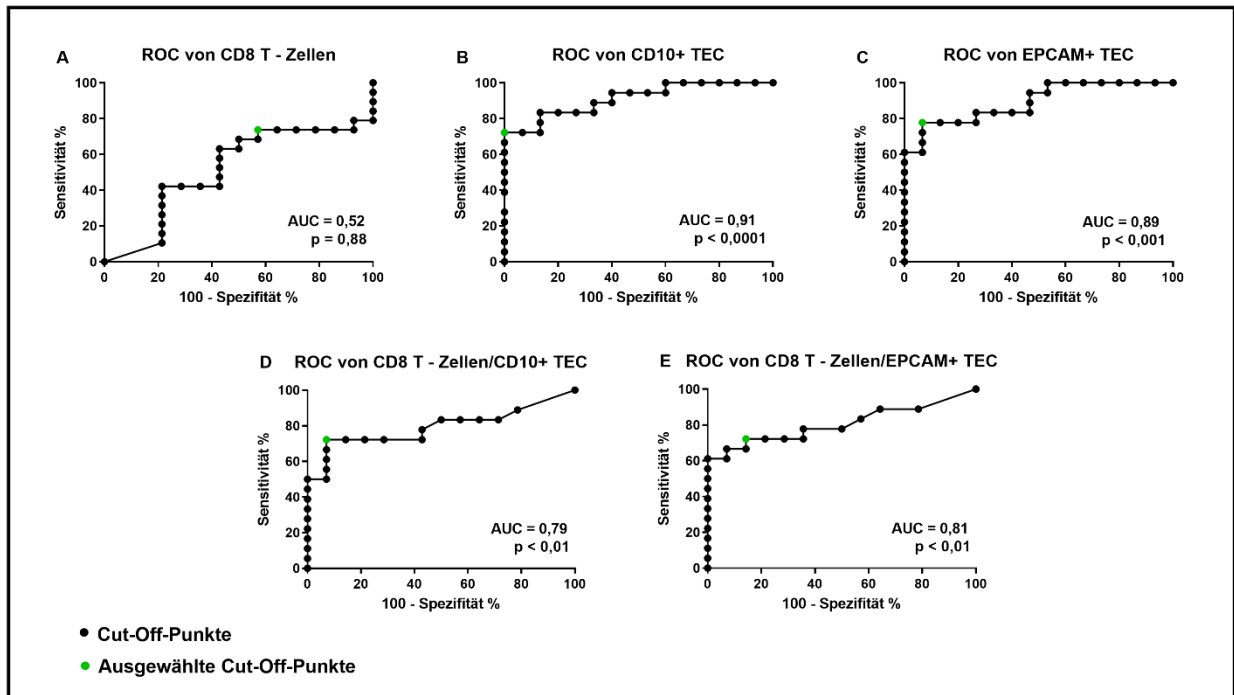


Abbildung 14: ROC-Kurven zur Identifikation von Transplantatabstoßung

Die histopathologischen Befunde TCMR und ABMR wurden als Transplantatabstoßung definiert und von No RX abgegrenzt. CD10+ TEC erreichten die größte AUC von 0,91.

Werte der ROC AUC zur Identifikation von Transplantatabstoßung

Biomarker	CD8 T-Zellen	CD10+ TEC	EPCAM+ TEC	CD8 T-Zellen/ CD10+ TEC	CD8 T-Zellen/ EPCAM+ TEC
AUC	0,52	0,91	0,89	0,79	0,81
p-Wert	0,88	< 0,0001	< 0,001	< 0,01	< 0,01
95% KI	0,31 – 0,72	0,82 – 1,01	0,79 – 1,00	0,63 – 0,96	0,65 – 0,97
Sensitivität %	74	72	78	72	72
Spezifität %	43	100	93	93	86
Cut-Off-Wert	<3164	<642	<2164	>0,300	>1,035

Tabelle 12: Werte der ROC AUC zur Identifikation von Transplantatabstoßung

Cut-Off-Werte in Urinzellen/100 ml. KI: Konfidenzintervall.

5 Diskussion

Die Abstoßung der Spenderniere ist eine gefürchtete Komplikation nach Transplantation. Die Banff-Klassifikation berücksichtigt Immunzellen und Veränderungen der Basalmembran als histopathologische Marker für Abstoßung.⁸ CD8 T-Zellen und TEC gelangen bei renaler Abstoßung ins Tubulussystem und verlassen die Niere über die Ausscheidung. Im Urin sind sie durchflusszytometrisch anhand ihrer Größe, Granularität und Antigene identifizierbar. Vor über 30 Jahren wurden die ersten Studien entsprechender Urin-Biomarker in der Transplantationsmedizin veröffentlicht. Seitdem wächst das Verständnis für Nierentransplantat-Abstoßung und bringt neue potenzielle Zielmoleküle hervor. Die vorliegende Arbeit bestätigt durchflusszytometrisch gemessene CD8 T-Zellen und TEC als potenzielle Biomarker für das Monitoring nach Nierentransplantation.

5.1 Ischämie und Aktivierung des Immunsystems nach Transplantation

Die Zahlen aller Zelltypen erreichten innerhalb der ersten 5 Tage postoperativ ihren Höhepunkt. Dieser Trend war sowohl bei Good Graft Function auch bei Delayed Graft Function zu beobachten. Als Ursache für den Zellanstieg sind Ischämie-Reperfusionsschäden anzunehmen. Das Nierengewebe ist für die Dauer des operativen Eingriffs vom menschlichen Blutkreislauf abgeschnitten. Aufgrund von Sauerstoffmangel wechseln die Zellen zu einem anaeroben Metabolismus mit hohem Adenosintriphosphat (ATP)-Verbrauch. Bei verminderter Aktivität der Na/K-ATPase steigt das intrazelluläre Kalium. Die Folge sind lysosomale Destabilisation, Zerstörung der Zelle durch Enzyme und schließlich Zelltod.^{97,112,113} Darüber hinaus setzen hypoxische TEC schadensassoziierte molekulare Strukturen (engl. damage-associated molecular patterns, DAMPs) frei. Diese DAMPs binden an Toll-Like-Rezeptoren auf Dendritischen Zellen und bewirken deren Aktivierung und Reifung.¹¹⁴ Die Reperfusion verstärkt entzündliche Prozesse: Komplement wird aktiviert, erhöhte reaktive Sauerstoffspezies vermitteln Leukodiapedese, Dendritische Zellen aktivieren vermehrt T-Zellen und die Konzentration proinflammatorischer Chemokine steigt. Die vermehrte Bildung von Superoxiden, Stickstoffmonoxid und Peroxynitrat fördert DNA-Strangbrüche und Lipidperoxidation. Die Zellen in der Niere gehen durch Apoptose und Nekrose unter.⁹⁷

Erhöhte Urin-Zellzahlen nach Transplantation wurden schon 1989 festgestellt. Segasothy et al. beschrieben damals eine erhöhte TEC-Konzentration, die 2 Wochen lang nach

Transplantation anhielt. Ein solcher Verlauf trat bei allen untersuchten Patientengruppen ein, unabhängig von ihren histopathologischen Diagnosen.⁶⁹ Eine wichtige Energiequelle für proximale TEC sind Fettsäuren. Bei Hypoxie exprimieren sie daher vermehrt Fatty acid-binding Proteine (FABPs) auf ihrer Zelloberfläche. Das Protein ist auch im Urin messbar. Der Subtyp L-FABP ist bei renaler Ischämie erhöht und wird in diesem Zusammenhang auch als Urin-Biomarker diskutiert.¹¹⁵ In der vorliegenden Arbeit waren die Zellzahlen nach Transplantation sehr variabel. Ein spezifischer Zeitraum für das Abklingen von Ischämie-Reperfusionsschäden konnte anhand der untersuchten Biomarker nicht ermittelt werden. Die niedrigste mediane Zellzahl wurde spätestens ab Tag 60 nach Transplantation erreicht. Zur Reduktion von inflammatorischen Reaktionen bekommen alle Patienten perioperativ eine immunsuppressive Therapie. Eine multizentrische Studie von Rush et al. zeigte, dass moderne Medikamente, besonders in der frühen Phase nach Transplantation, die lokale Entzündungsreaktionen unterdrücken.¹¹⁶ Zum jetzigen Zeitpunkt ist unklar, inwiefern die immunsuppressive Therapie die Ausscheidung potenzieller Urin-Biomarker verändert.

5.2 CD8 T-Zellen und TEC als Urin-Biomarker für Abstoßung

CD8 T-Zellen im Urin spiegeln parenchymale Inflammation wider. Die Zellzahl im Urin korrelierte mit bioptisch gesicherter interstitieller Entzündung und Tubulitis, zwei typischen Merkmalen der TCMR. Es gab keine Korrelationen zwischen CD8 T-Zellen und umschriebener Inflammation an Glomeruli oder peritubulären Kapillaren. Patienten mit Verdacht auf Abstoßung hatten mehr CD8 T-Zellen im Urin als die Kontrollgruppe. 1982 berichteten Krischna und Fellner von persistierender Lymphozyturie bei Rejektion. Die Identifizierung der Zellen erfolgte anhand ihrer Morphologie im Mikroskop.¹¹⁷ Viele Jahre später untersuchten Yu et al. 42 nierentransplantierte Patienten. Sie legten einen Cut-Off-Wert von 10% Lymphozyten und 15% Granulozyten fest, um stabile Transplantatfunktion von akuter Rejektion (Sensitivität 63%, Spezifität 79%) und akuter Tubulusnekrose (Sensitivität 100%, Spezifität 80%) abzugrenzen.⁷⁰ Die Ergebnisse ließen vermuten, dass Lymphozyten nur unspezifische Marker für Rejektion sind. Es gab weitere Studien, die Lymphozyten-Subgruppen untersuchten. 1992 veröffentlichten Nanni-Costa et al. eine durchflusszytometrische Analyse mit 223 Urinproben von 127 Patienten. Sie fanden erhöhte zytotoxische CD8 T-Zellen bei akuter Rejektion und erhöhte CD4 T-Zellen bei bakterieller Infektion.¹¹⁸ Ähnliche Resultate publizierten Galante et al. 2006. Sie untersuchten insgesamt 50 Patienten, von denen 13 eine akute Rejektion hatten. Die Patienten der Vergleichsgruppen hatten eine akute

Tubulusnekrose, Pyelonephritis, chronische Nephropathie oder stabile Transplantatfunktion. Galante et al. fanden erhöhte T-Zellen im Urin von Patienten mit akuter Rejektion. Die Mehrheit der T-Lymphozyten waren CD8 T-Zellen.¹¹⁹ Wahrscheinlich sind CD8 T-Zellen als alleiniger Urin-Biomarker für Abstoßung nicht geeignet. In dieser Arbeit hatten weder Patienten mit TCMR oder ABMR höhere CD8 T-Zellzahlen im Urin als Patienten der Gruppe No RX. Die Nierentransplantat-Abstoßung konnte anhand von CD8 T-Zellen nicht abgegrenzt werden (AUC 0,52; $p = 0,88$).

Eventuell können die untersuchten Zelltypen zur besseren Differenzierung verschiedener Rejektionstypen beitragen. Patienten mit ABMR hatten weniger CD8 T-Zellen im Urin als Patienten mit TCMR. Die CD8 T-Zellen und TEC korrelierten negativ mit chronischer Glomerulopathie. Eine negative Korrelation wurde auch zwischen TEC und Glomerulitis festgestellt. Ein bekanntes Problem der Banff-Klassifikation ist die Überschneidung von Kriterien der TCMR und ABMR, besonders bezüglich der Lokalisation von Inflammation. Sowohl bei vaskulären, glomerulären als auch tubulären Entzündungsinfiltraten treten Schwierigkeiten bei der Abgrenzung auf.¹⁰¹ Bei ABMR zirkulieren Antikörper entweder schon vor Transplantation im Empfängerblut oder werden nach Transplantation vom Immunsystem des Empfängers gebildet. Die Antikörper richten sich spezifisch gegen HLA des Nierentransplantats. Es entstehen chronische Gewebläsionen und Endothelschäden. Auch die Infiltration von Immunzellen, wie CD8 T-Zellen, sind als sekundäre Prozesse beschrieben. Dies kann die histopathologische Unterscheidung von TCMR und ABMR erschweren. Neuere Parameter der Banff-Klassifikation sind totale parenchymale Inflammation (erstmalig in der Banff-Klassifikation 2007¹⁰¹) und i-IFTA (erstmalig in der Banff-Klassifikation 2015¹²⁰). Sie wurden eingeführt, weil unspezifische Inflammation im Narbenbereich ein prognostisch negativer Faktor ist.¹²¹ Die Bedeutsamkeit dieser Scores wird weiterhin diskutiert, da sie auf unterschiedliche Pathologien hindeuten können. So ist i-IFTA beispielsweise ein Zeichen von ABMR, chronischer TCMR, BK-Virusinfektion, Pyelonephritis, rekurrenter Glomerulonephritis, Obstruktion und noch anderen Nierenerkrankungen.²³

Obwohl Transplantatabstoßung mit einer erhöhten Apoptoserate assoziiert ist^{122,123}, waren TEC bei Patienten mit TCMR oder ABMR nicht erhöht. Stattdessen waren die Zellzahlen niedriger als bei Patienten der Gruppe No RX. Patienten mit ABMR hatten die niedrigsten Zellzahlen. Laut Wever et al. steuert p53 die Apoptoseinduktion in TEC, indem es B-cell lymphoma 2 Proteine (Bcl-2) herunter- und BCL-2-associated X Proteine

(Bax) heraufreguliert. In ihrer Untersuchung zu akuter Rejektion war die Ratio von Bcl-2 zu Bax zugunsten von Bax verschoben und die Expression von p53 in tubulären Nuclei erhöht.¹²³ Die erhöhte Apoptose bei Abstoßung wurde mit den hier ausgewählten Biomarkern nicht erfasst. Demgegenüber stehen die Ergebnisse bezüglich der TEC-Populationen aus einer Studie von Segasothy et al. Die Gruppe untersuchte 176 Urinsediment-Proben. Die Requisition erfolgte in den ersten 3 Monaten nach Transplantation. Mittels Immunperoxidase-Färbung wurden Granulozyten und TEC als dominante Populationen bei einer akuten Abstoßung nachgewiesen. CD4 und CD8 T-Zellen machten lediglich 1-3% der Urinzellen aus. Alle Patienten mit bioptisch bestätigter Rejektion zeigten sowohl erhöhte Lymphozyten als auch erhöhte proximale TEC im Urin. Erstaunlicherweise stieg die Zellzahl in 17 Fällen schon vor der klinischen Diagnose an. Als Lymphozyten-Antikörper dienten damals AMD T4 und HuLy-m8. URO3 war Antikörper für proximale TEC, URO5 für distale TEC.⁶⁹ Trotz widersprüchlicher Literatur überzeugten die TEC als Biomarker in der vorliegenden Arbeit. Bei einem Cut-Off-Wert von <642 Zellen/100 ml lag die Spezifität zur Erkennung von Abstoßung durch CD10+ proximale TEC bei 100%. Die Sensitivität lag bei 72% (AUC = 0,91). Distale EPCAM+ TEC erreichten eine etwas niedrigere AUC von 0,89. Die Zellen waren sensitiver, aber weniger spezifisch.

Da CD8 T-Zellen und TEC in der Niere miteinander kommunizieren und beide Zelltypen im Urin messbar sind, wurde auch die Kombination der Biomarker untersucht. Während CD8 T-Zellen als alleiniger Biomarker nicht überzeugten, wurden gute Ergebnisse mit der Kombination aus CD8 T-Zellen pro proximale CD10+ oder distale EPCAM+ TEC erreicht (AUC 0,79 – 0,81; $p < 0,01$). Daher ist eine genauere Betrachtung der Interaktion von CD8 T-Zellen und TEC interessant. Bei Nierentransplantat-Abstoßung nehmen TEC eine wichtige Schlüsselrolle als Immunregulatoren ein. Sie kommunizieren mit T-Zellen über Zell-Zell-Interaktionen, Zytokine und Chemokine¹²⁴. Als Antwort auf pro-inflammatorische Signale (z.B IFN-gamma aus Leukozyten) exprimieren sie HLA und Adhäsionsmoleküle, sodass die antigenspezifische Proliferation von T-Zellen gefördert wird.¹²⁵⁻¹²⁷ In immunhistochemischen Färbungen wurden MHC-Klasse-II Moleküle auf TEC bei akuter Abstoßung nachgewiesen.¹²⁸ Eine Studie von Mannon et al. erhärtet die Annahme, dass MHC-Klasse-II Moleküle auf TEC schädigende Effekte haben. Sie konnten zeigen, dass Spendernieren mit MHC-Klasse-II-Defekt eine bessere Nierenfunktion hatten als Spendernieren mit Wildtyp. Außerdem war ein MHC-Defekt mit weniger transplantat-infiltrierenden CD4 T-Zellen und abgeschwächter Rejektion assoziiert.¹²⁹ Neben ihrer

Funktion als antigenpräsentierende Zellen, nehmen TEC über die Ausschüttung von Mediatoren am Immungeschehen im Transplantat teil. Sie können gegensätzliche Effekte haben (Abbildung 15). Die Ausschüttung von TGF-beta mit IL-6, TNF-alpha, CC-Chemokin-Ligand-2 (CCL2), CCL5 und kostimulierenden Molekülen schädigen das Transplantat. Alleiniges TGF-beta, IL-15, NO-Synthase-2 (NOS2) und koinhibitorische Moleküle schützen wiederum das Nierengewebe. Welche Mediatoren überwiegen, hängt von Aktivierungsmuster und Umgebungsreaktionen ab. Die Aktivierung von TEC erfolgt über Zell-Zellkontakte oder Zytokine wie IL-1, IL-17- TNF-alpha oder IFN-gamma.¹²⁴

Vereinfachtes Schema zur Interaktion von Leukozyten und TEC

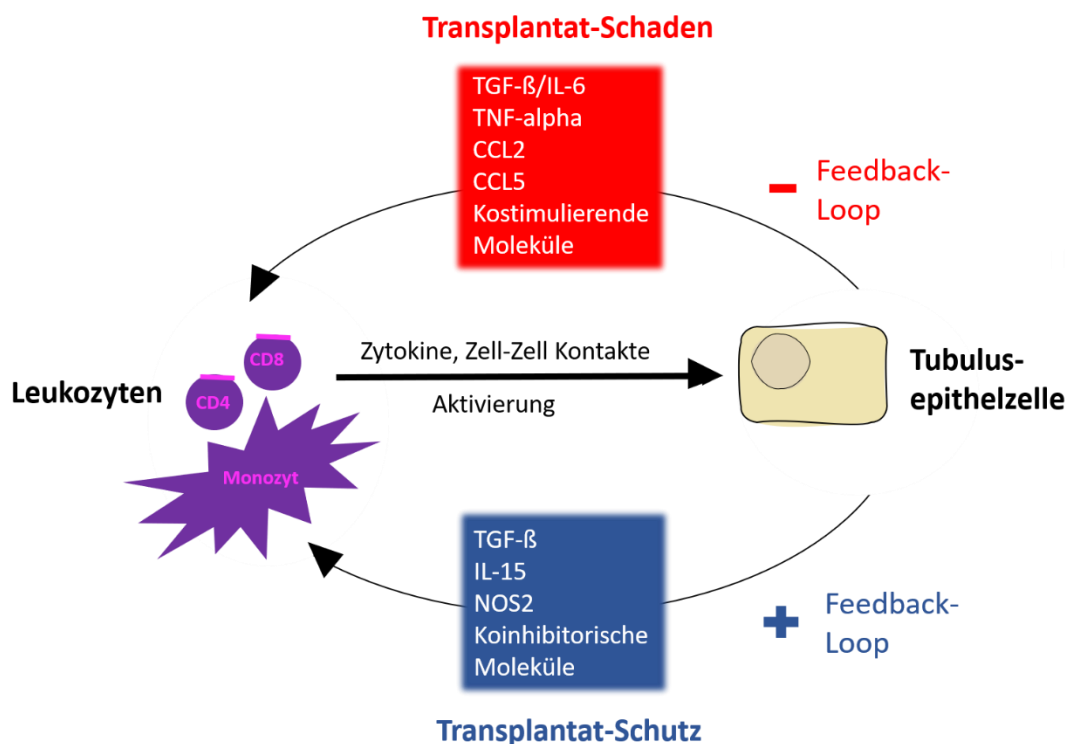


Abbildung 15: Vereinfachtes Schema zur Interaktion von Leukozyten und TEC

Leukozyten in der Niere aktivieren TEC. Ihre Antwort kann sich positiv oder negativ auf das Transplantat auswirken. Nachdruck aus *Transplantation Reviews*, Band 23, Ausgabe 3 „Renal tubular epithelial cells as immunoregulatory cells in renal allograft rejection“, Seiten-Nummer 129-138, Copyright (2009) mit Genehmigung von Elsevier. Den kleinen gestalterischen Änderungen wurde zugestimmt.

5.3 Ursachen von Komplikationen und Transplantatdysfunktion

Weniger als 5% der Patienten erleiden ein Transplantatversagen innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation.¹³⁰ Dennoch stellt eine Funktionseinschränkung im ersten Jahr nach Transplantation einen Risikofaktor für den Verlust des Transplantats dar.¹³¹ Nach einer Transplantation können immunologische und nicht-immunologische Ursachen die Transplantatfunktion verschlechtern. Langfristige Folgen sind Nephronverlust mit erhöhten Kreatininwerten, Proteinurie und Hypertonus.

5.3.1 Delayed Graft Function

Diese Studie bestätigt erhöhte CD8 T-Zellen als potenziellen Biomarker für Delayed Graft Function. CD8 T-Zellen identifizierten die Gruppe mit einer Sensitivität von 94% und einer Spezifität von 75% (AUC 0,79). Delayed Graft Function wurde über postoperative Kreatininwerte und Dialysepflichtigkeit innerhalb der ersten 7 Tage definiert. Fast zeitgleich schlug der CD8 T-Zell Biomarker an (Tag 6-10). Die Akkumulation von T-Zellen in der Niere ist für Transplantat-Abstoßung⁸, Tubulusnekrose^{132,133}, Autoimmunerkrankungen^{134,135}, Infektionen^{136,137} und Tumore¹³⁸ beschrieben. In dieser Arbeit konnten erhöhte CD8 T-Zellen bei Delayed Graft Function keiner Kausalität zugeordnet werden. Die Studienpopulation war sehr heterogen. Bei 4 von 21 Patienten waren chirurgische Komplikationen als Hauptursache von Delayed Graft Function anzunehmen. Bei ihnen wurden keine signifikanten Abweichungen in den Zellzahlen gefunden. Generell kann eine Vielzahl an chirurgischen Komplikationen nach Transplantation auftreten. Wichtige vaskuläre Komplikationen bei Nierentransplantation umfassen Thrombosen und Pseudoaneurysmen der Transplantatgefäße oder Stenosierung der Arteria renalis. Typische urologische Komplikationen sind Urinleckage, Ureterobstruktion, Ureterfistel und Lymphozele. Sie können durch Nachoperationen meist gut beherrscht werden.¹³⁹ Andere postoperative Komplikationen sind u.a. Hämatome, Blutungen, Serome, Wundinfektionen oder eine neue CMV-Infektion. Die Erkennung von Delayed Graft Function ist klinisch relevant. Betroffene Patienten haben ein erhöhtes Risiko für Abstoßung und Transplantatverlust.¹⁴⁰ In der vorliegenden Arbeit hatte die Patientengruppe ab Tag 11 keine erhöhten CD8 T-Zellen mehr. Eine mögliche Ursache könnten immunsuppressive Therapieinterventionen sein. Die Zellzahlen von CD10+ TEC und EPCAM+ TEC waren bei Delayed Graft Function nicht verändert. Stattdessen überzeugte die Kombination von CD8 T-Zellen/CD10+ TEC an den postoperativen Tagen 36-59. Bei einem Cut-Off von <0,06 erkannten sie Delayed Graft Function mit einer Sensitivität von 75%, bei einer Spezifität von 100% (AUC 0,94). Es ist

unklar, warum die Biomarker-Kombination so spät im Verlauf anschluss. Es ist denkbar, dass sie Delayed Graft Function erst dann detektiert, wenn Entzündungsvorgänge der Ischämie-Reperfusionreaktion nachlassen.

Die Prävalenz von Delayed Graft Function wird in der Literatur mit Werten von 2–50% angegeben.¹⁴¹ Einige Autoren bezeichnen Delayed Graft Function als akutes Nierenversagen nach Transplantation.¹⁴² In diesem Zusammenhang wurden in der Vergangenheit auch Urin-Biomarker untersucht, die für akutes Nierenversagen bekannt sind, z.B. Neutrophil Gelatinase-assoziiertes Lipocalin (NGAL). TEC können das Protein reabsorbieren oder sekretieren. Heyne et al. fanden erhöhtes NGAL bei Patienten mit akutem Nierenversagen im Kontext von Transplantatabstoßung. Der Biomarker differenzierte die Gruppe mit einer Sensitivität von 100% und Spezifität von 93%.⁶⁸ Eine andere Gruppe analysierte NGAL und IL-18 am Tag der Operation von 23 Patienten. Erhöhte Urinwerte waren Prädiktoren für Delayed Graft Function mit einer AUC von 0,90.¹⁴³ 2007 beschrieben Schaub et al. erhöhtes NGAL, Alpha-1-Mikroglobulin und Retinol-Binding-Protein bei Nierentransplantierten mit Tubulitis.¹⁴⁴ Zur Abgrenzung von subklinischer Tubulitis waren die Marker nicht geeignet und keine Alternative zur Histopathologie. Auch Beta-2-Mikroglobulin wurde lange als vielversprechender Biomarker für Abstoßung diskutiert. Allerdings stellte sich heraus, dass der Marker bei alleiniger tubulärer Schädigung oder interstitieller Fibrose ebenfalls erhöht war.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ Die Differenzierung von Ischämie, Tubuluspathologien und Abstoßung anhand von Urin-Biomarkern bleibt eine Herausforderung.

5.3.2 No RX

Die Gruppe No RX präsentierte sich heterogen. Bei den Patienten wurde zwar eine klinische Verschlechterung der Transplantatfunktion festgestellt, eine Abstoßung lag histologisch jedoch nicht vor. Bei der Patientengruppe wurden signifikant mehr CD8 T-Zellen, proximale CD10+ TEC und distale EPCAM+ TEC im Urin nachgewiesen als bei der Kontrollgruppe. Welche Pathologien in den Nierentransplantaten vorlagen, wurde in dieser Arbeit nicht näher untersucht. Wichtige Differentialdiagnosen bei Transplantatdysfunktion sind Ischämie-Reperfusionsschaden mit Tubulusnekrose, Nephronschaden mit erhöhter Glomerulosklerose und mikrovaskulären Abnormalitäten durch Calcineurin-Toxizität, Hypertonus, Diabetes mellitus, Pyelonephritis oder Virusinfektionen.³⁰ Eine aktive BK-Virusinfektion manifestiert sich als renale Dysfunktion; bei 40-60% der betroffenen Patienten droht Transplantatverlust. BK-Virusnephropathie

ist mit interstitieller Fibrose und Abstoßung assoziiert.¹⁴⁸ Die Diagnose wird anhand von Biopsie-, Blut- oder Urinproben gestellt.¹⁴⁹ Eine Übersicht zu den vielfältigen Ursachen von Transplantatdysfunktion bietet Abbildung 16.

Differentialdiagnosen bei Transplantatdysfunktion

Alloimmune Schäden

- Späte akute Rejektion
- Chronische zelluläre Rejektion
- Chronische ABMR mit Glomerulopathie

Strukturell oder infektiös

- Ureterobstruktion
- Untere Harnwegsinfektion
- Renale arterielle Stenose
- Rekurrente Pyelonephritis oder Reflux
- BK-Virusnephropathie

Andere Pathophysiologien

- Unspezifische tubulointerstitielle Schäden
- Chronische Calcineurin-Inhibitor Nephrotoxizität
- Thrombotische Mikroangiopathie
- Glomerulonephritis
- Schlecht eingestellter Hypertonus
- Metabolische Störungen
- Komedikationen
- Akutes Nierenversagen assoziiert mit schwerer Erkrankung

Abbildung 16: Differentialdiagnosen bei Transplantatdysfunktion

Nach Nankivell et al.³⁰.

5.4 Technische Herausforderungen

Die Durchflusszytometrie ist eine gut etablierte Methode in der Hämatologie. Die Technik der Urin-Durchflusszytometrie hat noch keine klinischen Anwendungsfelder. Sie ist laborübergreifend wenig standardisiert und daher in ihrer Vergleichbarkeit möglicherweise limitiert.

5.4.1 Hintergrundsignale

Störende Hintergrundsignale sind eine Herausforderung bei der Abgrenzung von Zellpopulationen. Stachowski et al. analysierten (prä)analytische Fehlerquellen bei der

durchflusszytometrischen Messung von Urinlymphozyten. In ihren Versuchen senkten hohe Urinosmolalität und hohe Konzentration von Urea und Glukose die Lebensfähigkeit von Zellen. Die Gruppe schlug ein Protokoll zur Aufarbeitung von Urin-Lymphozyten vor, dem in dieser Studie weitgehend gefolgt werden konnte.⁸⁸ So wurden die Zellen mit Ficoll-Paque getrennt und die empfohlene Live-Gating-Strategie beachtet. Zeitliche Aspekte, wie die Dilution des Urins mit fetalem Kälberserum innerhalb von 2 Stunden und die konsequente durchflusszytometrische Analyse innerhalb von 3 Stunden, wurden nicht umgesetzt. Sie waren schlecht mit dem klinischen Setting der Patientenversorgung und Probenrequisition vereinbar. Andere Ursachen für Hintergrundsignale sind Autofluoreszenz oder spektrale Überlappungsbereiche der Fluoreszenzfarbstoffe.⁹⁶ Zur optimalen Geräteeinstellung wurden im Vorfeld Urinanalysen und Isotypkontrollen durchgeführt. Außerdem wurde jede Biomarker-positive Probe mit der Biomarker-negativen Probe des gleichen Patienten verglichen. Dieses manuelle Vorgehen ist nicht untersucherunabhängig, aber sehr hilfreich bei der Auswahl der richtigen Zellpopulationen.

5.4.2 Positive Zellpopulationen

Die ausgewählten Biomarker erfassten die Gesamtheit der CD3+ CD8+ T-Zellen im Urin. Regulatorische CD8 T-Zellen mit kontroverser Funktion wurden bei der Messung womöglich eingeschlossen. Die durchflusszytometrische Bestimmung von TEC war eine neue Methode, die in dieser Form noch nicht evaluiert wurde. Sie basiert auf dem Nachweis intrazellulären Cytokeratins, das bereits mehrfach als Biomarker für gestresste TEC beschrieben wurde.^{24,25} Die Oberflächenmarker CD10 und EPCAM dienten der Differenzierung von proximalen und distalen TEC. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere Zellen im Urin die gleichen Marker exprimieren und in dieser Arbeit miterfasst wurden.

5.4.3 Multiples Testen

An dieser Stelle soll auf die statistische Herangehensweise und die Möglichkeit einer Alphafehler-Kumulierung hingewiesen werden. Immerhin wurden 3 verschiedene Zelltypen und ihre Kombinationen untersucht. In der Längsschnittkohorte wurden 2 Patientengruppen an mehreren Zeiträumen nach Transplantation untersucht. In der Querschnittskohorte wurde eine klinisch unauffällige Kontrollgruppe mit klinisch auffälligen Patienten verglichen. Letztgenannte wurden anhand ihrer Biopsieergebnisse

in 3 Gruppen unterteilt. Mit erhöhter Anzahl durchgeführter statistischer Tests steigt die Wahrscheinlichkeit eines zufällig signifikanten Ergebnisses.

5.5 Resümee

Seit vielen Jahren suchen Wissenschaftler nach nicht-invasiven Biomarkern für Nierentransplantat-Abstoßung. Geschädigte Tubuli und Entzündungszellen sind wichtige histopathologische Zeichen bei der Diagnostik. Gleichzeitig sind Nieren- und Entzündungszellen durchflusszytometrisch im Urin messbar. In dieser Studie wurden CD8 T-Zellen (DAPI- CD3+ CD8+), proximale TEC (Cytokeratin+ CD10+) und distale TEC (Cytokeratin+ EPCAM+) als Biomarker untersucht.

Bei Patienten mit Delayed Graft Function waren CD8 T-Zellen an Tag 6-10 nach Transplantation erhöht. Außerdem korrelierten die CD8 T-Zellen mit dem histopathologischen Score für interstitielle Entzündung und Tubulitis. Sie korrelierten negativ mit chronischer Glomerulopathie. Patienten mit TCMR hatten höhere CD8 T-Zellen als Patienten mit ABMR. Die Ausscheidung von TEC war bei No RX höher als bei allen anderen Gruppen. Eine niedrige Zahl an CD10+ TEC identifizierte Transplantatabstoßung (TCMR und ABMR) mit einer Sensitivität von 72% und einer Spezifität von 100%.

In Zukunft muss weiter erörtert werden, inwiefern die hier untersuchten Biomarker Nierentransplantat-Abstoßung sicher von anderen Pathologien abgrenzen. Offen bleibt auch, ob sie die Indikation zur Nierenbiopsie reduzieren und ob sie beim Therapiemanagement helfen. Die Identifizierung neuer Biomarker ist ein mehrphasischer Prozess, der mit explorativen Untersuchungen beginnt. Die durchflusszytometrische Bestimmung von CD8 T-Zellen sowie proximalen und distalen TEC zeigen klinisches Potenzial zur Erkennung von Delayed Graft Function und Abstoßung. Die Sensitivität und Spezifität könnten durch Kombination mit anderen Biomarkern verbessert werden. Zur Verifizierung der Ergebnisse sind größere Studien erforderlich.

Literaturverzeichnis

1. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant* 2004;4:378-83.
2. Pirsch JD, Ploeg RJ, Gange S, D'Alessandro AM, Knechtle SJ, Sollinger HW, Kalayoglu M, Belzer FO. Determinants of graft survival after renal transplantation. *Transplantation* 1996;61:1581-6.
3. Almond PS, Matas A, Gillingham K, Dunn DL, Payne WD, Gores P, Gruessner R, Najarian JS. Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients. *Transplantation* 1993;55:752-6; discussion 6-7.
4. Hart A, Smith JM, Skeans MA, Gustafson SK, Wilk AR, Castro S, Foutz J, Wainright JL, Snyder JJ, Kasiske BL, Israni AK. OPTN/SRTR 2018 Annual Data Report: Kidney. *Am J Transplant* 2020;20 Suppl s1:20-130.
5. Naesens M, Kuypers DR, De Vusser K, Evenepoel P, Claes K, Bammens B, Meijers B, Sprangers B, Pirenne J, Monbaliu D, Jochmans I, Lerut E. The histology of kidney transplant failure: a long-term follow-up study. *Transplantation* 2014;98:427-35.
6. Tsai SF, Chen CH, Shu KH, Cheng CH, Yu TM, Chuang YW, Huang ST, Tsai JL, Wu MJ. Current Safety of Renal Allograft Biopsy With Indication in Adult Recipients: An Observational Study. *Medicine (Baltimore)* 2016;95:e2816.
7. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB, Croker BP, Droz D, Dunnill MS, Halloran PF. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* 1993;44:411-22.
8. Roufosse C, Simmonds N, Clahsen-van Groningen M, Haas M, Henriksen KJ, Horsfield C, Loupy A, Mengel M, Perkowska-Ptasińska A, Rabant M, Racusen LC, Solez K, Becker JU. A 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology. *Transplantation* 2018;102:1795-814.
9. Nankivell BJ, Chapman JR. The significance of subclinical rejection and the value of protocol biopsies. *Am J Transplant* 2006;6:2006-12.
10. Furness PN, Taub N, Project CoERTPAPC. International variation in the interpretation of renal transplant biopsies: report of the CERTPAP Project. *Kidney Int* 2001;60:1998-2012.
11. Goerlich N, Brand HA, Langhans V, Tesch S, Schachtner T, Koch B, Paliege A, Schneider W, Grützkau A, Reinke P, Enghard P. Kidney transplant monitoring by urinary flow cytometry: Biomarker combination of T cells, renal tubular epithelial cells, and podocalyxin-positive cells detects rejection. *Sci Rep* 2020;10:796.
12. Macedo C, Orkis EA, Popescu I, Elinoff BD, Zeevi A, Shapiro R, Lakkis FG, Metes D. Contribution of naïve and memory T-cell populations to the human alloimmune response. *Am J Transplant* 2009;9:2057-66.
13. Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. *N Engl J Med* 2010;363:1451-62.
14. Baddoura FK, Nasr IW, Wrobel B, Li Q, Ruddle NH, Lakkis FG. Lymphoid neogenesis in murine cardiac allografts undergoing chronic rejection. *Am J Transplant* 2005;5:510-6.
15. Farrar CA, Kupiec-Weglinski JW, Sacks SH. The innate immune system and transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3:a015479.
16. Hagerty DT, Allen PM. Processing and presentation of self and foreign antigens by the renal proximal tubule. *J Immunol* 1992;148:2324-30.

17. Kreisel D, Krupnick AS, Balsara KR, Riha M, Gelman AE, Popma SH, Szeto WY, Turka LA, Rosengard BR. Mouse vascular endothelium activates CD8+ T lymphocytes in a B7-dependent fashion. *J Immunol* 2002;169:6154-61.
18. Murphy K, Weaver C. *Janeway Immunologie*. 9. Auflage. Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag; 2018.
19. Zhang R. Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplant Recipients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2018;13:182-92.
20. Kumbala D, Zhang R. Essential concept of transplant immunology for clinical practice. *World J Transplant* 2013;3:113-8.
21. Hara S. Current pathological perspectives on chronic rejection in renal allografts. *Clin Exp Nephrol* 2017;21:943-51.
22. Hara S. Banff 2013 update: Pearls and pitfalls in transplant renal pathology. *Nephrology (Carlton)* 2015;20 Suppl 2:2-8.
23. Haas M, Loupy A, Lefaucheur C, Roufosse C, Glotz D, Seron D, Nankivell BJ, Halloran PF, Colvin RB, Akalin E, Alachkar N, Bagnasco S, Bouatou Y, Becker JU, Cornell LD, van Huyen JPD, Gibson IW, Kraus ES, Mannon RB, Naesens M, Nickeleit V, Nickerson P, Segev DL, Singh HK, Stegall M, Randhawa P, Racusen L, Solez K, Mengel M. The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. *Am J Transplant* 2018;18:293-307.
24. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, Halloran PF, Baldwin W, Banfi G, Collins AB, Cosio F, David DS, Drachenberg C, Einecke G, Fogo AB, Gibson IW, Glotz D, Iskandar SS, Kraus E, Lerut E, Mannon RB, Mihatsch M, Nankivell BJ, Nickeleit V, Papadimitriou JC, Randhawa P, Regele H, Renaudin K, Roberts I, Seron D, Smith RN, Valente M. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 2008;8:753-60.
25. Kozakowski N, Herkner H, Böhmig GA, Regele H, Kornauth C, Bond G, Kikić Ž. The diffuse extent of peritubular capillaritis in renal allograft rejection is an independent risk factor for graft loss. *Kidney Int* 2015;88:332-40.
26. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2009;9 Suppl 3:S1-155.
27. Josephson MA. Monitoring and managing graft health in the kidney transplant recipient. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6:1774-80.
28. Yilmaz S, Isik I, Afrouzian M, Monroy M, Sar A, Benediktsson H, McLaughlin K. Evaluating the accuracy of functional biomarkers for detecting histological changes in chronic allograft nephropathy. *Transpl Int* 2007;20:608-15.
29. Amer H, Fidler ME, Myslak M, Morales P, Kremers WK, Larson TS, Stegall MD, Cosio FG. Proteinuria after kidney transplantation, relationship to allograft histology and survival. *Am J Transplant* 2007;7:2748-56.
30. Nankivell BJ, Kuypers DR. Diagnosis and prevention of chronic kidney allograft loss. *Lancet* 2011;378:1428-37.
31. Menon MC, Murphy B, Heeger PS. Moving Biomarkers toward Clinical Implementation in Kidney Transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2017;28:735-47.
32. Safa K, Magee CN, Azzi J. A critical review of biomarkers in kidney transplantation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2017;26:509-15.
33. Li B, Hartono C, Ding R, Sharma VK, Ramaswamy R, Qian B, Serur D, Mouradian J, Schwartz JE, Suthanthiran M. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med* 2001;344:947-54.

34. Heng B, Li Y, Shi L, Du X, Lai C, Cheng L, Su Z. A Meta-analysis of the Significance of Granzyme B and Perforin in Noninvasive Diagnosis of Acute Rejection After Kidney Transplantation. *Transplantation* 2015;99:1477-86.
35. Muthukumar T, Ding R, Dadhania D, Medeiros M, Li B, Sharma VK, Hartono C, Serur D, Seshan SV, Volk HD, Reinke P, Kapur S, Suthanthiran M. Serine proteinase inhibitor-9, an endogenous blocker of granzyme B/perforin lytic pathway, is hyperexpressed during acute rejection of renal allografts. *Transplantation* 2003;75:1565-70.
36. Ding R, Li B, Muthukumar T, Dadhania D, Medeiros M, Hartono C, Serur D, Seshan SV, Sharma VK, Kapur S, Suthanthiran M. CD103 mRNA levels in urinary cells predict acute rejection of renal allografts. *Transplantation* 2003;75:1307-12.
37. Robertson H, Wong WK, Talbot D, Burt AD, Kirby JA. Tubulitis after renal transplantation: demonstration of an association between CD103+ T cells, transforming growth factor beta1 expression and rejection grade. *Transplantation* 2001;71:306-13.
38. Kotsch K, Mashreghi MF, Bold G, Tretow P, Beyer J, Matz M, Hoerstrup J, Pratschke J, Ding R, Suthanthiran M, Volk HD, Reinke P. Enhanced granulysin mRNA expression in urinary sediment in early and delayed acute renal allograft rejection. *Transplantation* 2004;77:1866-75.
39. Seiler M, Brabcova I, Viklicky O, Hribova P, Rosenberger C, Pratschke J, Lodererova A, Matz M, Schönemann C, Reinke P, Volk HD, Kotsch K. Heightened expression of the cytotoxicity receptor NKG2D correlates with acute and chronic nephropathy after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2007;7:423-33.
40. Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, Snopkowski C, Naqvi R, Lee JB, Hartono C, Li B, Sharma VK, Seshan SV, Kapur S, Hancock WW, Schwartz JE, Suthanthiran M. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med* 2005;353:2342-51.
41. Abd Elaziz MM, Bakry S, M Abd ElAal AE, Rashed L, Hesham D. Validation of Urinary PD-1 and FOXP3 mRNA in a Cohort of Egyptian Renal Allograft Recipients. *Ann Transplant* 2016;21:17-24.
42. Sandner SE, Clarkson MR, Salama AD, Sanchez-Fueyo A, Domenig C, Habicht A, Najafian N, Yagita H, Azuma M, Turka LA, Sayegh MH. Role of the programmed death-1 pathway in regulation of alloimmune responses in vivo. *J Immunol* 2005;174:3408-15.
43. Afaneh C, Muthukumar T, Lubetzky M, Ding R, Snopkowski C, Sharma VK, Seshan S, Dadhania D, Schwartz JE, 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* 2010;90:1381-7.
44. Qin S, Rottman JB, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M, Koch AE, Moser B, Mackay CR. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 1998;101:746-54.
45. Tatapudi RR, Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, Li B, Sharma VK, Lozada-Pastorio E, Seetharamu N, Hartono C, Serur D, Seshan SV, Kapur S, Hancock WW, Suthanthiran M. Noninvasive detection of renal allograft inflammation by measurements of mRNA for IP-10 and CXCR3 in urine. *Kidney Int* 2004;65:2390-7.
46. Kanmaz T, Feng P, Torrealba J, Kwun J, Fechner JH, Schultz JM, Dong Y, Kim HT, Dar W, Hamawy MM, Knechtle SJ, Hu H. Surveillance of acute rejection in baboon renal transplantation by elevation of interferon-gamma inducible protein-

- 10 and monokine induced by interferon-gamma in urine. *Transplantation* 2004;78:1002-7.
47. Matz M, Beyer J, Wunsch D, Mashreghi MF, Seiler M, Pratschke J, Babel N, Volk HD, Reinke P, Kotsch K. Early post-transplant urinary IP-10 expression after kidney transplantation is predictive of short- and long-term graft function. *Kidney Int* 2006;69:1683-90.
 48. Schaub S, Nickerson P, Rush D, Mayr M, Hess C, Golian M, Stefura W, Hayglass K. Urinary CXCL9 and CXCL10 levels correlate with the extent of subclinical tubulitis. *Am J Transplant* 2009;9:1347-53.
 49. Ho J, Rush DN, Karpinski M, Storsley L, Gibson IW, Bestland J, Gao A, Stefura W, HayGlass KT, Nickerson PW. Validation of urinary CXCL10 as a marker of borderline, subclinical, and clinical tubulitis. *Transplantation* 2011;92:878-82.
 50. Jackson JA, Kim EJ, Begley B, Cheeseman J, Harden T, Perez SD, Thomas S, Warshaw B, Kirk AD. Urinary chemokines CXCL9 and CXCL10 are noninvasive markers of renal allograft rejection and BK viral infection. *Am J Transplant* 2011;11:2228-34.
 51. Hirt-Minkowski P, Amico P, Ho J, Gao A, Bestland J, Hopfer H, Steiger J, Dickenmann M, Burkhalter F, Rush D, Nickerson P, Schaub S. Detection of clinical and subclinical tubulo-interstitial inflammation by the urinary CXCL10 chemokine in a real-life setting. *Am J Transplant* 2012;12:1811-23.
 52. Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson IV, Harden PN. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:260-4.
 53. Peng W, Chen J, Jiang Y, Shou Z, Chen Y, Wang H. Non-invasive detection of acute renal allograft rejection by measurement of vascular endothelial growth factor in urine. *J Int Med Res* 2007;35:442-9.
 54. Kuźniar J, Marchewka Z, Krasnowski R, Boratyńska M, Długosz A, Klinger M. Enzymuria and low molecular weight protein excretion as the differentiating marker of complications in the early post kidney transplantation period. *Int Urol Nephrol* 2006;38:753-8.
 55. Sundberg AG, Appelkvist EL, Bäckman L, Dallner G. Urinary pi-class glutathione transferase as an indicator of tubular damage in the human kidney. *Nephron* 1994;67:308-16.
 56. Shahbaz SK, Pourrezaghali F, Barabadi M, Foroughi F, Hosseinzadeh M, Ahmadpoor P, Nafar M, Yekaninejad MS, Amirzargar A. High expression of TIM-3 and KIM-1 in blood and urine of renal allograft rejection patients. *Transpl Immunol* 2017;43-44:11-20.
 57. Sureshkumar KK, Marcus RJ. Urinary biomarkers as predictors of long-term allograft function after renal transplantation. *Transplantation* 2010;90:688-9.
 58. Ting YT, Coates PT, Walker RJ, McLellan AD. Urinary tubular biomarkers as potential early predictors of renal allograft rejection. *Nephrology (Carlton)* 2012;17:11-6.
 59. Suthanthiran M, Schwartz JE, Ding R, Abecassis M, Dadhania D, Samstein B, Knechtle SJ, Friedewald J, Becker YT, Sharma VK, Williams NM, Chang CS, Hoang C, Muthukumar T, August P, Keslar KS, Fairchild RL, Hricik DE, Heeger PS, Han L, Liu J, Riggs M, Ikle DN, Bridges ND, Shaked A, Investigators CTiOTC-S. Urinary-cell mRNA profile and acute cellular rejection in kidney allografts. *N Engl J Med* 2013;369:20-31.
 60. Maignon M, Ding R, Dadhania DM, Mueller FB, Hartono C, Snopkowski C, Li C, Lee JR, Sjöberg D, Seshan SV, Sharma VK, Yang H, Nour B, Vickers AJ, Suthanthiran M, Muthukumar T. Urinary cell mRNA profiles and differential diagnosis of acute kidney graft dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2014;25:1586-97.

61. Hricik DE, Nickerson P, Formica RN, Poggio ED, Rush D, Newell KA, Goebel J, Gibson IW, Fairchild RL, Riggs M, Spain K, Ikle D, Bridges ND, Heeger PS, consortium C-. Multicenter validation of urinary CXCL9 as a risk-stratifying biomarker for kidney transplant injury. *Am J Transplant* 2013;13:2634-44.
62. Pisitkun T, Gandolfo MT, Das S, Knepper MA, Bagnasco SM. Application of systems biology principles to protein biomarker discovery: urinary exosomal proteome in renal transplantation. *Proteomics Clin Appl* 2012;6:268-78.
63. Chakraborty A, Sarwal M. Protein biomarkers in renal transplantation. *Expert Rev Proteomics* 2018;15:41-54.
64. Sigdel TK, Gao Y, He J, Wang A, Nicora CD, Fillmore TL, Shi T, Webb-Robertson BJ, Smith RD, Qian WJ, Salvatierra O, Camp DG, Sarwal MM. Mining the human urine proteome for monitoring renal transplant injury. *Kidney Int* 2016;89:1244-52.
65. Rabant M, Amrouche L, Lebreton X, Aulagnon F, Benon A, Sauvaget V, Bonifay R, Morin L, Scemla A, Delville M, Martinez F, Timsit MO, Duong Van Huyen JP, 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* 2015;26:2840-51.
66. Lorenzen JM, 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* 2011;11:2221-7.
67. Hirt-Minkowski P, Rush DN, Gao A, Hopfer H, Wiebe C, Nickerson PW, Schaub S, Ho J. Six-Month Urinary CCL2 and CXCL10 Levels Predict Long-term Renal Allograft Outcome. *Transplantation* 2016;100:1988-96.
68. Heyne N, Kemmner S, Schneider C, Nadalin S, Königsrainer A, Häring HU. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin accurately detects acute allograft rejection among other causes of acute kidney injury in renal allograft recipients. *Transplantation* 2012;93:1252-7.
69. Segasothy M, Birch DF, Fairley KF, Kincaid-Smith P. Urine cytologic profile in renal allograft recipients determined by monoclonal antibodies. *Diagnosis of allograft rejection. Transplantation* 1989;47:482-7.
70. Yu DS, Sun GH, Lee SS, Wu CJ, Ma CP, Chang SY. Flow-cytometric measurement of cellular changes in urine: a simple and rapid method for perioperatively monitoring patients after kidney transplantation. *Urol Int* 1999;62:143-6.
71. Betjes MG, Meijers RW, de Wit EA, Weimar W, Litjens NH. Terminally differentiated CD8+ Temra cells are associated with the risk for acute kidney allograft rejection. *Transplantation* 2012;94:63-9.
72. Augustine JJ, Hricik DE. T-cell immune monitoring by the ELISPOT assay for interferon gamma. *Clin Chim Acta* 2012;413:1359-63.
73. Wang Z, Liu X, Lu P, Han Z, Tao J, Wang J, Liu K, Wu B, Yin C, Tan R, Gu M. Performance of the ImmuKnow assay in differentiating infection and acute rejection after kidney transplantation: a meta-analysis. *Transplant Proc* 2014;46:3343-51.
74. Vasconcellos LM, Schachter AD, Zheng XX, Vasconcellos LH, Shapiro M, Harmon WE, Strom TB, Schachter D. Cytotoxic lymphocyte gene expression in peripheral blood leukocytes correlates with rejecting renal allografts. *Transplantation* 1998;66:562-6.
75. San Segundo D, Millán O, Muñoz-Cacho P, Boix F, Paz-Artal E, Talayero P, Morales JM, Muro M, De Cos M, Guirado L, Llorente S, Pascual J, Arias M, Brunet M, López-Hoyos M. High proportion of pretransplantation activated regulatory T cells (CD4+CD25highCD62L+CD45RO+) predicts acute rejection in

- kidney transplantation: results of a multicenter study. *Transplantation* 2014;98:1213-8.
76. Shabir S, Girdlestone J, Briggs D, Kaul B, Smith H, Daga S, Chand S, Jham S, Navarrete C, Harper L, Ball S, Borrows R. Transitional B lymphocytes are associated with protection from kidney allograft rejection: a prospective study. *Am J Transplant* 2015;15:1384-91.
 77. 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 EF, Reed E, Sarwal MM. The kSORT assay to detect renal transplant patients at high risk for acute rejection: results of the multicenter AART study. *PLoS Med* 2014;11:e1001759.
 78. Kurian SM, Williams AN, Gelbart T, Campbell D, Mondala TS, Head SR, Horvath S, Gaber L, Thompson R, Whisenant T, Lin W, Langfelder P, Robison EH, Schaffer RL, Fisher JS, Friedewald J, Flechner SM, Chan LK, Wiseman AC, Shidban H, Mendez R, Heilman R, Abecassis MM, Marsh CL, Salomon DR. Molecular classifiers for acute kidney transplant rejection in peripheral blood by whole genome gene expression profiling. *Am J Transplant* 2014;14:1164-72.
 79. Matz M, Fabritius K, Lorkowski C, Dürr M, Gaedeke J, Durek P, Grün JR, Goestemeyer A, Bachmann F, Wu K, Rudolph B, Schmidt D, Weber U, Haftmann C, Unterwalder N, Lachmann N, Radbruch A, Neumayer HH, Mashreghi MF, Budde K. Identification of T Cell-Mediated Vascular Rejection After Kidney Transplantation by the Combined Measurement of 5 Specific MicroRNAs in Blood. *Transplantation* 2016;100:898-907.
 80. Bloom RD, Bromberg JS, Poggio ED, Bunnapradist S, Langone AJ, Sood P, Matas AJ, Mehta S, Mannon RB, Sharfuddin A, Fischbach B, Narayanan M, Jordan SC, Cohen D, Weir MR, Hiller D, Prasad P, Woodward RN, Grskovic M, Sninsky JJ, Yee JP, Brennan DC, Investigators CD-DC-FDiBfDARiKTRDS. Cell-Free DNA and Active Rejection in Kidney Allografts. *J Am Soc Nephrol* 2017;28:2221-32.
 81. Zhang Q, Liu YF, Su ZX, Shi LP, Chen YH. Serum fractalkine and interferon-gamma inducible protein-10 concentrations are early detection markers for acute renal allograft rejection. *Transplant Proc* 2014;46:1420-5.
 82. Lee JR, Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, Sharma VK, Schwartz JE, Suthanthiran M. Urinary cell mRNA profiles predictive of human kidney allograft status. *Immunol Rev* 2014;258:218-40.
 83. Dolff S, Abdulahad WH, van Dijk MC, Limburg PC, Kallenberg CG, Bijl M. Urinary T cells in active lupus nephritis show an effector memory phenotype. *Ann Rheum Dis* 2010;69:2034-41.
 84. Dolff S, Abdulahad WH, Arends S, van Dijk MC, Limburg PC, Kallenberg CG, Bijl M. Urinary CD8+ T-cell counts discriminate between active and inactive lupus nephritis. *Arthritis Res Ther* 2013;15:R36.
 85. Enghard P, Humrich JY, Rudolph B, Rosenberger S, Biesen R, Kuhn A, Manz R, Hiepe F, Radbruch A, Burmester GR, 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* 2009;60:199-206.
 86. Abdulahad WH, Kallenberg CG, Limburg PC, Stegeman CA. Urinary CD4+ effector memory T cells reflect renal disease activity in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum* 2009;60:2830-8.
 87. Muczynski KA, Leca N, Anderson AE, Kieran N, Anderson SK. Multicolor Flow Cytometry and Cytokine Analysis Provides Enhanced Information on Kidney Transplant Biopsies. *Kidney Int Rep* 2018;3:956-69.

88. Stachowski J, Barth C, Lewandowska-Stachowiak M, Lammerding P, Runowski D, Baldamus CA. Flow cytometric analysis of urine lymphocytes isolated from patients with renal transplants--purification of urine lymphocytes. *J Immunol Methods* 1998;213:145-55.
89. Simpson MA, Madras PN, Cornaby AJ, Etienne T, Dempsey RA, Clowes GH, Monaco AP. Sequential determinations of urinary cytology and plasma and urinary lymphokines in the management of renal allograft recipients. *Transplantation* 1989;47:218-23.
90. Lao M, Wyzgał J, Nowaczyk M, Górski A. Value of urine sediment phenotyping in renal allograft recipients. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1993;41:373-5.
91. Marcussen N, Schumann JL, Schumann GB, Parmar M, Kjellstrand C. Analysis of cytodiagnostic urinalysis findings in 77 patients with concurrent renal biopsies. *Am J Kidney Dis* 1992;20:618-28.
92. Gómez Jorge JT, Estrada C, González ZA, Morales-Otero LA, Lavergne J, Santiago-Delpin EA. Flow cytometric analysis of urine sediment after kidney transplantation. *Transplant Proc* 1991;23:1764-5.
93. Lee PH, Huang MT, Lee CS. Analysis of urine cytology by flow cytometry in renal transplantation. *Transplant Proc* 1992;24:1543-4.
94. Roberti I, Reisman L, Burrows L, Lieberman KV. Urine cytology and urine flow cytometry in renal transplantation--a prospective double blind study. *Transplantation* 1995;59:495-500.
95. Abuelo JG. Normotensive ischemic acute renal failure. *N Engl J Med* 2007;357:797-805.
96. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. *Der Experimentator: Immunologie*. 4. Auflage. Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag; 2014.
97. Siedlecki A, Irish W, Brennan DC. Delayed graft function in the kidney transplant. *Am J Transplant* 2011;11:2279-96.
98. Akkina SK, Connaire JJ, Israni AK, Snyder JJ, Matas AJ, Kasiske BL. Similar outcomes with different rates of delayed graft function may reflect center practice, not center performance. *Am J Transplant* 2009;9:1460-6.
99. Tapiawala SN, Tinckam KJ, Cardella CJ, Schiff J, Cattran DC, Cole EH, Kim SJ. Delayed graft function and the risk for death with a functioning graft. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:153-61.
100. Chang SH, Russ GR, Chadban SJ, Campbell SB, McDonald SP. Trends in kidney transplantation in Australia and New Zealand, 1993-2004. *Transplantation* 2007;84:611-8.
101. Hara S. Cell mediated rejection revisited: Past, current, and future directions. *Nephrology (Carlton)* 2018;23 Suppl 2:45-51.
102. Nankivell BJ, P'Ng CH, Shingde M, Viswanathan S, Achan A, Renthawa J, Sharma RN, Chapman JR. The Pathophysiology and Impact of Inflammation in Nonscarred Renal Interstitium: The Banff i Lesion. *Transplantation* 2019.
103. Robertson H, Kirby JA. Post-transplant renal tubulitis: the recruitment, differentiation and persistence of intra-epithelial T cells. *Am J Transplant* 2003;3:3-10.
104. Bonsib SM, Abul-Ezz SR, Ahmad I, Young SM, Ellis EN, Schneider DL, Walker PD. Acute rejection-associated tubular basement membrane defects and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 2000;58:2206-14.
105. Helbert MJ, Dauwe SE, Van der Biest I, Nouwen EJ, De Broe ME. Immunodissemination of the human proximal nephron: flow sorting of S1S2S3, S1S2 and S3 proximal tubular cells. *Kidney Int* 1997;52:414-28.

106. Baer PC, Tunn UW, Nunez G, Scherberich JE, Geiger H. Transdifferentiation of distal but not proximal tubular epithelial cells from human kidney in culture. *Exp Nephrol* 1999;7:306-13.
107. Van der Hauwaert C, Savary G, Gnemmi V, Glowacki F, Pottier N, Bouillez A, Maboudou P, Zini L, Leroy X, Cauffiez C, Perrais M, Aubert S. Isolation and characterization of a primary proximal tubular epithelial cell model from human kidney by CD10/CD13 double labeling. *PLoS One* 2013;8:e66750.
108. Djudjaj S, Papatotiriou M, Bülow RD, Wagnerova A, Lindenmeyer MT, Cohen CD, Strnad P, Goumenos DS, Floege J, Boor P. Keratins are novel markers of renal epithelial cell injury. *Kidney Int* 2016;89:792-808.
109. Lebeau C, Debelle FD, Arlt VM, Pozdzik A, De Prez EG, Phillips DH, Deschodt-Lanckman MM, Vanherweghem JL, Nortier JL. Early proximal tubule injury in experimental aristolochic acid nephropathy: functional and histological studies. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:2321-32.
110. Seligson DB, Pantuck AJ, Liu X, Huang Y, Horvath S, Bui MH, Han KR, Correa AJ, Eeva M, Tze S, Belldegrun AS, Figlin RA. Epithelial cell adhesion molecule (KSA) expression: pathobiology and its role as an independent predictor of survival in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:2659-69.
111. Buzhor E, Harari-Steinberg O, Omer D, Metsuyanin S, Jacob-Hirsch J, Noiman T, Dotan Z, Goldstein RS, Dekel B. Kidney spheroids recapitulate tubular organoids leading to enhanced tubulogenic potency of human kidney-derived cells. *Tissue Eng Part A* 2011;17:2305-19.
112. Veighey K, MacAllister R. Ischemic Conditioning in Kidney Transplantation. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2017;22:330-6.
113. Salvadori M, Rosso G, Bertoni E. Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. *World J Transplant* 2015;5:52-67.
114. Eikmans M, Gielis EM, Ledeganck KJ, Yang J, Abramowicz D, Claas FFJ. Non-invasive Biomarkers of Acute Rejection in Kidney Transplantation: Novel Targets and Strategies. *Front Med (Lausanne)* 2018;5:358.
115. Yamamoto T, Noiri E, Ono Y, Doi K, Negishi K, Kamijo A, Kimura K, Fujita T, Kinukawa T, Taniguchi H, Nakamura K, Goto M, Shinozaki N, Ohshima S, Sugaya T. Renal L-type fatty acid-binding protein in acute ischemic injury. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2894-902.
116. Rush D, Arlen D, Boucher A, Busque S, Cockfield SM, Girardin C, Knoll G, Lachance JG, Landsberg D, Shapiro J, Shoker A, Yilmaz S. Lack of benefit of early protocol biopsies in renal transplant patients receiving TAC and MMF: a randomized study. *Am J Transplant* 2007;7:2538-45.
117. Krishna GG, Fellner SK. Lymphocyturia: an important diagnostic and prognostic marker in renal allograft rejection. *Am J Nephrol* 1982;2:185-8.
118. 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* 1992;5 Suppl 1:S8-12.
119. Galante NZ, Câmara NO, Kallas EG, Salomão R, Pacheco-Silva A, Medina-Pestana JO. Noninvasive immune monitoring assessed by flow cytometry and real time RT-PCR in urine of renal transplantation recipients. *Transpl Immunol* 2006;16:73-80.
120. Loupy A, Haas M, Solez K, Racusen L, Glotz D, Seron D, Nankivell BJ, Colvin RB, Afrouzian M, Akalin E, Alachkar N, Bagnasco S, Becker JU, Cornell L, Drachenberg C, Dragun D, de Kort H, Gibson IW, Kraus ES, Lefaucheur C, Legendre C, Liapis H, Muthukumar T, Nickeleit V, Orandi B, Park W, Rabant M, Randhawa P, Reed EF, Roufosse C, Seshan SV, Sis B, Singh HK, Schinstock C,

- Tambur A, Zeevi A, Mengel M. The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology. *Am J Transplant* 2017;17:28-41.
121. Mengel M, Gwinner W, Schwarz A, Bajeski R, Franz I, Bröcker V, Becker T, Neipp M, Klempnauer J, Haller H, Kreipe H. Infiltrates in protocol biopsies from renal allografts. *Am J Transplant* 2007;7:356-65.
 122. Laine J, Etelämäki P, Holmberg C, Dunkel L. Apoptotic cell death in human chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 1997;63:101-5.
 123. Wever PC, Aten J, Rentenaar RJ, Hack CE, Koopman G, Weening JJ, ten Berge IJ. Apoptotic tubular cell death during acute renal allograft rejection. *Clin Nephrol* 1998;49:28-34.
 124. Nguan CY, Du C. Renal tubular epithelial cells as immunoregulatory cells in renal allograft rejection. *Transplant Rev (Orlando)* 2009;23:129-38.
 125. Wuthrich RP, Glimcher LH, Yui MA, Jevnikar AM, Dumas SE, Kelley VE. MHC class II, antigen presentation and tumor necrosis factor in renal tubular epithelial cells. *Kidney Int* 1990;37:783-92.
 126. Demmers MW, Baan CC, van Beelen E, Ijzermans JN, Weimar W, Rowshani AT. Differential effects of activated human renal epithelial cells on T-cell migration. *PLoS One* 2013;8:e64916.
 127. Fuller L, Fernandez J, Zheng S, Carreno M, Esquenazi V, Yang WC, Miller J. Immunochemical and biochemical characterization of purified canine interferon-gamma. Production of a monoclonal antibody, affinity purification, and its effect on mixed lymphocyte culture and mixed lymphocyte kidney culture reactions. *Transplantation* 1992;53:195-202.
 128. Biancone L, Segoloni G, Turello E, Donati D, Bussolati B, Piccoli G, Camussi G. Expression of inducible lymphocyte costimulatory molecules in human renal allograft. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:716-22.
 129. Mannon RB, Griffiths R, Ruiz P, Platt JL, Coffman TM. Absence of donor MHC antigen expression ameliorates chronic kidney allograft rejection. *Kidney Int* 2002;62:290-300.
 130. IQTIG (Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen). Qualitätsreport 2017. Berlin: 2018. ISBN: 978-3-9818131-2-8. https://iqtig.org/downloads/berichte/2017/IQTIG_Qualitaetsreport-2017_2018_09_21.pdf (letzter Zugriff: 04.04.2020, 12:00 Uhr).
 131. Boom H, Mallat MJ, de Fijter JW, Zwinderman AH, Paul LC. Delayed graft function influences renal function, but not survival. *Kidney Int* 2000;58:859-66.
 132. Ascon M, Ascon DB, Liu M, Cheadle C, Sarkar C, Racusen L, Hassoun HT, Rabb H. Renal ischemia-reperfusion leads to long term infiltration of activated and effector-memory T lymphocytes. *Kidney Int* 2009;75:526-35.
 133. Friedewald JJ, Rabb H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 2004;66:486-91.
 134. Aasarød K, Bostad L, Hammerstrøm J, Jørstad S, Iversen BM. Wegener's granulomatosis: inflammatory cells and markers of repair and fibrosis in renal biopsies--a clinicopathological study. *Scand J Urol Nephrol* 2001;35:401-10.
 135. Foster MH. T cells and B cells in lupus nephritis. *Semin Nephrol* 2007;27:47-58.
 136. Hammer MH, Brestrich G, Andree H, Engelmann E, Rosenberger C, Tillmann H, Zwinger S, Babel N, Nickel P, Volk HD, Reinke P. HLA type-independent method to monitor polyoma BK virus-specific CD4 and CD8 T-cell immunity. *Am J Transplant* 2006;6:625-31.
 137. van Doesum WB, Abdulahad WH, van Dijk MC, Dolff S, van Son WJ, Stegeman CA, Sanders JS. Characterization of urinary CD4⁺ and CD8⁺ T cells in kidney

- transplantation patients with polyomavirus BK infection and allograft rejection. *Transpl Infect Dis* 2014;16:733-43.
138. Zahoor H, Pavicic PG, Przybycin C, Ko J, Stephens L, Radivoyevitch T, Jia X, Diaz-Montero CM, Finke J, Rayman PA, Gilligan TD, Grivas P, Ornstein M, Garcia JA, Rini BI. Evaluation of T cell infiltration in matched biopsy and nephrectomy samples in renal cell carcinoma. *Medicine (Baltimore)* 2018;97:e12344.
 139. Haberal M, Boyvat F, Akdur A, Kirnap M, Özçelik Ü, Yarbuğ Karakayalı F. Surgical Complications After Kidney Transplantation. *Exp Clin Transplant* 2016;14:587-95.
 140. Yarlagađda SG, Coca SG, Formica RN, Poggio ED, Parikh CR. Association between delayed graft function and allograft and patient survival: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:1039-47.
 141. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 2004;364:1814-27.
 142. Sommerer C, Schmidt J, Zeier M. Differentialdiagnose des akuten Nierenversagens nach Nierentransplantation. *Intensivmedizin + Notfallmedizin* 2005;42:241-9.
 143. Parikh CR, Jani A, Mishra J, Ma Q, Kelly C, Barasch J, Edelstein CL, Devarajan P. Urine NGAL and IL-18 are predictive biomarkers for delayed graft function following kidney transplantation. *Am J Transplant* 2006;6:1639-45.
 144. Schaub S, Mayr M, Hönger G, Bestland J, Steiger J, Regeniter A, Mihatsch MJ, Wilkins JA, Rush D, Nickerson P. Detection of subclinical tubular injury after renal transplantation: comparison of urine protein analysis with allograft histopathology. *Transplantation* 2007;84:104-12.
 145. O'Riordan E, Orlova TN, Mendeleev N, Patschan D, Kemp R, Chander PN, Hu R, Hao G, Gross SS, Iozzo RV, Delaney V, Goligorsky MS. Urinary proteomic analysis of chronic allograft nephropathy. *Proteomics Clin Appl* 2008;2:1025-35.
 146. Johnston O, Cassidy H, O'Connell S, O'Riordan A, Gallagher W, Maguire PB, Wynne K, Cagney G, Ryan MP, Conlon PJ, McMorrow T. Identification of β 2-microglobulin as a urinary biomarker for chronic allograft nephropathy using proteomic methods. *Proteomics Clin Appl* 2011;5:422-31.
 147. Schaub S, Wilkins JA, Antonovici M, Krokhin O, Weiler T, Rush D, Nickerson P. Proteomic-based identification of cleaved urinary beta2-microglobulin as a potential marker for acute tubular injury in renal allografts. *Am J Transplant* 2005;5:729-38.
 148. Masutani K. Current problems in screening, diagnosis and treatment of polyomavirus BK nephropathy. *Nephrology (Carlton)* 2014;19 Suppl 3:11-6.
 149. Hariharan S. BK virus nephritis after renal transplantation. *Kidney Int* 2006;69:655-62.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Hannah Antonia Brand, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Durchflusszytometrisch gemessene CD8 T-Zellen und Tubulusepithelzellen als Urin-Biomarker für Nierentransplantat-Abstoßung / Flow cytometrically measured CD8 T cells and tubular epithelial cells as urine biomarkers for kidney graft rejection** 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 etwaigen erfolgten Publikationen

Hannah Antonia Brand hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

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, 21. Januar 2020;10(1):796.

*geteilte Erstautorenschaft

Beitrag im Einzelnen

Die statistische Auswertung von CD8 T-Zellen und Tubulusepithelzellen erfolgte im Rahmen dieser Dissertation und ist Bestandteil der Abbildungen 3, 4, 5 und 6.

Beteiligung an:

- Konzeption und Design der Studie
- Akquisition von Patienten und Probenmaterial (für Abbildung 1-6)
- Erhebung von Patientendaten (Tabelle 1 und 2)
- Durchführung der experimentellen Arbeit (Urinverarbeitung und Zellmessung)
- Erstellen von Tabellen und Abbildungen (Abbildung 1-6, Tabelle 1-2, Ergänzungsmaterial)
- Literaturrecherche (für alle Abschnitte des Manuskripts)
- Verfassen des Manuskripts
- Erfinderischer Tätigkeit mit Patentanmeldung (EP3602045)

Hannah Antonia Brand präsentierte die Arbeit (10-minütiger Symposiumsvortrag und Poster) auf einem internationalen Kongress und erhielt den *Young Nephrologists Award* für das beste klinische Abstract (ISN World Congress of Nephrology, Mexico City, 21.-25.04.2017).

Alle oben genannten Punkte erfolgten eigenständig und unter Supervision von PD Dr. Philipp Enghard.

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

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

Vollständige Publikationsliste

Publikation in Fachzeitschrift:

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, 21. Januar 2020;10(1):796.

*geteilte Erstautorenschaft

Patentanmeldung:

Philipp Enghard, Nina Görlich, **Hannah Antonia Brand**, Valerie Langhans, Petra Reinke.

Antragssteller/Inhaber: Charité – Universitätsmedizin Berlin

Titel: Urine flow cytometry as biomarker of renal diseases.

Veröffentlichungsnummern der Patentanmeldung (Stand 18.04.2020):

- WO2018177949 (Weltorganisation für geistiges Eigentum 04.10.2018)
- EP3602045 (Europäisches Patentamt 05.02.2020)
- US2020018748 (United States Patent and Trademark Office 16.01.2020)
- CN110506206 (Chinesisches Patentamt 26.11.2019)

Kongressbeitrag:

Hannah Brand, Nina Dworschak, Philipp Enghard. Flow cytometric monitoring of urine among kidney transplant patients. ISN World Congress of Nephrology, Mexico City, 21.-25.04.2017.

Danksagung

Vielen herzlichen Dank an alle, die mich fachlich als auch zwischenmenschlich bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt haben!

Besonderen Dank gilt meinem Betreuer Philipp Enghard, der diese Promotion ermöglichte und mir in allen Phasen des Projektes zur Seite stand. Ich danke Nina Görlich für die tolle, langandauernde Zusammenarbeit. Danke auch an Valerie Langhans für die Einarbeitung im Labor und Heike Hirseland für die technische Unterstützung am Durchflusszytometer.

Ich bedanke mich für die Förderung durch die Leibniz Graduate School for Rheumatology und für den Einsatz von Andreas Grützkau und Katrin Moser.

Ich danke allen teilnehmenden Patienten und allen helfenden Mitarbeitern der Charité und des DRFZ.

Für den motivierenden Beistand danke ich meiner ganzen Familie, Freunden und Bekannten. Herzlichen Dank besonders an meine Eltern, die mich seit der Kindheit mit kreativen Ideen, schönen Gesprächen und liebevollen Texten erfreuen.