

DISSERTATION

Durchflusszytometrische Rejektions-Prädiktion bei  
Nierentransplantierten

Flow cytometric rejection prediction in kidney transplant  
recipients

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Emil Grothgar

Erstbetreuung: Prof. Dr. med. Philipp Enghard

Datum der Promotion: 30.06.2024

## Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden am 15. Juli 2022 veröffentlicht in Frontiers in Medicine: **Grothgar E\***, Goerlich N\*, Samans B\*, Skopnik CM, Metzke D, Klocke J, Prskalo L, Freund P, Wagner L, Duerr M, Matz M, Olek S, Budde K, Paliege A\*, Enghard P\*. Urinary CD8+HLA-DR+ T Cell Abundance Non-invasively Predicts Kidney Transplant Rejection. Front Med (Lausanne). 2022 Jul <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.928516>.<sup>1</sup>

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>6</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>7</b>
<b>Kurzfassung .....</b>	<b>8</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>9</b>
1.1 Nierentransplantation .....	9
1.1.1 Epidemiologie .....	9
1.1.2 Immunsuppression .....	10
1.1.3 Abstoßungsreaktion.....	10
1.1.3.1 Humorale Abstoßungsprozesse.....	11
1.1.3.2 Zelluläre Abstoßungsprozesse .....	12
1.1.4 Monitoring in der Nachsorge von Nierentransplantierten .....	14
1.1.5 Nierenbiopsie als diagnostischer Goldstandard .....	14
1.2 Forschungsstand potenzieller Biomarker für Abstoßungen.....	15
1.2.1 Anspruch an einen optimalen Biomarker.....	16
1.2.2 Biomarker im Urin .....	16
1.2.2.1 Zytokine .....	19
1.2.2.2 Transkriptome.....	20
1.2.2.3 Urin-Metabolite .....	21
1.2.2.4 Proteomik.....	21
1.2.2.5 Biomarker-Scores.....	22
1.2.3 Zwischenfazit zum Status-Quo der Urinbiomarker .....	23
1.3 Durchflusszytometrie in der Medizin.....	23
1.3.1 Urin-Durchflusszytometrie .....	23
1.4 Fragestellung.....	25

<b>2</b>	<b>Methodik .....</b>	<b>26</b>
2.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	26
2.2	Antikörper .....	27
2.3	Geräte und Software .....	28
2.4	Patient*innen .....	28
2.4.1	Ethikantrag .....	29
2.4.2	Ein- und Ausschlusskriterien .....	29
2.4.3	Querschnittkohorte .....	29
2.4.4	Längsschnittkohorte.....	30
2.4.5	Patient*innencharakteristika.....	31
2.5	Nierenbiopsie .....	31
2.6	Probengewinnung und -lagerung .....	32
2.7	Fluoreszenzmarkierung der Zellen .....	32
2.8	Antigene .....	33
2.8.1	T-Zell Antigene.....	33
2.8.2	TEC-Antigene .....	35
2.9	Messung und Auswertung .....	36
2.10	Statistische Auswertung.....	38
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
3.1	Biopsie-Ergebnisse .....	40
3.2	Nierentransplantierte präsentieren sich mit unterschiedlichen Verteilungsmustern der Zellpopulationen im Urin .....	40
3.3	T-Zell-Populationen unterscheiden sich signifikant in Nierentransplantierten mit Abstoßungsreaktion .....	42
3.4	CD8+ T-Zellen eignen sich zur Vorhersage einer <i>TCMR</i> .....	43
3.5	CD8+HLA-DR+ T-Zellen und CD8+ TEM stellen vielversprechenden Biomarker dar .....	45

3.6	CD8+HLA-DR+ Zellen im Urin fallen bei frisch Transplantierten im ersten Jahr unter Cut-Off für <i>TCMR</i> .....	46
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>50</b>
4.1	Zellsignaturen im Urin unterscheiden Abstoßungstypen .....	50
4.2	T-Zellen aus dem Urin als Produkt renaler Inflammation .....	51
4.3	CD8+HLA-DR+ T-Zellen als Treiber der Immunreaktion.....	52
4.4	TEC als potenzieller Marker für Gewebeuntergang.....	53
4.5	Verlaufskohorte .....	54
4.6	Limitationen .....	55
4.7	Zukunft des Transplant-Monitorings.....	56
4.8	Fazit.....	58
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>59</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>67</b>
	<b>Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen .....</b>	<b>68</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>69</b>
	<b>Publikationsliste .....</b>	<b>70</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>71</b>
	<b>Statistische Akkreditierung.....</b>	<b>72</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: T-Zell-Aktivierung durch Alloantigene.....	12
Abbildung 2: Ansatzpunkte der Biomarkerforschung anhand von Urinproben.....	17
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Kohorten .....	28
Abbildung 4: Gating-Strategie .....	38
Abbildung 5: Biopsie-Ergebnisse der Querschnittskohorte .....	40
Abbildung 6: Verteilungsmuster der Urinzellen bei Querschnittskohorte.....	41
Abbildung 7: Boxplots für Zellzahlen von T-Zellen und TEC in Biopsie-Gruppen .....	43
Abbildung 8: Tiefe Phänotypisierung der T-Zell-Populationen.....	44
Abbildung 9: Diagnostische Leistung der T-Zell Subtypen HLA-DR und TEM.....	46
Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf der Zellzahlen bei stabilen Nierentransplantierten ..	47
Abbildung 11: Patient*innen mit vollständigem Follow-up über 12 Monate.....	49

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick potenzieller Biomarker für Abstoßungsdetektion .....	18
Tabelle 2: Chemikalien .....	26
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien.....	26
Tabelle 4: Puffer.....	26
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Antikörper.....	27
Tabelle 6: Geräte und Software .....	28
Tabelle 7: Charakteristik aller Patient*innen .....	31

## Abstract

The current monitoring of kidney transplant patients is based on serum creatinine and proteinuria. These diagnostic tools are limited in their capability to detect kidney injury and inflammation. Non-invasive methods for detecting rejection and managing immunosuppression would be preferable to the current gold standard – graft biopsy.

Since urine derives directly from the kidney, it is promising for transplant biomarkers. In this study conducted at two medical centers, 162 urine samples were analyzed. The counts of T cell subsets and tubular epithelial cells in kidney transplant patients with deteriorating grafts undergoing kidney biopsy were determined using flow cytometry. Additionally, a group of kidney transplant patients was monitored for 12 months after their transplantation to evaluate how the amount and composition of urine-excreted cells changes in the first year after transplantation.

Patients with T cell-mediated rejection (*TCMR*) presented with significantly higher counts of various T cell subsets in urine samples compared to those without *TCMR*. CD8+ T cells were found to be more effective in separating patients with T cell-mediated rejection from those with other diagnoses, compared to CD4+ T cells. CD8+HLA-DR+ T cells presented with the strongest diagnostic power to detect *TCMR* among patients with graft deterioration (AUC = 0.91, Specificity: 95.9%, Sensitivity: 76.5%). Levels of urinary cell subsets in newly transplanted kidney patients decreased over the course of the first year after transplantation.

In conclusion *TCMR* is reflected by high amounts of urinary T cells. T cell subsets were able to diagnose *TCMR* among patients with graft deterioration. Flow cytometric detection of urinary T cells is a promising new biomarker for non-invasive detection of *TCMR*.

## Kurzfassung

Das derzeitige Monitoring von Nierentransplantationspatient\*innen basiert auf Serumkreatinin und Proteinurie. Diese Diagnostika sind limitiert in ihrer Fähigkeit Nierenschädigungen und -inflammationen zu detektieren. Eine nicht-invasive Methode zum Nachweis einer Abstoßung und zur Steuerung der Immunsuppression wäre gegenüber dem aktuellen Goldstandard, der Nierenbiopsie, vorzuziehen.

Da der Urin das direkte Filtrat der Niere darstellt, bietet sich dieser für nicht-invasive Biomarker an. In dieser Studie, die an zwei medizinischen Zentren durchgeführt wurde, wurden 162 Urinproben von Nierentransplantierten analysiert. Durchflusszytometrie diente der Quantifizierung von T-Zellen und tubulären Epithelzellen. Die Zellzahlen wurden mit der dazugehörigen Nierenbiopsie verglichen. Zusätzlich wurde eine Gruppe von frisch Nierentransplantierten über 12 Monate nach ihrer Transplantation begleitet, um zu evaluieren, wie sich die Menge und Zusammensetzung der ausgeschiedenen Zellen im Urin im ersten Jahr nach der Transplantation verändern.

Patient\*innen mit T-Zell-vermittelter Abstoßung (*TCMR*) wiesen in Urinproben signifikant höhere Mengen verschiedener T-Zell-Subtypen auf als Patient\*innen ohne *TCMR*. Die CD8+ T-Zellen erwiesen sich im Vergleich zu CD4+ T-Zellen als präziser bei der Trennung dieser Gruppen. Die CD8+HLA-DR+ T-Zellen konnten eine *TCMR* unter allen Patient\*innen am besten detektieren (AUC = 0,91, Spezifität: 95,9 %, Sensitivität: 76,5 %). Die Populationen der Urinzellen lagen bei stabilen frisch Transplantierten im ersten Jahr unter einem Cut-Off für zelluläre Abstoßung.

Zusammenfassend spiegelt sich *TCMR* durch hohe Mengen von T-Zellen im Urin wider. T-Zell-Subtypen waren in der Lage, *TCMR* bei Patienten mit Transplantatverschlechterung zu erkennen. Die durchflusszytometrische Detektion von T-Zellen im Urin ist ein vielversprechender neuer Biomarker für die nicht-invasive Erkennung von *TCMR*.

# 1 Einleitung

## 1.1 Nierentransplantation

Der demografische Wandel führt zu einer Zunahme von chronischen Erkrankungen.<sup>2</sup> Zu diesen Leiden gehört auch die chronische Nierenerkrankung (engl.: *chronic kidney disease*, CKD). Unter einer CKD versteht man eine irreversible Abnahme der inkretorischen und exkretorischen Nierenfunktion, welche über einen Zeitraum von mindestens drei Monaten besteht und gesundheitliche Auswirkungen hat.<sup>3</sup> Die Exkretionsaktivität der Niere wird als glomeruläre Filtrationsrate (GFR) gemessen. Normwerte von gesunden Personen um das 30. Lebensjahr liegen bei einer GFR von  $> 90 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ . Die Kriterien für eine CKD sind erfüllt, wenn die GFR auf  $< 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$  fällt oder Zeichen einer Nierenschädigung (z.B. Albuminurie,  $>30 \text{ mg/24h}$ ) auftreten.<sup>3</sup> Die aktuellen Therapiemöglichkeiten der CKD sind begrenzt und beschränken sich in der Regel auf eine Verlangsamung des Fortschreitens der Grunderkrankung. Fällt die GFR auf  $< 15 \text{ ml/min/1.73 m}^2$  spricht man von einem Nierenversagen. In der Regel macht dies eine Nierenersatztherapie notwendig, um die ausgefallene Nierenfunktion zu kompensieren.<sup>3</sup>

Noch vor extrakorporalen Nierenersatztherapien wie der Hämodialyse, bietet die Nierentransplantation die beste Therapie des Nierenversagens. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass sie der Dialyse in Mortalität und Lebensqualität überlegen ist. Sie ist also für viele Menschen die präferierte Therapieoption im Endstadium der CKD.<sup>4,5</sup>

### 1.1.1 Epidemiologie

Laut der Deutschen Stiftung für Organtransplantation konnten in Deutschland im Jahr 2022 insgesamt 1966 Nieren transplantiert werden (535 nach Lebendspende, 1431 nach Leichenspende).<sup>6</sup> Dem gegenüber stehen 8505 Patient\*innen, welche aktiv auf eine Nierentransplantation warten und diese Zeit mit anderen Ersatzverfahren überbrücken (Stand: 01.01.2023).<sup>7</sup>

Aus dieser Diskrepanz von Angebot und Nachfrage lässt sich ableiten, dass der Funktionserhalt einer bereits transplantierten Niere sehr bedeutend ist. Zudem sollten Komplikationen, welche einen Einfluss auf die Mortalität der Patient\*innen haben, verhindert werden. Die Beeinflussung des Immunsystems spielt dafür eine wichtige Rolle.

### **1.1.2 Immunsuppression**

Da es sich bei einer Nierentransplantation um einen Transfer von körperfremdem (allogenen) Gewebe handelt, würde das Immunsystem auf diese genetische Varianz mit einer gegen das Transplantat gerichteten Entzündungsreaktion reagieren.<sup>8</sup> Damit das Transplantat jedoch nicht abgestoßen wird, bedienen sich Kliniker\*innen der Wirkung von immunsuppressiven Medikamenten. In der Regel erhalten Nierentransplantierte zunächst eine Kombination aus drei Immunsuppressiva: Calcineurin-Inhibitoren, Mycophenolat Mofetil und Glukokortikoide.<sup>9-11</sup>

Für den komplikationslosen Verlauf nach einer Nierentransplantation ist es von hoher Bedeutung, dass die Immunsuppression korrekt dosiert wird. Bei Überdosierung mit zu starker Drosselung des Immunsystems kann es zu schweren Infektionen kommen.<sup>12</sup> Fällt die Immunsuppression hingegen zu gering aus, besteht die Gefahr einer Abstoßung der Niere mit Verschlechterung der Transplantatfunktion. Dies kann bis zum Verlust des Transplantats führen.<sup>11</sup>

### **1.1.3 Abstoßungsreaktion**

Die Abstoßung gehört zu den gefürchtetsten Komplikationen der Transplantationsmedizin, da sie das Risiko für eine Dysfunktion des Organs deutlich erhöht.<sup>13</sup> Im ersten Jahr sind 7% aller Patient\*innen von dieser Komplikation betroffen.<sup>9</sup> Die Rejektion kann nach unterschiedlichen Kriterien eingeteilt werden. Zeitlich wird eine hyperakute (Minuten) Rejektion von einer akuten (Wochen bis Monate) und einer chronischen (Monate bis Jahre) Abstoßung unterschieden. Pathophysiologisch spielen zelluläre und humorale Prozesse eine wichtige Rolle. Eine strikte Trennung der Entitäten ist nicht immer möglich. Zum einen, da die histopathologischen Kriterien nur eine

begrenzte Spezifität aufweisen. Zum anderen, weil die Prozesse teilweise parallel ablaufen.<sup>8</sup>

### 1.1.3.1 Humorale Abstoßungsprozesse

Die humorale Abstoßung ist durch antikörpervermittelte Prozesse charakterisiert (engl.: *antibody-mediated Rejection, ABMR*). Ziel dieser Antikörper sind entweder Blutgruppenantigene oder spender\*innen-spezifische Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: *major histocompatibility complex, MHC*) -Antigene, welche auch humane Leukozyten-Antigene (engl.: *human leukocyte antigens, HLA*) genannt werden.<sup>14</sup> Diese polymorphen Glykoproteine dienen antigenpräsentierenden Zellen (APC) um Peptide an T-Zellen zu präsentieren. Während MHC der Klasse I Antigene aus dem Inneren der Zelle präsentieren und sich auf so gut wie allen Zellen befinden, werden MHC der Klasse II für die Präsentation von extrazellulären Antigenen verwendet und primär von APCs exprimiert.<sup>15</sup>

In der Regel sind vor der Transplantation keine sogenannten spender\*innen-spezifischen Antikörper (engl.: *donor-specific antibody, DSA*) vorhanden. Die Ausnahme tritt ein, wenn der Empfänger oder die Empfängerin bereits vorher durch eine Bluttransfusion, Schwangerschaft oder andere Transplantation mit Alloantigenen in Kontakt gekommen ist.<sup>15</sup>

Im Rahmen der hyperakuten Abstoßung durch präformierte DSA kommt es innerhalb von Minuten nach Wiederherstellung des Blutflusses im Nierentransplantat zu einer Komplementaktivierung.<sup>14</sup> Daraus resultieren Thrombosen, welche eine akute Organischämie mit Nekrosen hervorrufen. Die Entfernung des Transplantats ist meistens die einzige therapeutische Option. Heutzutage werden diese präformierten DSA durch die sogenannte Kreuzprobe (engl.: *cross-match*) vor einer Transplantation in der Regel erkannt. Hierfür wird das Serum der Empfänger\*innen auf DSA gegen Leukozyten der Spender\*innen untersucht. Die hyperakute Abstoßung konnte somit fast vollständig eliminiert werden.<sup>15</sup>

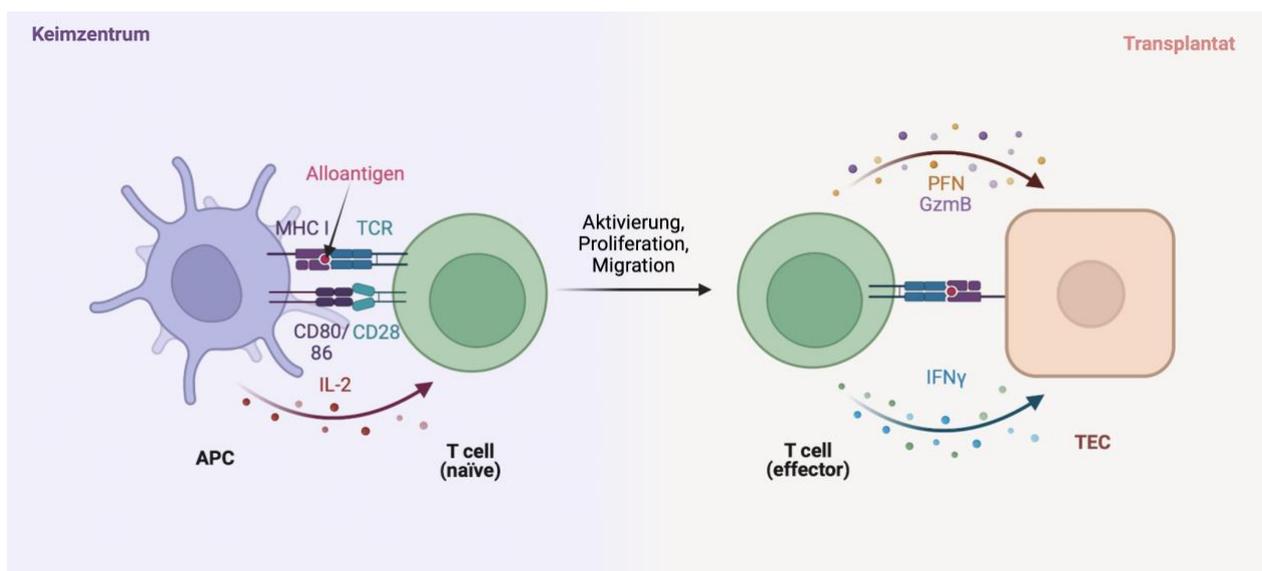
Bei einer akuten *ABMR* setzen CD4+ T-Zellen eine humorale Immunreaktion in Gang, nachdem ihnen von APCs Alloantigene dargeboten wurden. Diese sogenannten T-Helfer-Zellen aktivieren daraufhin über Zytokine und Co-Stimulation naive B-Zellen. Aus

den B-Zellen differenzieren sich Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen, welche beginnen DSA zu produzieren. Diese neuen Antikörper binden ihr Epitop auf dem Transplantatendothel und induzieren die Komplementkaskade, die Rekrutierung von zytotoxischen Immunzellen und Fibrose.<sup>16</sup> Histologisch zeigen sich ein akuter Gewebsschaden und eine mikrovaskuläre Entzündung, welche sich als Glomerulitis oder peritubuläre Capillaritis präsentiert.<sup>17</sup>

Während einer chronischen *ABMR* läuft die Transplantatschädigung durch die DSA langsamer ab und ruft ein eigenes histologisches Muster aus Verdickung der Gefäßwände, interstitieller Fibrose und Atrophie der Tubuli hervor.<sup>18</sup>

Zusammenfassend definiert die Banff-Klassifikation von 2017 drei Kriterien für die Diagnose *ABMR*: histologischer Nachweis von Gewebeschädigung, Interaktion von Antikörpern mit dem Transplantatendothel und serologischer Nachweis von DSA.<sup>19</sup> Neu in der Aktualisierung von 2017 ist, dass bei Nachweis des Komplementprodukts C4d auf den Nachweis der DSA verzichtet werden kann.<sup>17</sup> Das Protein C4d ist ein Zwischenprodukt in der Komplementkaskade, welches die Interaktion von Antikörpern und Endothel widerspiegelt. Nach seiner Freisetzung bindet es kovalent an das Kollagen der Basalmembran und kann hier als Marker für eine *ABMR* nachgewiesen werden.<sup>20</sup>

### 1.1.3.2 Zelluläre Abstoßungsprozesse



**Abbildung 1: T-Zell-Aktivierung durch Alloantigene**

Schematische Darstellung der Aktivierung naiver T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen (APC). Alle drei Aktivierungs-Signale sind dargestellt. Die Effektor-T-Zellen wandern daraufhin ins Transplantat und greifen Zellen des Spender\*innen-Organs an. APC = antigenpräsentierende Zelle; MHC I = Haupthistokompatibilitätskomplex I; TCR = T-Zell-Rezeptor; IL-2 = Interleukin-2; PFN = Perforin; GzmB = Granzym B; IFN $\gamma$  = Interferon gamma; TEC = Tubulusepithelzelle. (Erstellt mit BioRender.com)

Neben den humoralen können auch zelluläre Prozesse des Immunsystems das Transplantat schädigen. Man spricht in diesem Fall von einer T-Zell vermittelten Abstoßung (engl.: *T-cell mediated rejection, TCMR*). Ursächlich ist eine Aktivierung von T-Zellen durch drei sich ergänzende Signale: Nach einer Antigenerkennung durch den Rezeptor der T-Zelle (1. Signal) folgen Co-Stimulationen über einen Co-Rezeptor (2. Signal) und proinflammatorische Zytokine (3. Signal).<sup>15</sup> Die Antigenerkennung erfolgt nach Antigenpräsentation durch APCs. Beim sogenannten direkten Pfad werden die T-Zellen durch Spender\*innen-APCs aktiviert. Diese gelangen mit dem Transplantat ins System der Empfänger\*innen und wandern in die sekundär lymphatischen Organe. Dort präsentieren sie über MHC der Klasse I ihr Alloantigen an CD8+ T-Zellen. Die indirekte Aktivierung erfolgt hingegen über APCs der Empfänger\*innen, welche exogene Peptide prozessieren und über MHC der Klasse II an CD4+ T-Zellen präsentieren. Zuletzt ist noch ein semi-direkter Pfad der Antigenpräsentation beschrieben. Für diesen nehmen Empfänger\*innen-APCs die MHCs der Spender\*innen auf und präsentieren diese vollständig an T-Zellen.<sup>15,22</sup> Nach der Aktivierung proliferieren die T-Zellen und differenzieren zu Effektor-T-Zellen, welche ins Transplantat migrieren.<sup>8</sup> Hier rufen sie sowohl eine Tubulitis als auch eine interstitielle Entzündung hervor.<sup>23</sup>

Sind die Kriterien für eine zelluläre Abstoßung nicht vollständig erfüllt, so behelfen sich Patholog\*innen mit der histologischen Diagnose einer grenzwertigen zellulären Rejektion (engl.: *borderline rejection, BR*). Bei dieser Vorstufe einer *TCMR* ist entweder die Tubulitis (nur 1-4 mononukleäre Zellen pro tubulären Querschnitt) oder die interstitielle Inflammation (< 25 % des Parenchyms betroffen) ausgeprägt. Für die Diagnose einer *TCMR* müssen beide histologischen Merkmale präsent sein.<sup>23</sup>

Wird der pathologische Prozess früh erkannt, kann eine Anpassung der Immunsuppression als therapeutische Maßnahme erfolgen. Während eine zelluläre Abstoßung gut mit hochdosierten Glukokortikoiden behandelt werden kann, helfen diese bei der *ABMR* nur unzureichend. Die Therapie der *ABMR* fokussiert sich auf Plasmapherese, intravenöse Immunglobuline und Medikamente mit B-Zell-dezimierender Wirkung wie Rituximab.<sup>18</sup> Schreitet die Abstoßung hingegen unerkannt fort, kommt es zur Schädigung des Organs bis hin zum Verlust. Daher ist eine frühe und praktikable Methode zur Erkennung einer Abstoßungsreaktion von immenser Bedeutung für die Nachsorge von Nierentransplantierten.

#### **1.1.4 Monitoring in der Nachsorge von Nierentransplantierten**

Die Grundpfeiler des aktuellen Monitorings bei Nierentransplantierten sind das Serumkreatinin und die Proteinurie.<sup>11</sup> Beide Werte überzeugen primär durch ihre breite Verfügbarkeit und ihre Kosteneffizienz. Über das Serumkreatinin lassen sich Rückschlüsse auf die Filtrationsleistung der Niere und damit der Funktion des Transplantats ziehen.<sup>24</sup> Ist die Transplantatfunktion vermindert, steigt der Kreatininwert im Serum an. Dieser Anstieg ist jedoch nicht krankheitsspezifisch für eine Abstoßungsreaktion. Es gibt neben Muskelschädigung, Nierenarterienstenose und akuter Nierenfunktionseinschränkung viele weitere Ursachen für eine Erhöhung. Zudem kann der Wert durch Störfaktoren wie wassertreibende Medikamente, sogenannte Diuretika, verfälscht werden.<sup>25</sup> Ein weiterer Nachteil des Labormarkers besteht darin, dass sich ein Anstieg erst nach stattgehabtem Nierenschaden nachweisen lässt. Eine subklinische zelluläre Abstoßung, welche in circa 30 % aller Protokollbiopsien gefunden wird und ohne klinische Zeichen einer Transplantatverschlechterung einhergeht, würde durch das Serumkreatinin nicht entdeckt.<sup>26</sup> Ein Biomarker, welcher einen Schaden hingegen vorhersagt und damit gegebenenfalls abwenden kann, wäre deutlich vorzuziehen.

Die Proteinurie gibt Hinweise auf eine Schädigung der Glomeruli im Transplantat. Werte über 150 mg/24h gelten als pathologisch und korrelieren mit einem erhöhten Risiko für Transplantatversagen. Ursachen für den Anstieg reichen von einer Abstoßung bis hin zur Entwicklung einer neuen Glomerulonephritis oder Rekurrenz der etwaigen Grunderkrankung.<sup>27</sup>

Da die beiden Screening-Werte keinen Rückschluss auf eine genaue Pathologie der Niere erlauben, sondern lediglich eine unspezifische Funktionsbeeinträchtigung indizieren, wird in einem nächsten Schritt zum aktuellen Goldstandard für die Diagnostik von Transplantatversagen gegriffen: der Transplantatnierenbiopsie.

#### **1.1.5 Nierenbiopsie als diagnostischer Goldstandard**

Bessern sich Serumkreatinin oder Proteinurie nicht, wird von der *Kidney Disease: Improving Global Outcome* (KDIGO) in einem nächsten Schritt eine Nierenbiopsie

empfohlen, um die Ursache für die Verschlechterung der Transplantatnieren herauszufinden.<sup>11</sup>

Anhand von histologischen Veränderungen lassen sich Rückschlüsse auf die ursächlichen Pathologien treffen. Diese werden in der Banff Klassifikation unterschiedlichen Gruppen zugeordnet.<sup>23</sup>

Da es sich bei dieser Diagnostik um ein invasives Verfahren handelt, kann es zu Komplikationen kommen. Diese reichen von einfachen Nachblutungen bis hin zur Transfusionsbedürftigkeit bei Kreislaufinstabilität und betreffen knapp 2% der Patient\*innen. Klinisch indizierte Biopsien bei Personen mit Transplantatverschlechterung hatten mit 2.7% Komplikationsrate gegenüber systematischen Protokollbiopsien mit 0.3% Komplikationsrate nochmal ein höheres Risiko.<sup>28</sup> Zudem muss bei komplikationsloser Nierenbiopsie berücksichtigt werden, dass die Gewebezylinder lediglich einen kleinen Teil der Niere widerspiegeln und daher bei teilweise inhomogen verteilter Krankheitsaktivität des Organs ein sogenannter *sampling bias* entstehen kann.

## **1.2 Forschungsstand potenzieller Biomarker für Abstoßungen**

Wie oben bereits beschrieben stellt die Abstoßung von Nierentransplantaten und das Detektieren dieser Komplikation eine große Herausforderung dar. Die Nierenbiopsie als aktueller diagnostischer Goldstandard kann sich der Komplexität der unterschiedlichen Abstoßungs-Entitäten nur unzureichend systematisch annähern.<sup>8</sup> Zudem birgt ihre invasive Natur Risiken für Patient\*innen.<sup>28</sup> Darüber hinaus können *sampling bias* und der subjektive Beobachtungs-Bias der Nephropatholog\*innen die Befundung beeinflussen.<sup>29</sup> Aus diesem Grund gibt es Bedarf für neue diagnostische Methoden, um die Detektion von Abstoßungsreaktionen sicherer, praktikabler und präziser zu machen.

### **1.2.1 Anspruch an einen optimalen Biomarker**

Ein idealer Biomarker für Abstoßungsreaktionen von Nierentransplantaten sollte:

1. Hohe Sensitivität besitzen. Alle Patient\*innen, welche die Erkrankung haben, sollten detektiert werden.
2. Spezifisch für die Erkrankung sein. Bis dato waren Biomarker lediglich im Stande unspezifische Inflammationen zu erkennen.<sup>30</sup> Um therapeutische Konsequenzen ableiten zu können, wären Biomarker, welche die spezifische Krankheits-Entität erkennen, überlegen. Die Differenzierung der unterschiedlichen Abstoßungsreaktionen von Nierentransplantaten wäre ein klinisch relevanter Beitrag.
3. Praktikable Handhabung aufweisen. Darunter versteht sich, dass dieser patient\*innen-schonend und schnell bezogen werden könnte. Dabei sollten für die Patient\*innen keine Risiken entstehen. Ein Biomarker sollte zudem möglichst frei von Störanfälligkeit sein.
4. Prognostische Relevanz besitzen. Ein Biomarker, welcher einen Schaden prognostiziert und nicht erst nach stattgehabtem Schaden anschlägt, wäre vorzuziehen. Über dieses präventive Monitoring könnten Patient\*innen vorrausschauend begleitet werden. So könnte die Immunsuppression personalisiert abgestimmt werden, wodurch sich Nebenwirkungen der Medikamente reduzieren lassen würden.<sup>18</sup>
5. Effizient sein. Da in der modernen Medizin die Ökonomie nicht außer Acht gelassen werden sollte, ist die Kosteneffizienz ebenfalls miteinzubeziehen.

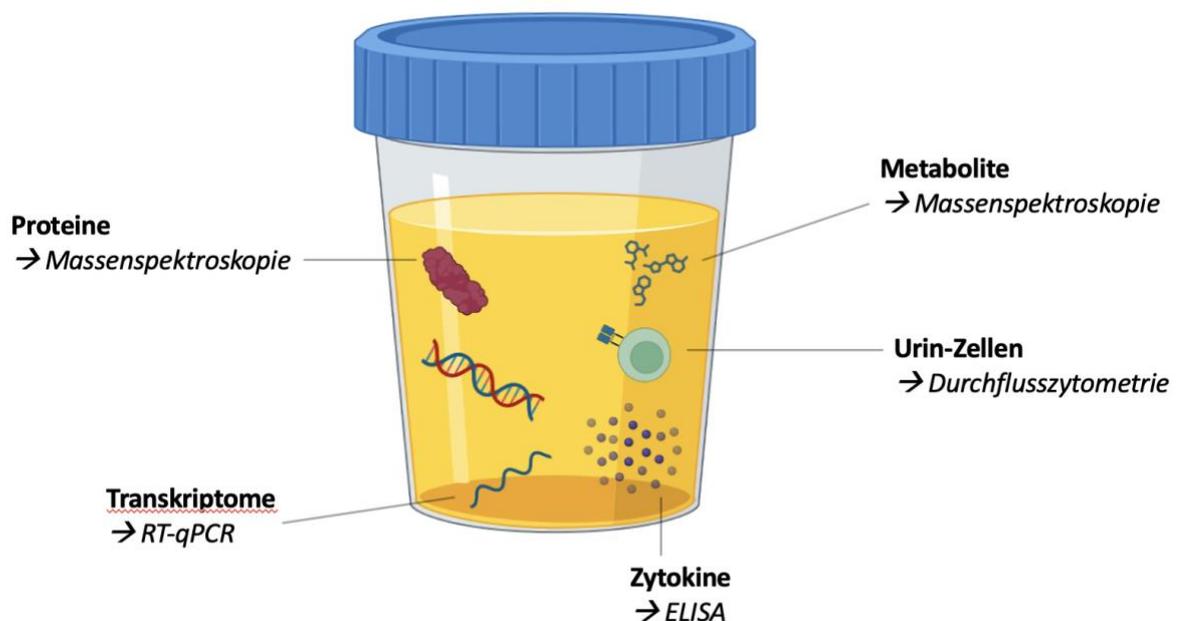
### **1.2.2 Biomarker im Urin**

Urin hat gegenüber Blutproben den entscheidenden Vorteil, dass dieser das direkte Filtrat der Niere darstellt. Zellen, welche im Rahmen von Pathomechanismen zu Grunde gehen oder diese vorantreiben, gehen wahrscheinlich über das Tubulussystem ins Filtrat über. Ihr Nachweis stellt ein mögliches Fenster in die Niere dar, welches Rückschlüsse auf lokale Prozesse zulässt.

Gegenüber Gewebeproben hat Urin den Vorteil, dass dieser ohne jegliche Invasivität eingesammelt werden.

Aus diesem Grund befasst sich ein breites Feld an Wissenschaftler\*innen mit unterschiedlichen Bestandteilen des Urins. Unter den Ansätzen findet sich die Analyse einzelner Moleküle, sowie die systematische Untersuchung des Proteoms, Metaboloms und Transkriptoms. Urinzellen stehen ebenfalls im Fokus. Andere Arbeitsgruppen verfolgen den Ansatz unterschiedliche Parameter zu diagnostischen Scores zu kombinieren.<sup>29</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur Biomarker berücksichtigt, welche in mindestens zwei Kohorten untersucht wurden.



**Abbildung 2: Ansatzpunkte der Biomarkerforschung anhand von Urinproben**

Die unterschiedlichen Biomarker-Kandidaten zur Detektion von Abstoßungsreaktionen sind zusammen mit der gängigen Methodik zur Analyse dargestellt. RT-qPCR = quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion (engl.: real-time quantitative PCR); ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay

**Tabelle 1: Überblick potenzieller Biomarker für Abstoßungsdetektion**

<b>Biomarker</b>	<b>Vergleichsgruppen</b>	<b>AUC</b>	<b>Pat. (n)</b>	<b>Ref.</b>
<b>Zytokine</b>				
CXCL10 Protein	Inf vs. noInf	0.74	80	31
CXCL10 Protein	AR vs. noAR	0.74	185	32
CXCL10 Protein	AR vs. noAR	0.76	97	33
CXCL9+CXCL10 Protein	AR vs. noAR	0.70	329	30
CXCL9 Protein	AR vs. noAR	0.72	244	34
<b>Transkriptome</b>				
Perforin, Granzym B	AR vs. noAR	k.a.	85	35
CD3 Epsilon, CXCL10, 18S rRNA	AR vs. noAR	0.74	485	36
CD3ε, CD105, CD14, CD46, 18S rRNA	TCMR vs. ABMR	0.80	84	37
CRM	AR vs. HC	0.99	150	38
13 Gen	TCMR vs. noTCMR	0.92	53	39
<b>Metabolite</b>				
3-Sialyllactose, Xanthosin + Chinolinat + X-16397 + CD3ε mRNA + IP-10 mRNA + 18S rRNA	TCMR vs. noTCMR	0.93	198	37
Alanin, Ziträt, Laktat und Harnstoff	AR vs. noAR	0.75	109	40
Prolin, Kynurenin, Sarcosin, Methioninsulfoxid, Threonin, Glutamin, Phenylalanin und Alanin	TCMR vs. noTCMR	0.88	57	41
<b>Proteine</b>				
11-Peptid Panel	AR vs. HC	0.94	151	42
CD3+ extrazelluläre Vesikel (iKEA)	TCMR vs. noTCMR	0.84	44	43
79-Peptid Panel	ABMR vs. noABMR	0.92	20	44
Alpha-1-B-Glycoprotein, Afamin, Apolipoprotein A1, Apolipoprotein A4, Ig-Heavy-Konstante α1, Ig-Heavy-Konstante γ4, Leucin-reiches α2-Glycoprotein 1, Alpha-1-Antitrypsin, Antithrombin und Transferrin	ABMR vs. noABMR	0.88	391	45
<b>Scores</b>				
Q-Score: zellfreie DNA, methylierte zellfreie DNA, Clusterin, CXCL10, Kreatinin und Gesamtprotein	AR vs. HC	0.99	364	46
<b>Zelluläre Marker</b>				
T-Zellen	AR vs. noAR	0.57-0.99	60	47
T-Zellen pro Tubulusepithelzellen	AR vs. noAR	0.90	63	48

Auswahl relevanter Veröffentlichungen. Es können weitere Publikationen zu gleichen oder anderen Biomarkern vorliegen. ABMR = Antikörper vermittelte Rejektion; AR = akute Rejektion; AUC = Fläche unter der Kurve (engl.: Area under the curve); CRM = common rejection module; HC = gesunde Kontrollen (engl.: healthy control); Inf = Inflammation; k.a. = keine Angabe; noABMR = keine Antikörper vermittelte Rejektion; noAR = keine akute Rejektion; noInf = keine Inflammation; noTCMR = keine T-Zell vermittelte Rejektion; Pat. = Patient\*innenzahl; Ref. = Referenz; TCMR = T-Zell vermittelte Rejektion

### 1.2.2.1 Zytokine

Urin-Zytokine werden seit den frühen Nullerjahren als Biomarker für Nierentransplantatabstoßungen untersucht. Der Fokus liegt vor allem auf CXCL-Ligand 9 (CXCL9) und 10 (CXCL10).<sup>49</sup> Sie werden von proinflammatorischen Zellen und Tubulusepithelzellen (engl. *tubular epithelial cell*, TEC) freigesetzt und induzieren die Migration von zytotoxischen T-Zellen ins Transplantat.<sup>50</sup> In der Regel werden sie mittels enzymgebundener Immunadsorptionstests (engl.: *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) nachgewiesen.<sup>31-34</sup> Die erste Untersuchung der Zytokine in einem realistischen klinischen Setting wurde von *Hirt-Minkowski et al* durchgeführt. Dafür wurden bei 213 Nierentransplantierten in den ersten sechs Monaten nach der Operation 362 Protokollbiopsien durchgeführt und die Urin-Zytokine bestimmt. CXCL10 konnte subklinische tubulo-interstitielle Inflammation nachweisen (AUC 0.69). Innerhalb einer Gruppe mit 80 Indikationsbiopsien ließ sich eine klinische tubulo-interstitielle Inflammation ebenfalls detektieren (AUC 0.74).<sup>31</sup> In einer Veröffentlichung von *Raza et al* konnte CXCL10 unter 185 Urinproben die 96 akuten Abstoßungen mit einer Sensitivität von 72% und einer Spezifität von 71% detektieren (AUC 0.74). Außerdem berichtete die Arbeit, dass Transplantate von Patient\*innen mit niedrigen CXCL10-Spiegeln länger überlebten.<sup>32</sup> CXCL10 wurde ebenfalls in einer pädiatrischen Kohorte untersucht. In dieser multizentrischen prospektiven Beobachtungsstudie konnte CXCL10 Patient\*innen mit akuter Abstoßung von solchen ohne histologische Zeichen einer Rejektion trennen (AUC 0.76).<sup>33</sup> *Tinel et al.* haben die diagnostische Leistung dieser Zytokine ebenfalls untersucht und kamen zu dem Ergebnis, dass die Kombination von CXCL9 und CXCL10 Patient\*innen mit einer akuten Abstoßung unter mehr als dreihundert Studienteilnehmer\*innen detektieren konnte (AUC 0.70). Die Spezifität der Marker war jedoch begrenzt, da BKV-Virus (BKV) -Infektionen oder Harnwegsinfekte ebenfalls zu signifikanten Erhöhungen der Zytokine führten.<sup>30</sup> Eine weitere Veröffentlichung bestätigte den diagnostischen Nutzen der Zytokine mit einer AUC von 0.72 für CXCL9 und einer AUC von 0.74 für CXCL10.<sup>34</sup> Je mehr Variablen in einen Biomarker einbezogen wurden, desto präziser wurde dieser. *Tinel et al.* konnten ihre diagnostische Testgenauigkeit auf eine AUC von 0.85 verbessern, indem der Biomarker um sechs weitere Variablen (Alter, Geschlecht, GFR, DSA, Harnwegsinfekte und Viruslast des BKV im Blut) erweitert wurde.<sup>30</sup> Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Zytokine aus Urinproben einen eher unspezifischen Indikator für Nieren-Inflammation darstellen. Da die Zytokine bereits vor

histologischen Veränderungen ansteigen, könnten sie eine wichtige Rolle als Screening-Parameter einnehmen.<sup>51</sup>

### 1.2.2.2 Transkriptome

Mehrere Studien konnten unterschiedliche Formen der RNA (Ribonukleinsäure) aus Urinproben mit Abstoßungsreaktionen in Verbindung bringen. Diese Produkte der Proteinbiosynthese werden in der Regel mittels Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*, PCR) nachgewiesen.

*Li et al* legten 2001 den Grundstein, als sie der Frage nachgingen, ob sich Urin-Transkriptome anbieten würden, um eine akute Abstoßung nicht-invasiv zu diagnostizieren. In ihrer Veröffentlichung konnte die Arbeitsgruppe darlegen, dass Patient\*innen mit akuter Abstoßung erhöhte Werte von Perforin und Granzym B Boten-RNA (engl.: *messenger RNA*, mRNA) im Urin hatten. Anhand von Perforin mRNA ließ sich die Rejektion mit einer Sensitivität von 83% und Spezifität von 83% vorhersagen. Granzym B mRNA kam auf eine Sensitivität von 79% und auf eine Spezifität von 77%.<sup>35</sup> *Suthanthiran et al* haben mRNA aus Urinproben von 485 Nierentransplantierten über den Zeitraum eines Jahres untersucht. Die molekulare Signatur von CD3ε mRNA, CXCL10 mRNA und 18S ribosomaler RNA (rRNA) war im Stande Patient\*innen mit einer *TCMR* von Personen ohne *TCMR* zu unterscheiden (Sensitivität 79%, Spezifität 78%, AUC 0.85).<sup>36</sup> Im weiteren Verlauf gelang es derselben Arbeitsgruppe mit einer Signatur aus 5 Genen (CD3ε, CD105, CD14, CD46, und 18S rRNA) Transplantate mit *TCMR* von solchen mit *ABMR* zu unterscheiden.<sup>37</sup> In Biopsien aus unterschiedlichen soliden Organtransplantaten ließen sich weitere Gene finden, welche im Rahmen einer akuten Abstoßung überexprimiert waren.<sup>52</sup> Diese 11 *common rejection module* (CRM)-Gene wurden von *Sigdel et al* auch in 150 Urinproben untersucht. Ein Score aus diesen CRM-Genen konnte akute Abstoßungen von Patient\*innen mit Biopsien ohne Abstoßung mit einer Sensitivität von 95.35% und einer Spezifität von 97.78% unterscheiden. Bei Einbezug der Diagnosen Borderline Abstoßung und BK-Virus-Nephropathie sank die Sensitivität hingegen auf 76.92%.<sup>38</sup>

Ein weiterer Ansatz der Transkriptom-Analyse stellt die RNA-Sequenzierung dar. Hier wird das gesamte Transkriptom untersucht. Patient\*innen mit einer *TCMR* präsentierten

sich in der Biopsie und im Urin mit erhöhten Mengen an Immunzell-Traskriptomen gegenüber solchen ohne TCMR.<sup>39</sup>

### 1.2.2.3 Urin-Metabolite

*Nissaisorakarn et al* konnten aus 1516 Urinüberständen von 241 Nierentransplantierten die Metabolite 3-Sialyllactose, Xanthose, Chinolinat und X-16397 identifizieren. Die Kombination mit der bereits erwähnten Signatur aus drei Genen von *Suthanthiran et al* führte zu einem multi-Omics Ansatz, welcher TCMR mit einer Sensitivität von 90% und einer Spezifität von 84% erkannte.<sup>37</sup> Die Metabolite Alanin, Zitrat, Laktat und Harnstoff erwiesen sich ebenfalls als nützlich (AUC 0.75) in der Diagnostik von akuten Abstoßungen.<sup>40</sup> *Blydt-Hansen et al* haben 277 Urinproben von 57 pädiatrischen Patient\*innen mit Protokoll- oder Indikationsbiopsien auf Metabolite untersucht. Die Kombination aus Prolin, Kynurenin, Sarcosin, Methioninsulfoxid, Threonin, Glutamin, Phenylalanin und Alanin war zu 83% spezifisch und sensitiv für TCMR im Vergleich zu Patient\*innen ohne TCMR. In einer Validierungskohorte wurden TCMR und Borderline zusammengefasst und mit Proben ohne Rejektion verglichen. Die Sensitivität fiel dadurch auf 65% und die Spezifität auf 74%.<sup>41</sup>

Auf Metaboliten basierende Signaturen waren teilweise in der Lage Abstoßungen zu demaskieren. Ein entscheidender Nachteil besteht darin, dass meistens eine große Anzahl an Metaboliten bestimmt werden muss, um genug diagnostische Leistung zu erreichen.

### 1.2.2.4 Proteomik

*Sigdel et al.* untersuchten die Signaturen von Urin-Proteinen bei Nierentransplantierten. Nach einer ursprünglichen Auswahl von über 900 Proteinen, kristallisierten sich 35 potenzielle Untersuchungsparameter heraus. Davon konnten 11 Proteine Patient\*innen mit akuter Abstoßung identifizieren (AUC 0.94). Weitere 12 waren spezifisch für die chronische Transplantatnephropathie (AUC 0.99). Die BKV-Nephropathie konnte durch 12 weitere Proteine erkannt werden (AUC 0.83). Alle Proben wurden mit einer Kohorte

aus 151 gesunden Nierentransplantierten verglichen.<sup>42</sup> In einer Veröffentlichung von *Park et al.* wurden Exosome über elektrochemische Verfahren in Urinproben untersucht. Dabei handelt es sich um kleine Vesikel, welche sich von Zellen ablösen. Da sie aus der lipidhaltigen Doppelmembran der Zellen entstehen, tragen sie ebenfalls Oberflächenmoleküle. In einem explorativen Ansatz wurden die Urinproben von 15 Patient\*innen mit *TCMR* und 15 Patient\*innen ohne *TCMR* auf die Oberflächenmoleküle CD3, CD45, CD2, HLA-ABC und CD52 der Exosome untersucht. Eine *TCMR* konnte durch CD3+ Exosome mit 92.8% Sensitivität und 87.5% Spezifität erkannt werden (AUC 0.911). Für eine Validierungskohorte wurden 14 weitere Proben untersucht und dabei *TCMR* mit 63.6% Sensitivität und 100% Spezifität erkannt.<sup>43</sup> Die Forschungsgruppe um *Kanzelmeyer et al* haben an 60 pädiatrischen Patient\*innen das Urin-Proteom auf Marker für chronische *ABMR* untersucht. Die 79 identifizierten Proteine konnten in Kombination mit *CKD 273*, einem Biomarker für CKD, chronische *ABMR* mit 88% Sensitivität und 92% Spezifität erkennen.<sup>44</sup> Nach ihrer Entdeckung konnten die 10 Proteine Alpha-1-B-Glycoprotein, Afamin, Apolipoprotein A1, Apolipoprotein A4, Ig-Heavy-Konstante  $\alpha 1$ , Ig-Heavy-Konstante  $\gamma 4$ , Leucin-reiches  $\alpha 2$ -Glycoprotein 1, Alpha-1-Antitrypsin, Antithrombin und Transferrin in einer Validierungskohorte mit 391 Urinproben eine *ABMR* von den anderen Proben unterscheiden (AUC 0.88). Da die Spezifität nur bei 76% lag wurde knapp die Hälfte aller *TCMR*-Proben ebenfalls als *ABMR* gedeutet.<sup>45</sup>

#### 1.2.2.5 Biomarker-Scores

Die Forschungsgruppe um *Yang et al.* verfolgte den Ansatz, mehrere Biomarker zu einem Score zusammenzufügen. Für diesen *Q-Score* wurden mittels Algorithmus sechs Bestandteile (zellfreie DNA, methylierte zellfreie DNA, Clusterin, CXCL10, Kreatinin und Gesamtprotein) in Spontanurin detektiert und nach einer Trainingsphase in zwei Validierungskohorten bestätigt. Der Score reicht von 0 bis 100, wobei ein Wert von  $> 32$  eine akute Rejektion anzeigt. Unter Verwendung dieses Cut-Offs konnten 94.9% aller akuten Rejektionen mit einer Spezifität von 100% gegenüber Patient\*innen mit stabiler Transplantatfunktion abgegrenzt werden (AUC 0.99). Eine spätere Validierung anhand von 385 Urinproben kam zu ähnlichen Werten (AUC 0.99). Es wurden sowohl klinische als auch subklinische akute Abstoßungen durch den Score erkannt. *TCMR* und *ABMR*

wurden beide ohne signifikanten Unterschied als akute Rejektion identifiziert. Eine Trennung dieser beiden Entitäten war bis dato anhand des Scores nicht erfolgreich.<sup>46</sup>

### **1.2.3 Zwischenfazit zum Status-Quo der Urinbiomarker**

Wie bereits dargelegt, hat die Forschung eine Vielzahl an individuellen Biomarker-Konzepten mit schwankender diagnostischer Leistung hervorgebracht. Alle teilen die Limitation, dass es nicht zu Genüge gelingt die unterschiedlichen Formen der Inflammation im Transplantat zu diskriminieren. Zudem wurden die Biomarker teilweise an vorselektierten Patient\*innen-Kollektiven erprobt. Aus diesem Grund hat noch kein Biomarker den Schritt zur klinischen Implikation bewerkstelligt. Neue Ansätze sollen diese Limitation beheben.

## **1.3 Durchflusszytometrie in der Medizin**

Über viele Jahrzehnte konnte sich die Durchflusszytometrie (DZ) als verlässliche Analysemethode bewähren. In der hämatoonkologischen Diagnostik hat die Technik einen festen Stellenwert, um maligne Zellen im Blut zu detektieren.<sup>53</sup> Aus Urinproben konnten mittels Durchflusszytometrie ebenfalls spannende Erkenntnisse und potenzielle Biomarker für Nierenerkrankungen gewonnen werden.

### **1.3.1 Urin-Durchflusszytometrie**

Da Zellen im Rahmen von Pathologien der Niere in den Urin übertreten, bietet sich dieses Medium besonders gut an, um zelluläre Biomarker für Nierenerkrankungen zu generieren.

*Enghard et al* zeigten, dass CD4+ T-Zellen aus Urinproben einen spezifischen Marker für die Aktivität einer Lupusnephritis darstellen. Bei einem Cut-Off-Wert von 800 CD4+ T-Zellen pro 100 ml Urin konnten inaktive Patient\*innen klar von Patient\*innen mit einer aktiven Lupusnephritis getrennt werden (AUC 0.99).<sup>54</sup> Patient\*innen mit aktiver renaler

Anti-Neutrophiler cytoplasmatischer Antikörper (ANCA)-assoziierter Vaskulitis präsentierten sich ebenfalls mit mehr Urin-T-Zellen als solche die in Remission waren, nur extrarenalen Befall hatten oder gar nicht an einer ANCA-Vaskulitis erkrankt waren.<sup>55</sup>

Die Urin-Durchflusszytometrie wurde ebenfalls als potenzielles Monitoring für Abstoßungsreaktionen von Nierentransplantaten untersucht. Bereits in den frühen 90er Jahren konnte gezeigt werden, dass die absolute Zellzahl aus Urinproben mit einer Abstoßung korreliert. Patient\*innen mit einer stabilen Transplantatfunktion präsentierten sich mit wenigen Zellen in ihren Urinproben. Im Falle einer akuten Rejektion waren hingegen deutlich mehr Zellen gefunden worden, welche größtenteils T-Zell-Populationen zuzuordnen waren.<sup>56</sup> Andere Arbeitsgruppen bestätigten in den folgenden Jahren den Nutzen der Urin-basierten Durchflusszytometrie für das Monitoring der Transplantatfunktion.<sup>57-60</sup> Im Rahmen einer genaueren Untersuchung der Aktivierungsmarker von T-Zellen mittels Durchflusszytometrie zeigten sich weitere Biomarker zum Monitoring von Abstoßungen. Urin-T-Zellen, welche den Fas-Liganden exprimierten, besaßen eine Sensitivität von 91% und eine Spezifität von 100% für akute Abstoßungen. Als Vergleichsgruppen dienten Patient\*innen mit Pyelonephritis, chronischer Abstoßung, akuter Tubulusnekrose und stabiler Transplantatfunktion.<sup>47</sup>

In einer neuen Arbeit von *Goerlich et al* wurden neben T-Zellen auch tubuläre Epithelzellen (TEC) im Urin mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Anzahl der Urin-T-Zellen korrelierte mit der interstitiellen Inflammation ( $p = 0.0005$ ,  $r = 0.70$ ) und der Tubulitis ( $p = 0.006$ ,  $r = 0.58$ ) der Nierenbiopsie. Zudem konnte eine Ratio aus T-Zellen und TEC die Patient\*innen mit Abstoßung unter allen Nierentransplantierten mit Transplantatverschlechterung detektieren (AUC 0.91).<sup>48</sup>

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass das Potential der Urin-Durchflusszytometrie in einer Vielzahl Publikation zu Tage getreten ist. Neben der breiten Verfügbarkeit überzeugt das Konzept mit einer patient\*innen-schonenden Umsetzung.

## 1.4 Fragestellung

Wie bereits dargelegt stellt die Nachsorge von Nierentransplantierten eine Herausforderung dar. Die Screening-Parameter Serumkreatinin und Proteinurie sind störanfällig und unspezifisch. Die invasive Nierenbiopsie ist komplikationsbehaftet und gibt nur eine punktuelle Aussage über den Zustand des Nierentransplantats. Zahlreiche Ansätze wurden erprobt, um diese Limitationen zu beheben. Kein bis dato bekannter Biomarker vermag die einzelnen Entitäten der Rejektion zu differenzieren und sensitiv in realistischen Patient\*innen-Kollektiven zu detektieren.

Die Urin-Durchflusszytometrie hat sich mehrfach als präzise und patiente\*innen-schonende Methode zur Detektion von Nieren-Inflammationen bewiesen.

Ziel dieser Arbeit ist es, den Ansatz, dass Zellpopulationen im Urin ein potenzielles Fenster in die Niere darstellen, weiterzuverfolgen.

Findet sich im Urin bei Nierentransplantierten mit Transplantatdysfunktion ein Subtyp der T-Zellen, welcher als präziserer Biomarker für eine Abstoßungsreaktion angewendet werden könnte?

Um dieser Fragestellung nachzugehen, soll eine tiefere Phänotypisierung der T-Zellen erfolgen und mit den Ergebnissen der Nierenbiopsie verglichen werden. Die Anwendbarkeit dieses potenziellen zellulären Biomarkers soll bei frisch Nierentransplantierten im ersten Jahr prospektiv untersucht werden.

## 2 Methodik

### 2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2: Chemikalien**

Name	Herkunft
FcR Blocking Reagent, human	Milteny Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Imidazolidinyl urea (IU, Imidazolidinylharnstoff)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Freeze Medium (90% FCS / 10% DMSO)	DRFZ, Berlin, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 0.5M, pH 8.0	Thermo Scientific, Massachusetts, USA

**Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien**

Name	Herkunft
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning Lifesciences, Durham, NC, USA
Falcons 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäß 1.5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
FACS Tubes	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
CyroPure Gefäße, 1.6 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pre-Separation Filters (30 µm)	Milteny Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland

**Tabelle 4: Puffer**

Name	Herkunft
PBS + 0,2% BSA (sterilfiltriert)	DRFZ, Berlin, Deutschland
PBS + 0,2% BSA (sterilfiltriert) + 2 mM EDTA	DRFZ, Berlin, Deutschland
PBS + 0,2% BSA (sterilfiltriert) + 0,02% Azid	DRFZ, Berlin, Deutschland
Perm/Wash 10X Solution	BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA

## 2.2 Antikörper

**Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Antikörper**

Antigen	Reaktivität	Konjugat	Isotyp	Klon	Verdünnung	Hersteller
CD3	human	APCeF780	mo IgG1k	SK7	100	eBioscience
CD4	human	PEVio770	REA	REA623	100	Miltenyi Biotec
CD8	human	A647	mo IgG1k	GN11/134D7	2000	DRFZ
CD8	human	APC	mo IgG1k	SK1	100	Biolegend
CD45RO	human	Pe	mo IgG2ak	UCHL1	100	Biolegend
CD45	human	BUV805	mo IgG1k	HI30	200	BD
CCR7	human	BV421	mo IgG2ak	G043H7	50	Biolegend
CCR7	human	BV510	Rat, IgG1a,k	3D12	20	BD
HLA.DR	human	BUV395	mo IgG2ak	G46-6	100	BD
CD28	human	FITC	mo IgG1k	CD28.2	100	Biolegend
Cytokeratin	human	FITC	mo IgG1k	CK3-6H5	50	Miltenyi Biotec
Vimentin	human	APC	REA	REA409	50	Miltenyi Biotec
CD10	human	PeVio770	REA	REA877	50	Miltenyi Biotec
CD13	human	APCVio770	REA	REA263	200	Miltenyi Biotec
CD227	human	PE	REA	REA448	200	Miltenyi Biotec
CD326	human	BV711	mo IgG2b	9C4	100	Biolegend
isotype ctrl	mouse	BV711	mo IgG2bk	MPC-11	100	Biolegend
isotype ctrl	human IgG1	Pe	REA (l)	REA293	40	Miltenyi Biotec
isotype ctrl	human IgG1	PeVio770	REA (s)	REA293	50	Miltenyi Biotec
isotype ctrl	human IgG1	APCVio770	REA (l)	REA293	200	Miltenyi Biotec

## 2.3 Geräte und Software

Tabelle 6: Geräte und Software

Name	Hersteller
FlowJo 10.7	BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Rstudio 2023.06.1	Posit PBC, Massachusetts, USA
R 4.1.0	R Foundation; Wien, Österreich
PipetBoy ACU	Integra, Zizers, Schweiz
Heraeus Multifuge X3R Zentrifuge	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Heraeus Fresco 17 Zentrifuge	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Analyzer Symphony A5/ Fortessa X30 Base	BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Eppendorf Research plus Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
HERAfreeze HFU T-Series -86°C Ultratiefkühlschrank	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Sartorius Analysewaage 1702	Sartorius, Göttingen, Deutschland

## 2.4 Patient\*innen

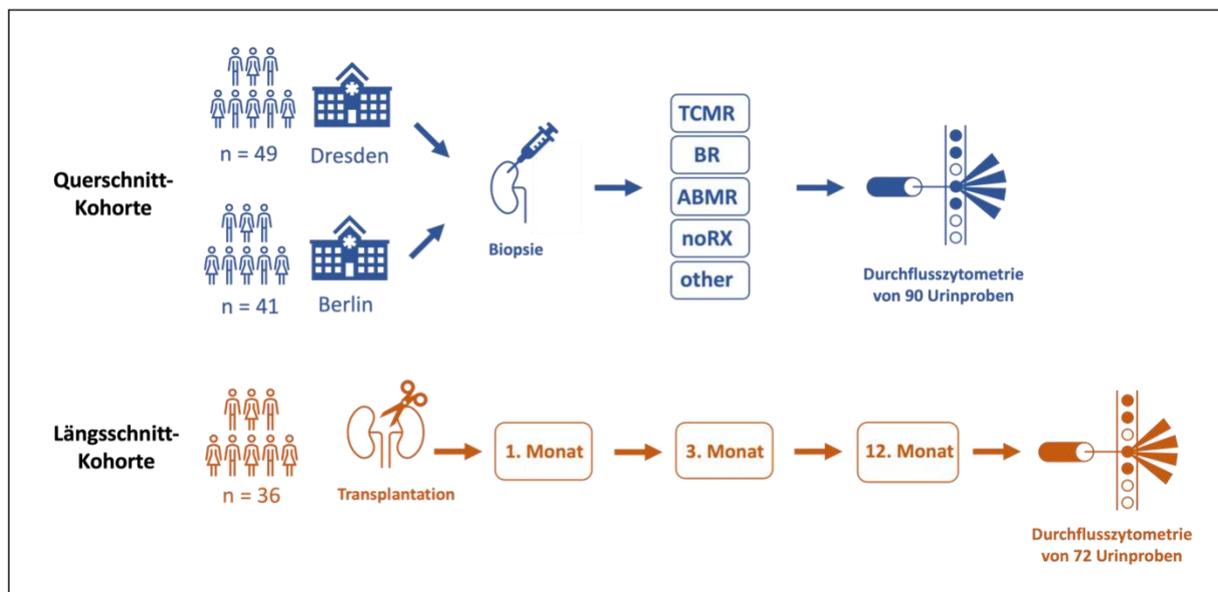


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Kohorten

TCMR = T-Zell-vermittelte Abstoßung; BR = Borderline-Ablehnung; ABMR = Antikörper-vermittelte Abstoßung; noRX = keine Rejektion; other = andere Pathologien. (modifiziert nach Grothgar et al, 2022)<sup>1</sup>

Insgesamt wurden für diese Studie 162 Urinproben von 126 Patient\*innen in einer Quer- und einer Längsschnittkohorte untersucht. Einzelheiten zu den Patientencharakteristika sind in **Tabelle 7** dargestellt. **Abbildung 3** gibt einen Überblick über die Kohorten.

#### **2.4.1 Ethikantrag**

Die Durchführung dieser Studie erfolgte unter Zustimmung der Ethikkommission der Charité (EA1/284/19). Alle Studienteilnehmer\*innen gaben ihre schriftliche Einwilligung zur Durchführung der Studie und späteren Veröffentlichung der Ergebnisse.

#### **2.4.2 Ein- und Ausschlusskriterien**

Vor jeglicher Rekrutierung der Patient\*innen wurden klare Ausschlusskriterien festgelegt. Für diese Studie ausgeschlossen wurden Minderjährige, Personen mit aktueller Menstruation oder Blasenkathetern, Patient\*innen mit offensichtlichen Gründen für die Transplantatverschlechterung wie Harnwegsinfekte oder prärenalem Nierenversagen und Menschen mit immunsuppressiv anbehandelter Transplantatabstoßung.

#### **2.4.3 Querschnittkohorte**

Für eine Querschnittkohorte wurden Patient\*innen mit Verschlechterung der Transplantatfunktion und resultierender Indikation zur Nierenbiopsie eingeschlossen. Im Zeitraum zwischen 2019 und 2021 konnten von 90 Patient\*innen Urinproben gesammelt werden. Davon waren 41 an der Nephrologie der Universitätsklinik Charité Berlin (Campus Charité Mitte und Campus Virchow-Klinikum) und 49 an der Nephrologie der Universitätsklinik Carl Gustav Carus in Dresden, in stationärer Behandlung.

Die Proben wurden innerhalb von 72 Stunden vor der geplanten Nierenbiopsie eingesammelt und im Verlauf mittels Durchflusszytometrie analysiert. Fragestellung an diese Kohorte war die Korrelation von Urinzellsignaturen und den histopathologischen Diagnosen aus der Nierenbiopsie.

#### **2.4.4 Längsschnittkohorte**

Für eine Längsschnittkohorte wurden Patient\*innen während des ersten Jahres nach ihrer Nierentransplantation zu festgelegten Messzeitpunkten mittels Durchflusszytometrie auf Anzeichen einer Abstoßung untersucht. Hierfür wurden Urinproben jeweils einen, drei und zwölf Monate nach der Transplantation im Rahmen von ambulanten Nachsorgeuntersuchungen an der Charité Berlin (Campus Charité Mitte) akquiriert. Aufgrund der COVID-19 Pandemie kam es zu zahlreichen Verschiebungen und Ausfällen der ambulanten Kontrolltermine. Zudem wurden einige Termine telemedizinisch abgehalten. Somit konnten lediglich 9 Patient\*innen die vollen drei Urinproben abgeben. 18 Patient\*innen kamen auf zwei Proben und 9 weitere Studienteilnehmer\*innen konnten lediglich einem Ambulanztermin in Präsenz beiwohnen.

Fragestellung an die Längsschnittkohorte war die Anwendbarkeit des Biomarkers innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation, sowie die mögliche Vorhersage einer Abstoßung.

## 2.4.5 Patient\*innencharakteristika

Tabelle 7: Charakteristik aller Patient\*innen

Charakteristik	TCMR	BR	ABMR	noRX	other	Längsschnitt
Anzahl	17	24	6	20	23	36
Herkunft (BE/DD)	11/6	7/17	4/2	9/11	10/13	36/0
weiblich/ männlich	7/10	12/12	3/3	8/12	8/15	17/19
Alter, Mittelwert (Spw)	71 (53-95)	57 (34-73)	77 (56-95)	56,5 (32-89)	61 (34-86)	57 (32-87)
Tage nach NTX, Median (Spw)	410 (32-4413)	1016 (90-8272)	2640 (49-8490)	391 (92-5415)	1847 (90-6574)	1. Jahr Nachsorge
Lebendspende/ Leichenspende	6/11	8/18	5/1	2/17 (1x unklar)	11/12	11/25
Urinmenge ml (Spw)	55 (27-65)	51 (20-69)	60 (40-75)	51 (35-75)	53 (40-76)	52 (18-70)

Charakteristika zu allen Patient\*innen aus den fünf Erkrankungsgruppen und der Längsschnittkohorte sind aufgeführt. BE = Berlin; DD = Dresden; Spw = Spannweite

## 2.5 Nierenbiopsie

In der Querschnittskohorte wurde die Zellzahl der Urinproben mit dem aktuellen Goldstandard der Abstoßungsdiagnostik verglichen: der Nierenbiopsie. Diese wurden von zertifizierten Nephropatholog\*innen in Berlin (Institut für Pathologie der Charité Universitätsmedizin Berlin) und Erlangen (Nephropathologie Universitätsklinikum Erlangen) nach der Banff Klassifikation von 2017 und 2019 eingeteilt.<sup>23</sup> Anhand dieser Einteilung konnten die Proben der Patient\*innen folgenden Gruppen zugewiesen werden: Patient\*innen mit histologischen Korrelaten für eine akute oder chronische antikörpervermittelte Rejektion wurden der Gruppe *Antibody mediated rejection (ABMR)* zugewiesen. Konnten nach Banff die Kriterien für eine akute zelluläre Abstoßung erfüllt werden, so wurde diese Probe der Gruppe *T cell mediated rejection (TCMR)* zugeordnet. Gab es hingegen Anzeichen für eine zelluläre Abstoßung, ohne dass die Kriterien einer *TCMR* komplett erfüllt waren, erfolgte die Zuordnung zu *borderline rejection (BR)*. Da es ebenfalls durch andere Pathologien zu einer Verschlechterung der Transplantatfunktion kommen konnte, wurden diese histopathologische Befunde in der Gruppe *other*

gesammelt. Dort befanden sich Personen, bei denen es zum Beispiel aufgrund eines Erkrankungsrezidivs oder einer de novo Glomerulonephritis des Transplantats zu einer Verschlechterung der Filtrationsleistung kam. Ließen sich hingegen in der Biopsie weder Anzeichen für eine Rejektion noch für eine andere Erkrankung finden, so wurden diese Patient\*innen der Gruppe *no rejection (noRX)* zugeordnet.

## 2.6 Probengewinnung und -lagerung

Nach der Abgabe von circa 60 ml Mittelstrahlurin in einen herkömmlich sterilen Urinbecher erfolgte innerhalb von sechs Stunden die Fixation der darin vorhandenen Zellen. Dafür wurde ein innerhalb unserer Arbeitsgruppe entwickeltes Verfahren angewendet, welches die Zellen im Urin erfolgreich konservieren kann, ohne negative Auswirkung auf die Durchflusszytometrie zu haben. Grundbestandteile für diese Fixation sind Imidazolidinylharnstoff und 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure.<sup>61</sup> Fixierte Urine konnten bei 4 °C bis zu sechs Tage gelagert werden, ehe sie zentrifugiert (8 min, 600 x g) und bei -80 °C in einer Lösung aus 90 % fetalem Kälberserum (engl.: *fetal calve serum*, FCS) und 10 % Dimethylsulfoxid eingefroren wurden.

## 2.7 Fluoreszenzmarkierung der Zellen

Zur finalen Quantifizierung der Zellzahlen in den Urinproben wurden diese vorsichtig in PBE, einer Lösung aus phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), mit 0,2% bovinem Serumalbumin (BSA) und 2mM Ethylendiamintetraessigsäure (engl.: *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA), aufgetaut und gewaschen. Nach zentrifugieren (5 min, 600 x g) und absaugen des Überstands wurde das zurückgebliebene Zellpellet resuspendiert und über 30 µm *Pre-Separation Filters* (Milteny Biotec) gefiltert. Um eine intrazelluläre Färbung der TEC durchzuführen, erfolgte durch Resuspendieren in *Perm Wash Solution* (BD) eine Permeabilisierung der Zellen. In einem weiteren Schritt wurden die Fc-Rezeptoren (FcR) der Zellen aus der Urinprobe mit *FcR Blocking Reagent* (human, Miltenyi Biotec) für 15min geblockt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Anschließend erfolgte die Zugabe Fluorochrom-gebundener Antikörper

gegen spezifische Zellantigene mit einer Inkubation von 15min auf Eis und unter Lichtausschluss. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen unter Zugabe entsprechender Puffer (PBE oder Perm Wash) gewaschen (600xg, 5min). Die Pellets wurden anschließend in PBE für die Messung am Durchflusszytometer resuspendiert.

## **2.8 Antigene**

Zur Charakterisierung der Urinzellen wurden spezifische Oberflächenmoleküle, sogenannte Unterscheidungsgruppen (engl.: *cluster of differentiation, CD*), sichtbar gemacht und quantifiziert. Eine genaue Liste der verwendeten Antikörper befindet sich in **Tabelle 5**.

### **2.8.1 T-Zell Antigene**

Die Analyse der T-Zellen erfolgte über die Antigene CD3, CD4, CD8, CD28, CD45RO, CCR7 und HLA-DR.

CD3: CD3 ist ein Transmembranprotein aus vier Polypeptidketten und bildet einen Komplex mit dem T-Zell-Rezeptor. Damit spielt dieses Protein eine wichtige Rolle in der Aktivierung von T-Zellen. Dieses Antigen wird von allen T-Zellen exprimiert.

CD4: CD4 ist ein Glykoprotein, welches als Co-Rezeptor zum T-Zell-Rezeptor fungiert und kann MHC der Klasse II auf APCs binden. Das Antigen wird von T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen ausgebildet. CD4 exprimierende T-Zellen werden auch T-Helferzellen genannt.

CD8: Das Oberflächenprotein CD8 arbeitet als T-Zell-Co-Rezeptor für die Erkennung von MHC der Klasse I. Das Protein lässt sich auf natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), zytotoxischen T-Zellen und dendritischen Zellen nachweisen.

CD28: CD28 findet sich auf T-Zellen und Plasmazellen. Das Membranprotein bindet CD80 und CD86 der APCs und ist damit als Co-Stimulator an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt.

CD45RO: Das Antigen CD45RO ist die kurze Isoform der Rezeptor-Typ Tyrosin-Proteinphosphatase C (PTPRC, synonym CD45). Über diesen Marker werden Gedächtnis-T-Zellen und Effektor-T-Zellen erkannt. Naive T-Zellen exprimieren an Stelle von CD45RO die längere Isoform CD45RA.

CCR7: Der C-C Chemokin-Rezeptor Typ 7 (CCR7, synonym CD197) ist ein G-Proteingekoppelter Rezeptor und wird von den CC-Chemokinen CCL19 und CCL21 gebunden. Wird CCR7 von Chemokinen gebunden, so erfolgt eine Aktivierung von B- und T-Zellen mit resultierender Wanderbewegung in sekundär lymphatische Gewebe. Dendritische Zellen exprimieren das Antigen ebenfalls.

HLA-DR: Unter den humanen Leukozytenantigenen (HLA) versteht man eine Gruppe von individuellen Antigenen, welche dem Immunsystem bei der Erkennung von selbst und fremd helfen. Dieses HLA-System wird auch als Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. Major Histocompatibility Complex, MHC) bezeichnet. Der Isotyp DR (HLA-DR) gehört zu MHC Klasse II und wird von APCs (Makrophagen, dendritische Zellen, B-Zellen) verwendet, um fremde Proteine an den T-Zell-Rezeptor zu präsentieren. Zudem zeigt HLA-DR auf T-Zellen eine Aktivierung dieser Zellen an.<sup>62</sup>

Basierend auf den Markern CCR7 und CD45RO können die T-Zellen in vier Subpopulationen eingeteilt werden. Naive T-Zellen (TNV) sind CCR7+CD45RO-. Gedächtnis-T-Zellen hingegen exprimieren CD45RO. Sie lassen sich über die Expression von CCR7 nochmals in Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (engl.: *effector memory T cells*, TEM, CCR7-CD45RO+) und zentrale Gedächtnis-T-Zellen (engl.: *central memory T cells*, TCM, CCR7+ CD45RO+) unterteilen. Zuletzt werden noch Effektor-Gedächtnis-Zellen die CD45RA reexprimieren durch CCR7-CD45RO- charakterisiert (engl.: *effector memory re-expressing CD45RA*, TEMRA).<sup>63</sup> Ein Überblick der Populationen lässt sich der **Abbildung 4 A5** entnehmen.

## 2.8.2 TEC-Antigene

Zur Untersuchung der TEC war neben einer Färbung der Oberflächenmoleküle CD10, CD13, CD227 und CD326, auch eine intrazelluläre Markierung der Strukturproteine *Zytokeratin* und *Vimentin* notwendig.

CD10: Bei der membrangebundenen Metalloprotease Neprilysin (synonym CD10) handelt es sich um ein Enzym, welches in einer Vielzahl von Immunzellen und Geweben exprimiert wird. Dieses Enzym findet sich vor allem in Zellen der Niere, wie den proximalen TEC.<sup>64</sup>

CD13: Die Alanin-Amino-peptidase (synonym CD13) hydrolysiert unterschiedliche Peptide und wird unter anderem von Epithelzellen der Niere gebildet.

CD227: Das Glykoprotein Mucin-1 (synonym CD227) befindet sich an der Zelloberfläche von distalen TEC und bildet Mucin zum Schutz vor Pathogenen.

CD326: CD326 (synonym EpCAM) ist ein transmembranes Glykoprotein, welches Epithelzellen der Zelladhäsion dient. Es kann ebenfalls auf entarteten Zellen nachgewiesen werden.

Zytokeratin: Zytokeratine sind Intermediärfilamente des Zytoskeletts von Epithelzellen und befinden sich intrazellulär.

Vimentin: Das Intermediärfilament Vimentin befindet sich im Zytoskelett von Zellen mesenchymalen Ursprungs. Damit sollte es in Epithelzelle nicht nachweisbar sein.

Da die Autofluoreszenz eine Herausforderung der Urin- Durchflusszytometrie darstellen kann, wurden stets Isotyp-Kontrollen mitgeführt (siehe **Abbildung 4: A5, A6, B2 und B3**). Dadurch ließ sich eine unspezifische Fluoreszenz von den Signalen der gefärbten Oberflächenmoleküle unterscheiden.

## 2.9 Messung und Auswertung

Die Analyse der Proben erfolgte im Anschluss an die Antikörper-Inkubation mittels Durchflusszytometrie an einem *FACSymphony™ A5 Cell Analyzer* (BD). Innerhalb dieses Durchflusszytometers wird ein feiner Flüssigkeitsstrom erzeugt, welcher die Zellen einzeln in einer Röhre an verschiedenen Lasern vorbeileitet. Während der Passage erzeugt jede Zelle ein Streulicht und ein Fluoreszenzsignal. Diese Informationen werden von Detektoren verarbeitet. Über das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) kann ein Rückschluss auf die Größe einer Zelle getroffen werden. Das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) entsteht durch Brechung des Lichts im rechten Winkel zum Laserstrahl. Je stärker die Granularität einer Zelle, desto stärker wird das Licht in diesem Winkel gebrochen. Die gewonnenen Informationen werden als zweidimensionale Streudiagramme dargestellt, welche bereits eine Unterteilung der Immunzellen erlauben. Während Lymphozyten klein sind und kaum Granularität besitzen, sind Granulozyten, wie ihr Name erahnen lässt, stark granulär und größer. Sie haben im FSC und SSC-Kanal ein stärkeres Signal, wodurch ihre Population an einer anderen Stelle im Streudiagramm liegt als die der Lymphozyten.

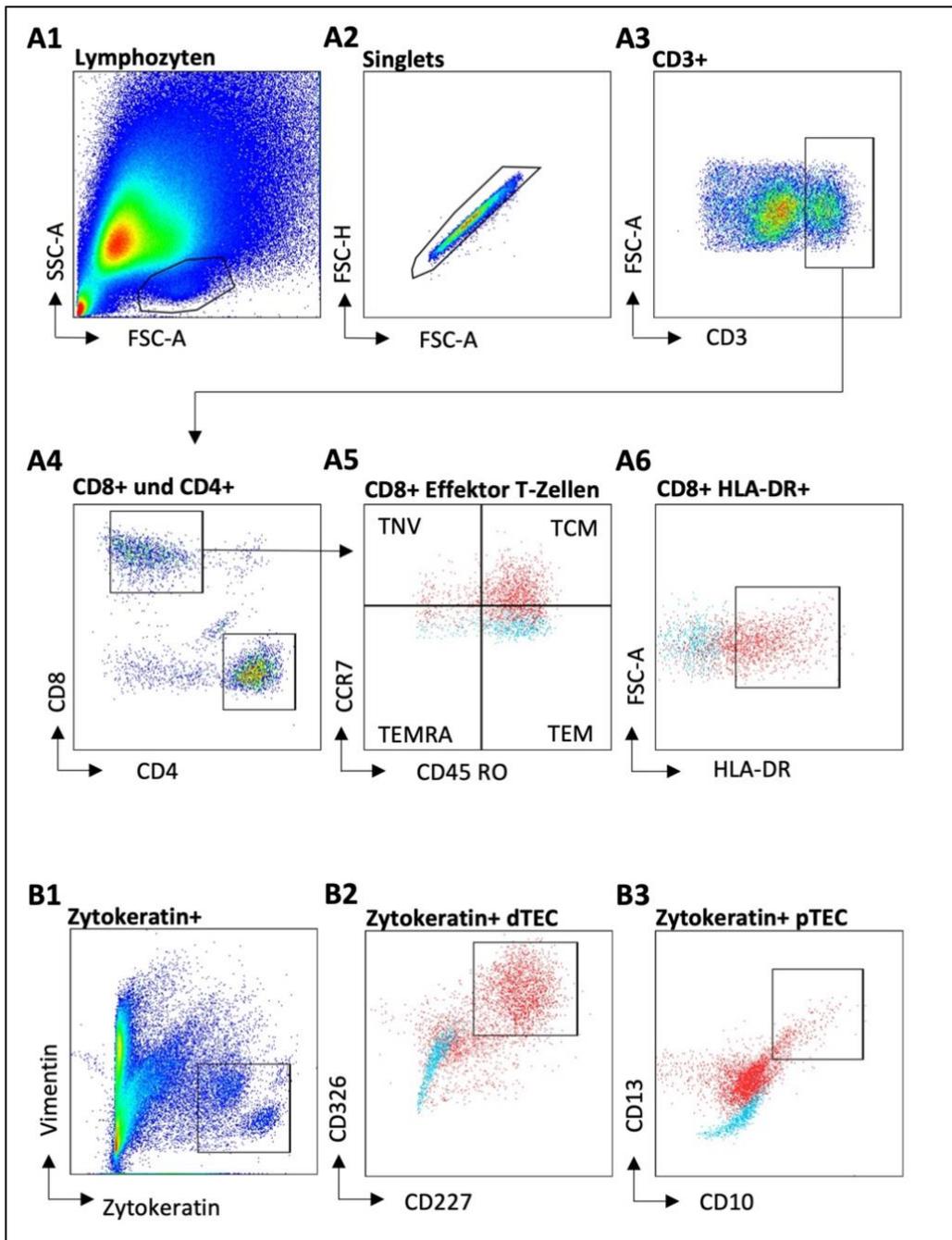
Die bereits mit Fluorochromen verknüpften Antikörper binden spezifisch an dazugehörige Oberflächenmoleküle. Jedes Oberflächenmolekül, welches nun von einem Antikörper gebunden wurde, kann im Durchflusszytometer durch einen anregenden Laser über sein Fluorochrom sichtbar gemacht werden. Das ist möglich, indem die angeregten Fluorochrome Licht in einer bestimmten Wellenlänge emittieren, welches von einem Detektor verarbeitet wird. In modernen Durchflusszytometern lassen sich mittlerweile viele unterschiedliche Oberflächenmoleküle gleichzeitig untersuchen. Für dieses Prinzip werden mehrere Laser in Reihe geschaltet. Zudem wird das emittierte Licht der Fluorochrome über Filter auf unterschiedliche Detektoren verteilt. Jeder Detektor erzeugt daraufhin einen Signalkanal, welcher sich auf eine Achse der zweidimensionalen Streudiagramme legen lässt.<sup>65</sup>

Werden in einem Durchflusszytometer nun Zellen gemessen, welche ein bestimmtes Oberflächenmolekül stark ausgeprägt haben und von ihrem passenden Antikörper mit Fluorochrom gebunden wurden, dann erzeugen diese Zellen im Kanal, der zur Wellenlänge des emittierten Lichts des Fluorochroms passt, ein starkes Signal. Grafisch

würden diese Zellen als Punkte weiter oben auf der Skala angezeigt. Wird das Durchflusszytometer hingegen von Zellen durchwandert, welche dieses Oberflächenmolekül nicht besitzen, so werden diese Zellen im gleichen Kanal nahe dem Nullpunkt der Skala angezeigt.

Für diese Arbeit wurde die Software *FlowJo 10.7* (BD Biosciences) zur Auswertung angewendet. Über das oben beschriebene Prinzip ist es möglich mittels sogenanntem „Fenstern“ (engl.: *gating*) Populationen innerhalb eines Streugitters zu definieren und diese zu quantifizieren. Über immer tiefere Selektion der Zellen entstehen Stammbäume. Da stets alle Zellen aus einer Urinprobe analysiert wurden und das Volumen der Urinprobe vorher bekannt war, konnte die Zellzahl auf 100 ml Urin hochgerechnet werden. Somit war es möglich die Zellzahl der einzelnen Populationen unter den jeweiligen Proben untereinander zu vergleichen.

**Abbildung 4 A1-6** zeigt die Gating-Strategie für Urin-T-Zellen. In einem ersten Schritt wurden anhand von Granularität (SSC-A) und Größe (FSC-A) die Lymphozyten lokalisiert. Diese wurden in einem nächsten Schritt um zusammenklebende Zellen (Dubletten) bereinigt. Die zurückgebliebenen Zellen wurde auf das Expressieren des Oberflächenmarkers CD3 untersucht. Alle Zellen mit Nachweis für CD3, wurden daraufhin auf die Marker CD4 und CD8 untersucht. Entstandene Subpopulationen wurden anschließend auf weitere Marker (CCR7, CD45RO, HLA-DR und CD28) untersucht. Die Analyse der TEC ist in **Abbildung 4 B1-3** dargestellt. Zuerst wurden die Zellen mit Signal für Zytokeratin selektiert. Diese wurden anschließen jeweils auf Marker distaler TEC (CD227, CD326) und Marker proximaler TEC (CD10, CD13) untersucht. Die hellblauen Zellpopulationen in **Abbildung 4 A5, A6, B2 und B3** stellen Isotypkontrollen dar. Die roten Populationen sind die Proben mit der auszuwertenden Antikörpermarkierung.



**Abbildung 4: Gating-Strategie**

T-Zell- (A) und TEC-Gating (B) schrittweise dargestellt. Isotypkontrollen in hellblau stehen vollen Färbungen in rot gegenüber. SSC = side scatter; FSC = forward scatter; TNV = naïve T-Zellen; TEM = Effektor-T-Gedächtnis-Zellen; TCM = zentrale T-Gedächtnis-Zellen; TEMRA = T-Zellen mit CD45RA-Re-Expression. (modifiziert nach Grothgar et al, 2022)<sup>1</sup>

## 2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der erhobenen Datensätze erfolgten mittels *R* (Version 4.1.0). Um auf signifikante Unterschiede der Zellzahlen

zwischen einzelnen Gruppen zu testen, wurde der nichtparametrische Rangtest nach Mann-Whitney angewendet. Hierfür wurden p-Werte  $< 0.5$  als signifikant angesehen. Zur genaueren Analyse der diagnostischen Vorhersagekraft spezifischer Zell-Subgruppen wurden Receiver-Operating-Characteristic (ROC)-Kurven mit dazugehöriger Fläche unter der Kurve (engl.: *area under the curve*, AUC) errechnet.

Für die Analyse der drei abhängigen Stichproben aus der Longitudinalkohorte, wurde der nicht-parametrische Friedman-Test verwendet.

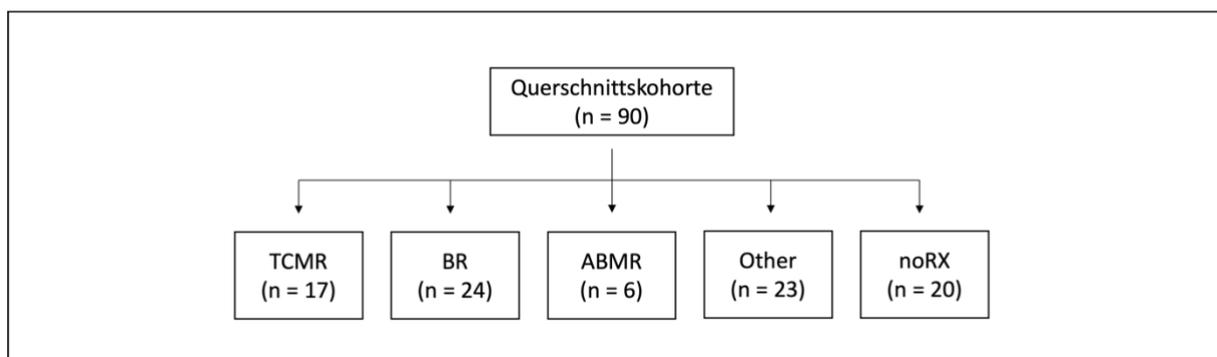
Da es sich bei dieser Arbeit um einen explorativen Ansatz handelt, wurde, außer für den Friedman-Test, auf eine Bonferroni-Korrektur für multiples Testen verzichtet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Biopsie-Ergebnisse

Um die quantitativen Unterschiede von T-Zellen und TEC im Urin von Nierentransplantierten mit Verdacht auf eine Abstoßung vergleichen zu können, wurden die Patient\*innen in fünf unterschiedliche Gruppen eingeteilt. Grundlage für diese Einteilung war die histopathologische Diagnose der Nierenbiopsie.

Von den Proben dieser Querschnittskohorte wurden 17 Patient\*innen mit *TCMR* diagnostiziert, 24 Patient\*innen mit *BR*, 6 Patient\*innen mit *ABMR*, 20 Patient\*innen mit *noRX* und 23 Patient\*innen präsentierten sich mit einer Biopsie, die andere Pathologien zeigte (*other*).



**Abbildung 5: Biopsie-Ergebnisse der Querschnittskohorte**

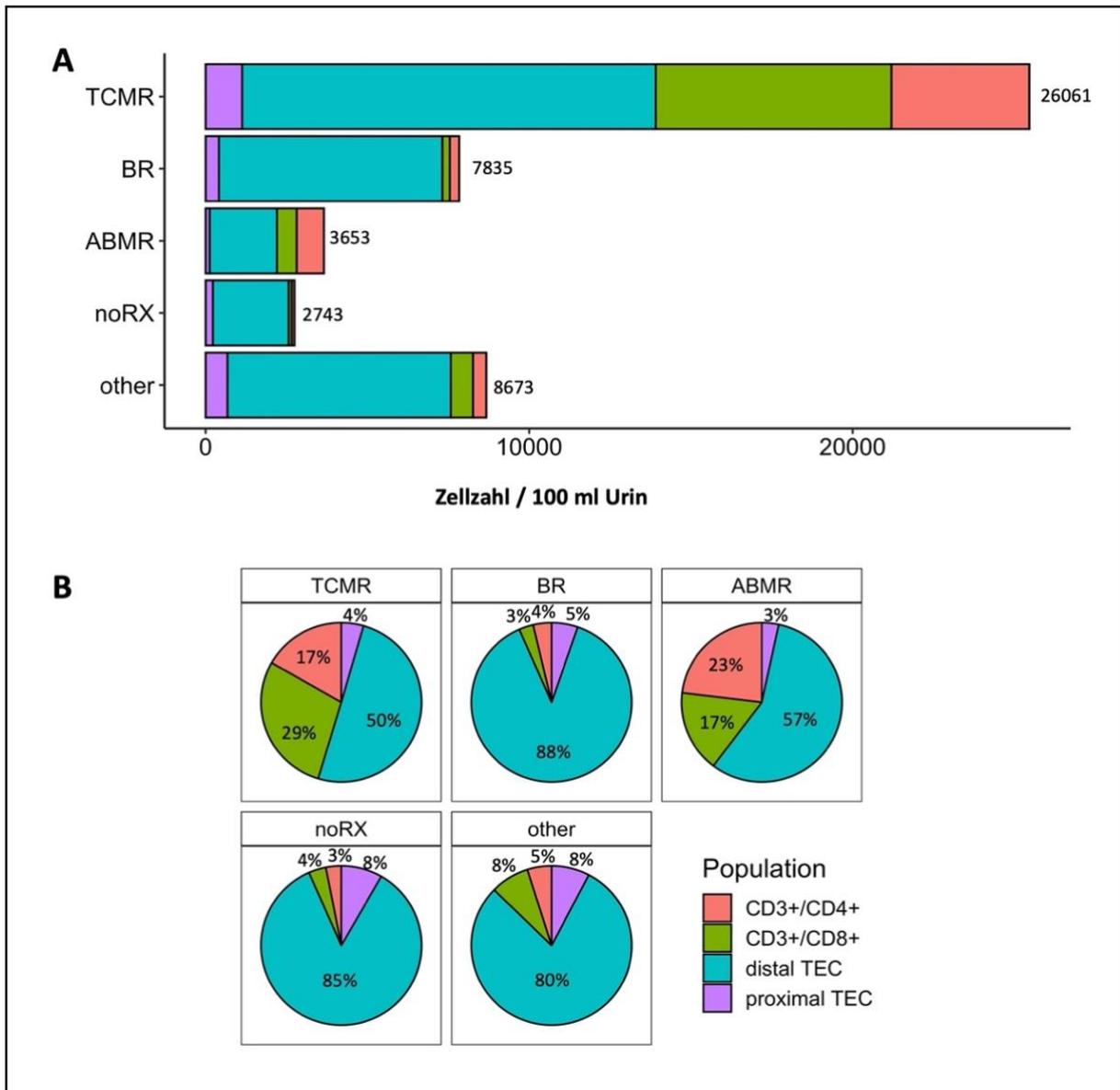
*TCMR* = T-Zell-vermittelte Abstoßung; *BR* = Borderline-Ablehnung; *ABMR* = Antikörper-vermittelte Abstoßung; *noRX* = keine Rejektion; *other* = andere Pathologien

#### 3.2 Nierentransplantierte präsentieren sich mit unterschiedlichen Verteilungsmustern der Zellpopulationen im Urin

Der Stack-Plot aus **Abbildung 6A** zeigt, dass sich die durchschnittliche Gesamtzellzahl zwischen den einzelnen Gruppen unterscheidet.

Wurde in der Biopsie eine *TCMR* diagnostiziert, lagen die meisten Zellen pro 100 ml Urin vor (Mittelwert: 26.061 Zellen / 100 ml Urin). Hingegen zeigten Patient\*innen ohne eine Abstoßungsreaktion die geringste absolute Zellzahl pro 100 ml Urin (Mittelwert: 2.743 Zellen / 100 ml Urin). Die Diagnose *ABMR* präsentierte sich ebenfalls mit einer geringen

absoluten Zellzahl (Mittelwert: 3.653 Zellen / 100 ml Urin). Die Gruppen *BR* und *other* lagen bei den absoluten Zellzahlen im Mittelfeld (Mittelwert *BR*: 7.835 Zellen / 100 ml Urin; Mittelwert *other*: 8.673 Zellen / 100 ml Urin).



**Abbildung 6: Verteilungsmuster der Urinzellen bei Querschnittskohorte**

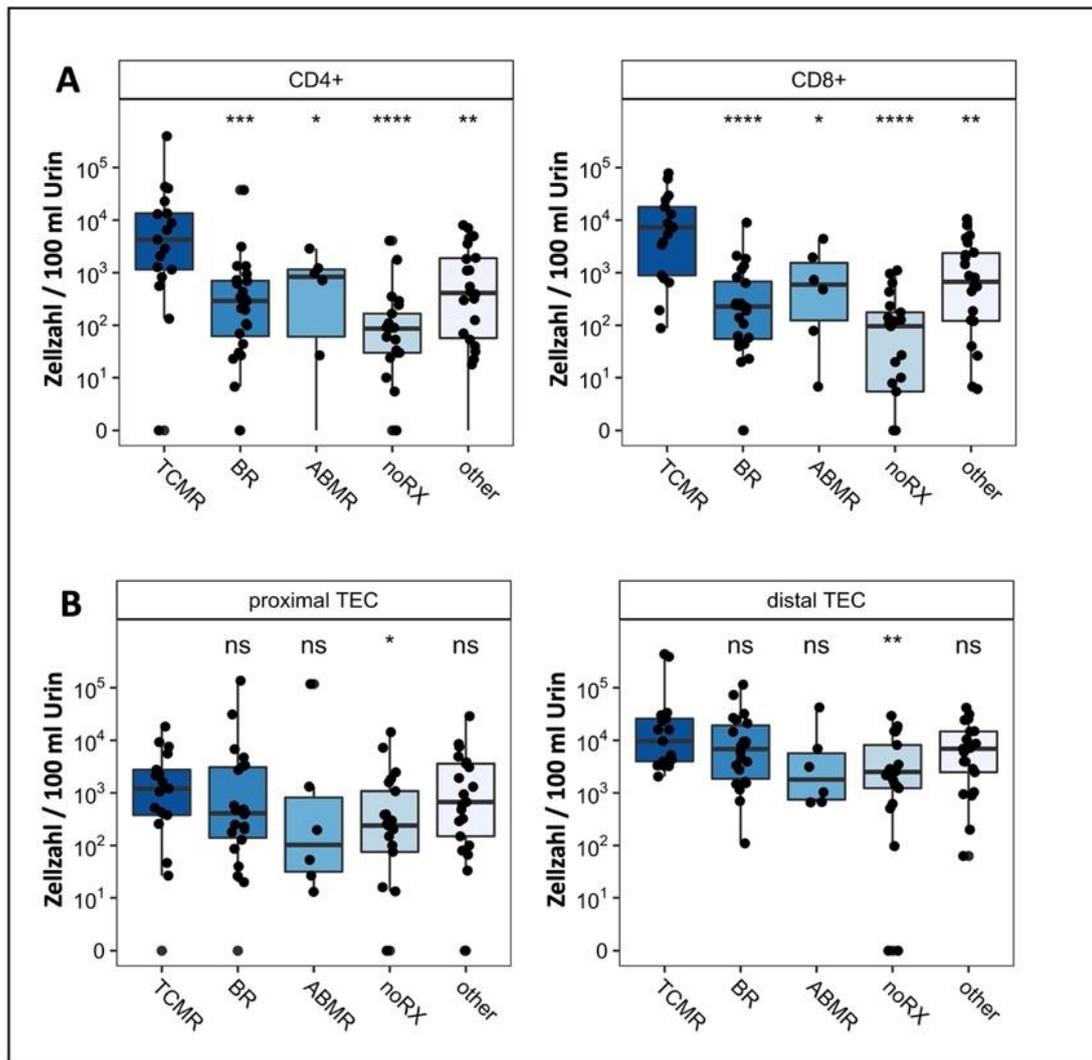
Durch Durchflusszytometrie aufgezeichnete absolute Zellzahlen bei Patienten, die sich aufgrund einer Transplantatverschlechterung einer Nierenbiopsie unterzogen. (A) Stack-Plot für Populations-Anteile. Jeder Stapel veranschaulicht die mittlere absolute Zellzahl pro Population in jeder Gruppe. (B) Kuchendiagramme, welche die Zusammensetzung von Urin-Zellen pro Gruppe darstellen. TCMR = T-Zell-vermittelte Abstoßung; BR = Borderline-Rejektion; ABMR = Antikörper-vermittelte Abstoßung; noRX = keine Rejektion; other = andere Pathologien; TEC = Tubulusepithelzellen. (modifiziert nach Grothgar et al, 2022)<sup>1</sup>

Die dargestellten Kuchendiagramme verdeutlichen, dass die fünf Gruppen ebenfalls eine unterschiedliche Zusammensetzung der Zellen im Urin besitzen (**Abb. 6B**). Während die Urinproben der Proband\*innen aus den Gruppen *BR*, *other* und *noRX* einen geringen Anteil an T-Zellen enthielten (kumulativer Anteil der CD4+ und CD8+: *BR* = 7%, *other* = 13%, *noRX* 7%), wiesen die Gruppen *TCMR* und *ABMR* einen erhöhten Anteil an T-Zellen auf (kumulativer Anteil der CD4+ und CD8+: *TCMR* = 46%; *ABMR* = 40%). Der Anteil an T-Zellen bei Patient\*innen mit *TCMR* hatte ein Übergewicht an CD8+ T-Zellen (CD4+ vs. CD8+: 17% vs. 29%). Die Gruppe *ABMR* hatte hingegen mehr CD4+ T-Zellen als CD8+ T-Zellen (CD4+ vs. CD8+: 23% vs. 17%). Die im Urin quantifizierten Zellen von Patient\*innen mit *BR*, *other* oder *noRX* wurden größtenteils als distale TEC charakterisiert (*BR* = 88%, *other* = 80%, *noRX* = 85%). Die proximalen TEC unterschieden sich in ihrem Anteil unter den Gruppen nur gering (3-8 %).

### **3.3 T-Zell-Populationen unterscheiden sich signifikant in Nierentransplantierten mit Abstoßungsreaktion**

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob sich durch einzelne Zellpopulationen aus dem Urin Patient\*innen mit Abstoßungsreaktionen identifizieren ließen. Die Boxplots in **Abbildung 7A** zeigen, dass Patient\*innen mit *TCMR* signifikant mehr CD8+ T-Zellen im Urin hatten als Patient\*innen der anderen vier Gruppen (*TCMR* vs. *BR*:  $p = 0.000019$ ; *TCMR* vs. *ABMR*:  $p = 0.0158$ ; *TCMR* vs. *noRX*:  $p = 0.0000045$ , *TCMR* vs. *other*:  $p = 0.0021$ ). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich beim Vergleich der CD4+ T-Zellen (*TCMR* vs. *BR*:  $p = 0.00039$ ; *TCMR* vs. *ABMR*:  $p = 0.04226$ ; *TCMR* vs. *noRX*:  $p = 0.000003$ ; *TCMR* vs. *other*:  $p = 0.00353$ ).

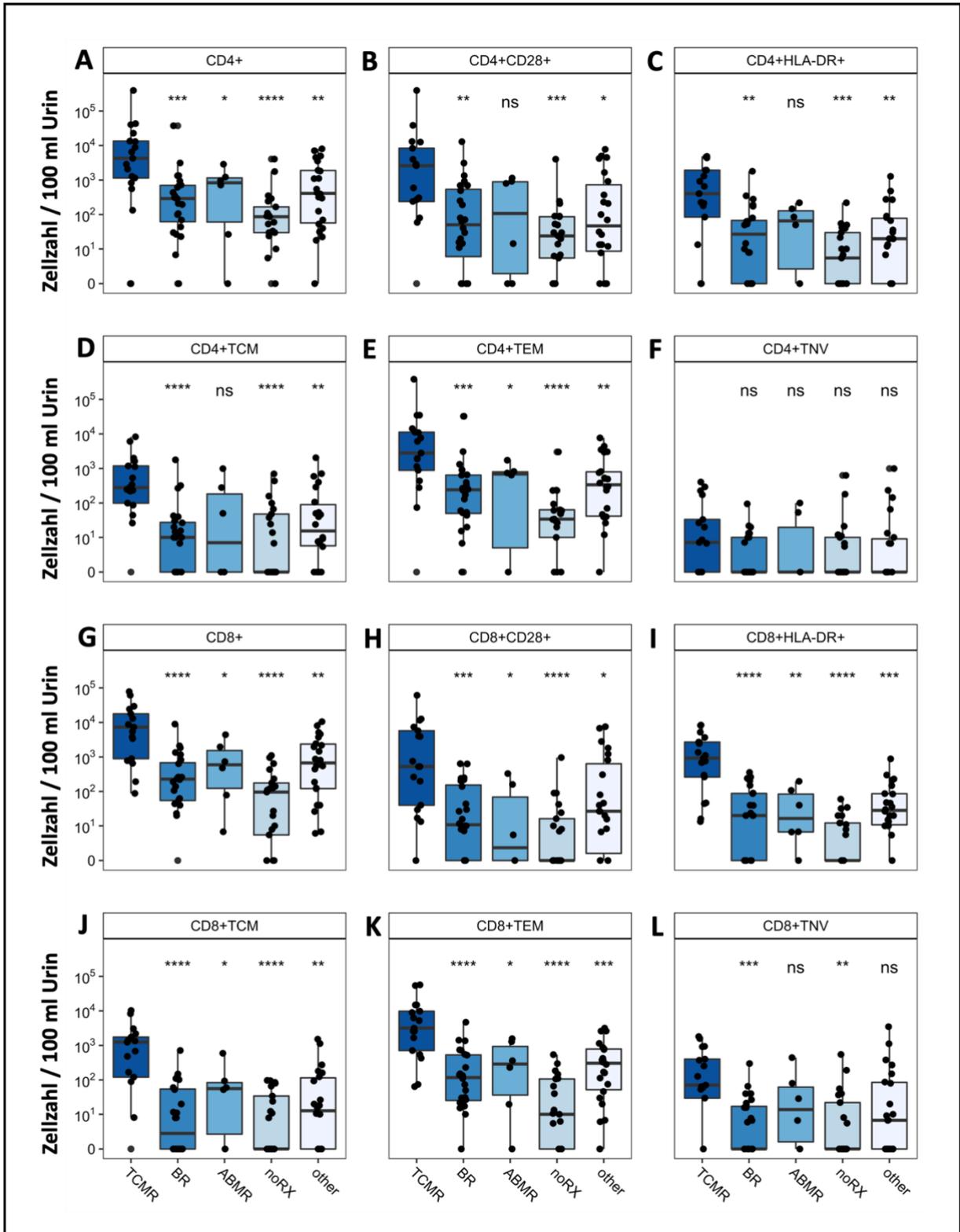
Vergleicht man die absoluten Zellzahlen der proximalen TEC zwischen den Gruppen so ließen sich nur *noRX* mit signifikant weniger proximalen TEC von der Biopsie-Gruppe *TCMR* trennen ( $p = 0.041$ ). Die Analyse der distalen TEC kam zu einem ähnlichen Ergebnis (*TCMR* vs. *noRX*:  $p = 0.0015$ ). Weder proximale TEC noch distale TEC zeigten bei *BR*, *other* und *ABMR* einen signifikanten quantitativen Unterschied zu *TCMR* (**Abb. 7B**).



**Abbildung 7: Boxplots für Zellzahlen von T-Zellen und TEC in Biopsie-Gruppen**  
 (A) CD4+ und CD8+-T-Zellzahlen pro 100 ml Urin, gezeigt für verschiedene Biopsie-Gruppen. (B) Proximale und distale TEC pro 100 ml Urin, gezeigt für verschiedene Biopsie-Gruppen. Signifikanzniveaus weisen auf einen Vergleich mit TCMR hin; ns = nicht signifikant; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (modifiziert nach Grothgar et al, 2022)<sup>1</sup>

### 3.4 CD8+ T-Zellen eignen sich zur Vorhersage einer TCMR

Wie bereits dargelegt, präsentierten sich die einzelnen Erkrankungsgruppen innerhalb der Querschnittskohorte mit unterschiedlichen Verteilungsmustern der Zellen im Urin. Abschnitt 3.3 legte zudem dar, dass die T-Zellen ein großes Potential besitzen, um Nierentransplantierte mit zellulärer Abstoßung zu identifizieren. Daher wurde in einer Folgeanalyse nach einem Subtyp der T-Zellen gesucht, mit welchem sich die Abstoßungsreaktion noch präziser detektieren ließ.



**Abbildung 8: Tiefe Phänotypisierung der T-Zell-Populationen**

Unterschiedliche T-Zell-Phänotypen diskriminieren die Biopsie-Gruppen der Querschnittkohorte. Signifikanzniveaus weisen auf einen Vergleich mit TCMR hin. TNV = naive T-Zellen; TEM = Effektor-T-Gedächtnis-Zellen; TCM = zentrale T-Gedächtnis-Zellen; ns = nicht signifikant; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . (modifiziert nach Grothgar et al, 2022)<sup>1</sup>

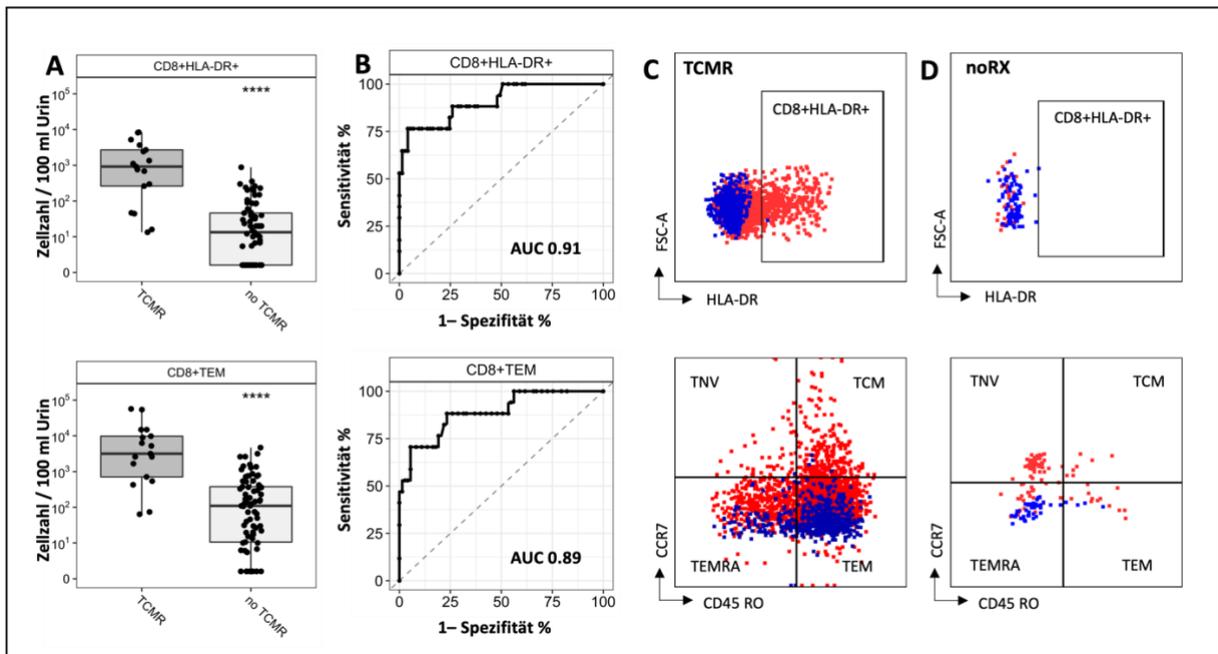
Da CD8+ T-Zellen in jedem Vergleich besser abschnitten als CD4+ T-Zellen, soll aus Übersichtsgründen der Fokus der Ergebnispräsentation auf dieser Subpopulation liegen. Nichtsdestotrotz sind alle charakterisierten Zelltypen in **Abbildung 8** dargestellt.

Die CD8+ TEM konnten Patient\*innen mit einer *TCMR* von anderen Patient\*innen unterscheiden (*TCMR* vs. *BR*:  $p = 0.0000043$ ; *TCMR* vs. *ABMR*:  $p = 0.01058$ ; *TCMR* vs. *noRX*:  $p = 0.00000014$ , *TCMR* vs. *other*:  $p = 0.00042$ ). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich für CD8+ TCM (*TCMR* vs. *BR*:  $p = 0.0000076$ ; *TCMR* vs. *ABMR*:  $p = 0.027$ ; *TCMR* vs. *noRX*:  $p = 0.0000046$ , *TCMR* vs. *other*:  $p = 0.0014$ ). CD8+ TNV erwiesen sich als weniger hilfreich um Abstoßungen zu detektieren (*TCMR* vs. *BR*:  $p = 0.00094$ ; *TCMR* vs. *ABMR*:  $p = 0.244$ ; *TCMR* vs. *noRX*:  $p = 0.019$ , *TCMR* vs. *other*:  $p = 0.066$ ). Alle T-Zellen wurden zudem auf die Aktivierungsmarker CD28 und HLA-DR untersucht. Die CD8+HLA-DR+ T-Zellen in **Abbildung 8I** erreichten die beste Trennung der einzelnen Gruppen zu *TCMR* (*TCMR* vs. *BR*:  $p = 0.0000016$ ; *TCMR* vs. *ABMR*:  $p = 0.0025$ ; *TCMR* vs. *noRX*:  $p = 0.000000074$ , *TCMR* vs. *other*:  $p = 0.00015$ ).

### 3.5 CD8+HLA-DR+ T-Zellen und CD8+ TEM stellen vielversprechenden Biomarker dar

Unter den Subtypen gelang es den CD8+ TEM und den CD8+HLA-DR+ T-Zellen die Biopsie-Gruppe *TCMR* am deutlichsten von allen anderen Gruppen zu trennen. Da das primäre Ziel auf der Vorhersage einer *TCMR* lag, wurden die Gruppen *BR*, *ABMR*, *noRX* und *others* zu *noTCMR* zusammengefasst. **Abbildung 9** zeigt, dass die Anzahl der CD8+HLA-DR+ T-Zellen / 100 ml Urin in der Gruppe *TCMR* signifikant höher war als in der Gruppe *noTCMR* (*noTCMR* = *BR*+*ABMR*+*noRX*+*others*;  $n=73$ , *TCMR* vs. *noTCMR*:  $p = 0.000000014$ ). TEM konnten die Gruppen ähnlich gut unterscheiden ( $p = 0.000000071$ ).

Um das diagnostische Potential dieses potenziellen Biomarkers zur Vorhersage einer *TCMR* zu erörtern, wurde eine ROC-Kurve errechnet. Die daraus abgeleitete AUC für CD8+ TEM und CD8+HLA-DR+ T-Zellen zur Vorhersage einer *TCMR* unter allen Patient\*innen der Kohorte lag jeweils bei 0.89 und 0.91. Da HLA-DR+ sich als bester Biomarker erwies, wurde für ihn ein optimaler Cut-Off Wert zur Diskriminierung zwischen *TCMR* und *noTCMR* mit einer Spezifität von 95.89 % und einer Sensitivität von 76.47 % bei 263 Zellen / 100 ml Urin identifiziert.



**Abbildung 9: Diagnostische Leistung der T-Zell Subtypen HLA-DR und TEM**

(A) Boxplots mit absoluten Zellzahlen für die zwei Subtypen beim Vergleich von TCMR vs noTCMR. (B) ROC-Kurven der potenziellen Biomarker. Repräsentative Streudiagramme der Auswertung einer Probe mit TCMR (C) und noRX (D). Die blaue Wolke repräsentiert die Isotypkontrolle, während die rote Wolke die volle Färbung der Zellen abbildet. TNV = naive T-Zellen; TEM = Effektor-T-Gedächtnis-Zellen; TCM = zentrale T-Gedächtnis-Zellen; TEMRA = T-Zellen mit CD45RA-Re-Expression. TCMR = T-Zell vermittelte Abstoßung, noRX = keine Abstoßung.; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . (modifiziert nach Grothgar et al, 2022)<sup>1</sup>

### 3.6 CD8+HLA-DR+ Zellen im Urin fallen bei frisch Transplantierten im ersten Jahr unter Cut-Off für TCMR

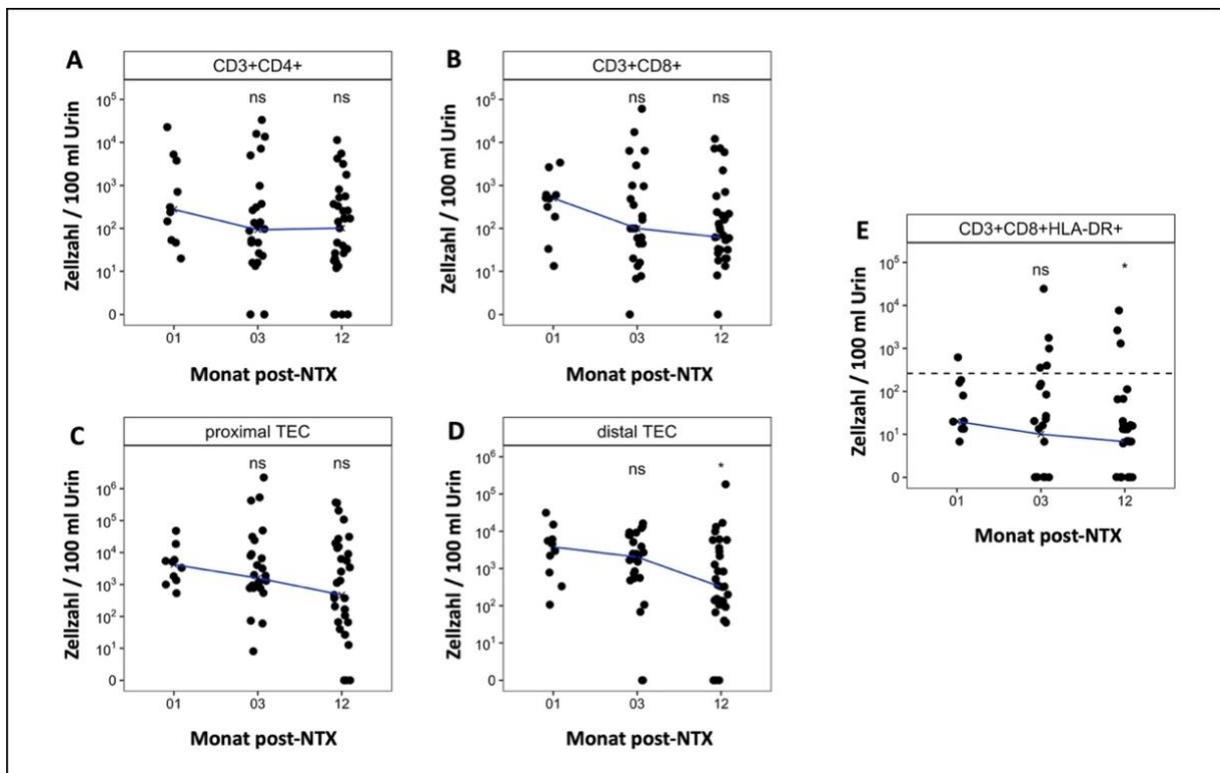
Die initiale postoperative Phase nach Transplantation wirkt sich durch schwankende Immunsuppression, Infekte und Komplikationen im ableitenden Harnsystem auf die Urinzellsignatur aus. Um herauszufinden, ab wann eine belastbare Aussage über eine TCMR mittels Urin-Durchflusszytometrie getroffen werden kann, wurde ebenfalls eine Kohorte von frisch Nierentransplantierten innerhalb des ersten Jahres untersucht. Dafür wurde der Urin dieser Patient\*innen zu festen Messzeitpunkten analysiert.

Es wurden drei Messzeitpunkte nach NTX festgelegt:

- 1.: einen Monat nach NTX mit 9 erfolgten Proben
- 2.: drei Monate nach NTX mit 27 erfolgten Proben
- 3.: zwölf Monate nach NTX mit 36 erfolgten Proben

Innerhalb der Langzeitkohorte wurde nur eine Abstoßungsreaktion beobachtet. Von einem Vergleich der Zellquantitäten zwischen Patient\*innen mit stabiler Transplantatfunktion und solchen mit Rejektion wurde aufgrund der geringen Rejektionszahl abgesehen. Die Kohorte wurde nach Ausschluss des Rejektions-Falls als Kollektiv mit stabiler Transplantatfunktion angesehen.

Diese war definiert worden als Gruppe mit stabilem Serumkreatinin (Schwankungen < 25%) oder Kreatinin-Abfall im Rahmen der ambulanten Nachsorge. Zudem durfte es nicht zu einer stationären Aufnahme durch nephrologische oder transplantatverwandte Ursachen gekommen sein.



**Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf der Zellzahlen bei stabilen Nierentransplantierten**

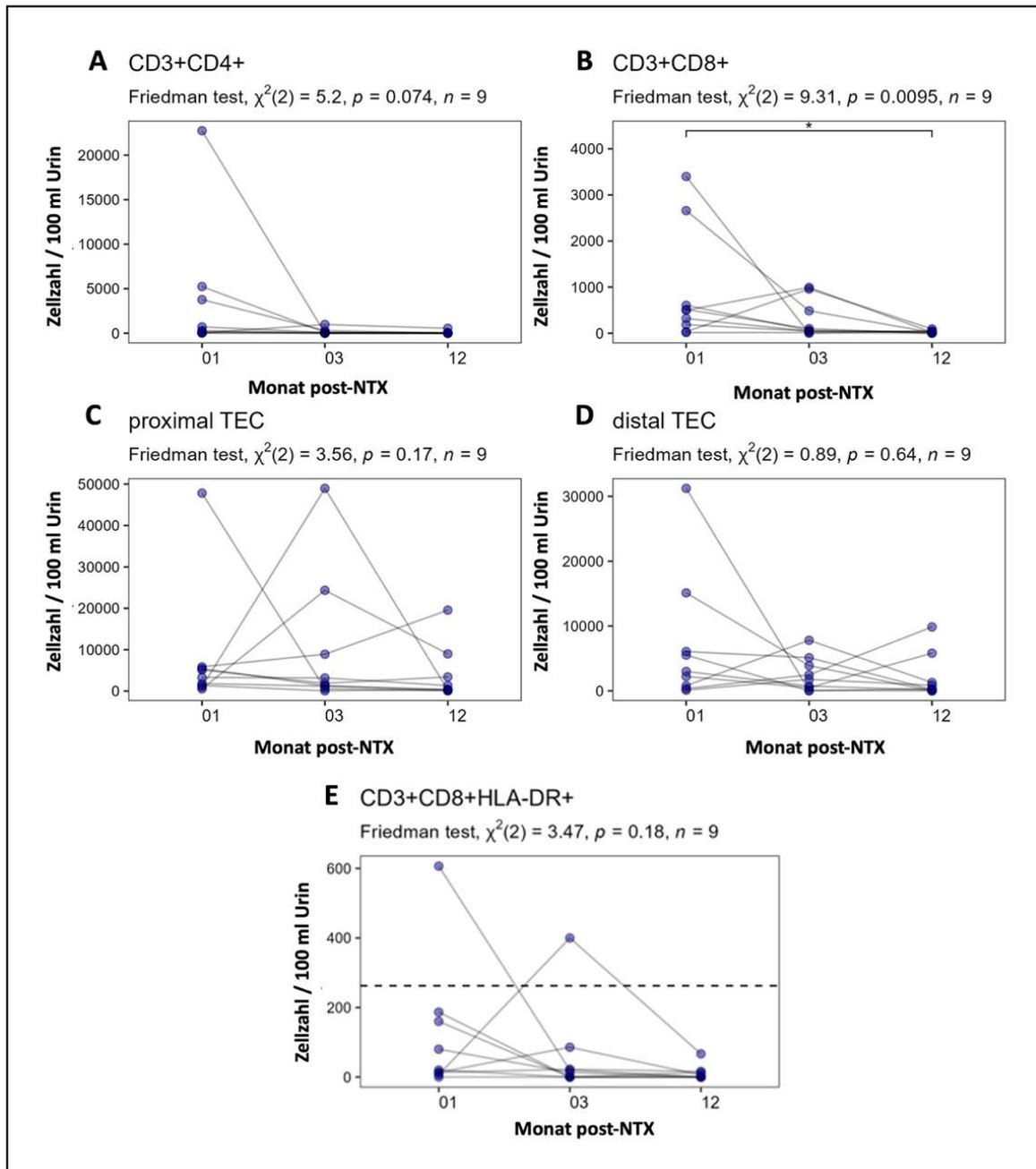
Zellzahl über die ersten 12 Monate nach Transplantation. Mediane pro Messzeitpunkt sind jeweils mit blauer Linie verbunden. (E) Cut-off für Biomarker als schwarze gestrichelte Linie dargestellt. NTX= Nierentransplantation; TEC = Tubulusepithelzelle; ns = nicht signifikant; \*  $p < 0,05$  (modifiziert nach Grothgar et al, 2022)<sup>1</sup>

In **Abbildung 10** sind die zeitlichen Verläufe der Zellpopulationen über die drei Messzeitpunkte dargestellt. Die Anzahl der Messungen pro Zeitpunkt variiert. Die mediane Zellzahl pro Messzeitpunkt ist als Linie dargestellt. Ein signifikanter Rückgang der CD8+HLA-DR+ T-Zellen bei stabilen Nierentransplantierten ließ sich nach zwölf

Monaten zeigen ( $p = 0.027$ ) und ist in **Abbildung 10E** dargestellt. Die absolute Zellzahl der distalen TEC / 100 ml Urin war ebenfalls nach zwölf Monaten signifikant gesunken (**Abb. 10D**;  $p = 0.032$ ). Die tendenzielle Abnahme der absoluten Zellzahl in den weiteren Verlaufsmessungen war statistisch nicht signifikant.

Unter Anwendung des definierten Cut-Off Wertes von 263 CD3+CD8+-HLA-DR+ T-Zellen / 100 ml Urin lagen nach drei Monaten 81.5 % (22 von 27) und nach zwölf Monaten bereits 91.4 % (32 von 35) der Patient\*innen mit stabiler Transplantatfunktion unter dem Wert zur Vorhersage einer TCMR (**Abb. 10E**)

In einer weiteren Analyse der longitudinalen Urinzell-Werte wurden nur die 9 Patient\*innen betrachtet, welche alle drei Urinproben abgegeben hatten. Zusammengehörige Patient\*innen-Proben sind mit Linien verbunden. Hier zeigt **Abbildung 11**, dass die Anzahl der CD8+ T-Zellen im Urin von stabilen Nierentransplantierten über den Zeitraum von 12 Monaten signifikant abnimmt ( $\chi^2(2) = 9.31$ ,  $p = 0.0095$ ). Zudem lagen nach 12 Monaten alle stabilen Patient\*innen unter dem Cut-Off-Wert von 263 CD3+CD8+-HLA-DR+ T-Zellen / 100 ml Urin.



**Abbildung 11: Patient\*innen mit vollständigem Follow-up über 12 Monate**

Zellzahl über die ersten 12 Monate nach Transplantation. Patient\*innenproben mit vollständigem Follow-up sind jeweils verbunden. (E) Cut-off für Biomarker als schwarze gestrichelte Linie dargestellt. NTX= Nierentransplantation; TEC = Tubulusepithelzelle; ns = nicht signifikant; \* $p < 0,05$  (modifiziert nach Grothgar et al, 2022)<sup>1</sup>

## 4 Diskussion

Diese Arbeit konnte mittels Durchflusszytometrie das Potential von Urinzellen für das Monitoring von Nierentransplantierten in einem multizentrischen Untersuchungsaufbau bestätigen. T-Zellen und ihre Subpopulationen konnten zelluläre Abstoßungsprozesse präzise von Patient\*innen ohne Rejektion abgrenzen. Mit CD8+HLA-DR+ T-Zellen wurde ein Zelltyp beschrieben, welcher *TCMR* spezifisch von allen anderen Formen der Transplantatdysfunktion trennt. TEC konnten als potenzieller Schadensmarker nur bedingten Mehrwert für das Monitoring von Nierentransplantierten beitragen. Transplantierte mit stabiler Nierenfunktion wiesen eine geringe Zellzahl auf, welche sich unter einem für *TCMR* definierten Cut-Off befanden.

### 4.1 Zellsignaturen im Urin unterscheiden Abstoßungstypen

Die Urin-Zellsignaturen der Nierentransplantierten decken sich mit der Annahme, dass akut inflammatorische Prozesse einen vermehrten Schaden von Nierengewebe hervorrufen, sodass einzelne Immun- und Parenchymzellen daraufhin über das tubuläre System in den Urin gelangen.<sup>15</sup> TEC können im Urin als Schadensmarker gesehen werden und T-Zellen als Zeichen für Inflammation. So präsentierten sich Patient\*innen mit einer *TCMR* durchschnittlich mit den meisten Zellen und die Gruppe *noRX* wies die geringste absolute Zellzahl im Urin auf. Die *ABMR* gliedert sich ebenfalls in dieses Konstrukt ein. Da die humoralen Prozesse in der Regel chronisch, langsam und eher gefäßnah im Transplantat stattfinden, waren wenig Zellen im Urin detektiert worden.<sup>20</sup> In Abgrenzung zu *noRX* findet jedoch ein inflammatorischer Prozess statt. Dies spiegelte ein deutlich erhöhter Anteil von T-Zellen während einer *ABMR* im Vergleich zu einer *noRX* wider. Eine nicht-immunologische Ursache für die Transplantatdysfunktion in der Gruppe *noRX* könnte die Nephrotoxizität der Calcineurin-Inhibitoren dargestellt haben. Sie ist eine bekannte Komplikation der Immunsuppression bei Nierentransplantierten und stellte eine wichtige Differentialdiagnose zur Rejektion dar.<sup>66</sup> Die Abundanz der T-Zellen bei der Gruppe *TCMR* passt ebenfalls in die Hypothese, dass die T-Zellen Treiber des Pathomechanismus sind. Da die *BR* eine Vorstufe zu *TCMR* darstellt, passt auch ihre

Zellsignatur in die Hypothese. Die Urinproben wiesen deutlich mehr Zellen auf, als bei Patient\*innen mit *noRX*, aber nicht so viele wie bei der Gruppe *TCMR*.<sup>67</sup>

Das verschobene Verhältnis von CD4+ und CD8+ T Zellen zugunsten der zytotoxischen T Zellen bei Patient\*innen mit *TCMR* spiegelt vermutlich diesen Zelltyp als Treiber der Abstoßung wider. Eine ähnliche Annahme lässt sich für den T-Helferzell-Überschuss im Urin bei der Gruppe *ABMR* machen. Die CD4+ T-Zellen spielen bei der humoralen Immunantwort eine wichtige Rolle, da sie B-Zellen über Zytokine aktivieren.<sup>15</sup>

In der Gruppe *other* waren ebenfalls deutlich mehr Zellen quantifiziert worden als bei den Patient\*innen mit *noRX*. Eine Erklärung hierfür wäre, dass sich diese Patient\*innen ebenfalls durch inflammatorische Prozesse (de-novo oder Rekurrenz der Grunderkrankung) mit einer Transplantatverschlechterung präsentierten.<sup>66</sup> Damit stellen sie für einen Biomarker, welcher lediglich unspezifische Inflammation detektiert, eine Herausforderung dar.

## 4.2 T-Zellen aus dem Urin als Produkt renaler Inflammation

Die Zahl der T-Zellen im Urin von Nierentransplantierten mit Transplantatdysfunktion variierte in dieser Arbeit. Patient\*innen mit Abstoßungsreaktion präsentierten sich mit signifikant mehr CD4+ und CD8+ T-Zellen als Personen ohne Abstoßung. Diese Beobachtung ist in einigen Publikationen vorbeschrieben.<sup>56-59</sup>

Passend dazu konnte die Arbeit von *Goerlich et al* eine Korrelation der histologischen Kriterien für Abstoßungsreaktionen nach Banff und der Zellquantitäten in Urinproben darlegen. Die Ausprägungen von Tubulitis und interstitieller Inflammation, welche beide die Säulen der histologischen Diagnose für eine *TCMR* in den Banff-Kriterien darstellen, spiegelte sich in der Menge an T-Zell in den Urinproben wieder. Andere Studien konnten diese Korrelation aus Immunsignaturen und Histologie ebenfalls bestätigen.<sup>31,38,41</sup>

Die Hypothese, dass die gemessenen Zellen renalen Ursprungs sind, wird durch mehrere Veröffentlichungen gestützt. CXCR3+ T-Zellen waren bei Patient\*innen mit Lupusnephritis in renalen Gewebeproben erhöht. Parallel zur Biopsie wurde bei den Patient\*innen auch eine durchflusszytometrische Analyse der Urinproben durchgeführt. Hier konnten die CXCR3+ T-Zellen, welche die Aktivität der Nephritis widerspiegeln, ebenfalls nachgewiesen werden.<sup>68</sup> In einer anderen Veröffentlichung haben wir Transkriptome aus Urinproben und Nierenbiopsien bei Patient\*innen mit akuten

Nierenschaden verglichen. Die Urin-Transkriptome reflektierten den Nierenschaden, welcher ebenfalls in der Nierenbiopsie erkenntlich war.<sup>69</sup>

Vorarbeiten und die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass die T-Zellen aus den Urinproben nicht nur ein unspezifisches Produkt sind, sondern sich klar auf den pathologischen renalen Prozess zurückführen lassen. Sie stellen damit ein Fenster in die Niere dar. Ihre Limitation besteht jedoch darin, dass sie die unterschiedlichen Ätiologien der Inflammation nicht immer unterscheiden können.<sup>59</sup> Eine genauere Phänotypisierung der Zellen könnte die Spezifität der Biomarker verbessern. Es ist zudem davon auszugehen, dass ein tieferes Verständnis der krankheitstreibenden Zellen neue Türen für die Behandlung von Nierentransplantierte öffnen würde.

### **4.3 CD8+HLA-DR+ T-Zellen als Treiber der Immunreaktion**

Den CD8+HLA-DR+ T-Zellen gelang es in dieser Arbeit am deutlichsten, die *TCMR* unter allen Patient\*innen mit Transplantatverschlechterung hervorzuheben. Der Subtyp wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen als potenzieller Biomarker für akute Abstoßungsprozesse beschrieben.<sup>47,57</sup>

In der Regel findet die Expression von MHC-Molekülen der Klasse II, zu denen auch HLA-DR gehört, primär auf APCs statt.

T-Zellen können selbst auch HLA-DR exprimieren. Diese Expression findet erst 3-5 Tage nach der initialen Aktivierung statt. Die Übersichtsarbeit von *Holling et al* berichtete, dass die Expression mit einem negativen Rückkopplungsmechanismus der T-Zellen in Zusammenhang zu bringen ist. Sie beschrieben, dass die MHC der Klasse II andere CD4+ T-Zellen herunterregulieren, um die Immunantwort zu drosseln, nachdem sie stark ausgeprägt war. Dafür präsentieren die HLA-DR+ T-Zellen ihr MHC an andere aktivierte T-Zellen ohne Co-Stimulatoren, wodurch diese in Anergie übergehen.<sup>62</sup> Die erhöhte Quantität der HLA-DR+ T-Zellen bei Patient\*innen mit *TCMR* könnte also als ein Zeichen der Gegenregulation nach stattgehabter Inflammation gedeutet werden. Sie könnten somit nicht die Treiber des Schadens repräsentieren, sondern für eine Gegenregulation des aktivierten Immunsystems stehen.

#### 4.4 TEC als potenzieller Marker für Gewebeuntergang

Während einer Abstoßungsreaktion kommt es zu einem akuten Schaden des Nierengewebes.<sup>70</sup> Die zugrunde gehenden Zellen geraten dabei ins Tubulussystem und werden mit dem Urin nach außen geschwemmt.<sup>71</sup> Basierend auf dieser Hypothese wurden in dieser Arbeit TEC als potenzieller Schadensmarker und Indikator von Abstoßungen untersucht.

Die Annahme, dass ein akuter Abstoßungsprozess einen parenchymalen Schaden hervorruft und somit zum Nachweis von mehr TEC im Urin führt, ließ sich durch diese Arbeit nur bedingt bestätigen. Proximale und distale TEC konnten jeweils Patient\*innen mit *TCMR* von Patient\*innen mit *noRX* trennen. Sie zeigten sich in der Trennung anderer Gruppen jedoch als schwach. Die Ergebnisse ließen sich mit der Vermutung erklären, dass die TEC ein unspezifischer Schadensmarker sind, welcher im Rahmen einer Transplantatdysfunktion erhöht ist. Alle Patient\*innen mit destruierender Nieren-Inflammation, egal ob durch Abstoßungsreaktion oder andere Grunderkrankungen, präsentierten sich mit ubiquitärer Erhöhung der Urin-TEC. Demgegenüber stand die Gruppe *noRX* ohne Nieren-Inflammation und mit geringen Mengen Urin-TEC.

Die Arbeit von *Goerlich et al* kam wiederum zu einem anderen Ergebnis. In ihrer Untersuchung von Nierentransplantierten mit Transplantatdysfunktion präsentierten sich Patient\*innen ohne Rejektion mit den höchsten Werten für TEC im Urin. Demgegenüber hatten Patient\*innen mit Abstoßung die wenigsten TEC. Es wurden ähnliche Oberflächenmoleküle untersucht wie in dieser Arbeit. Grund für die widersprüchlichen Ergebnisse könnte sein, dass der TEC-Quantifizierung für unsere Arbeit eine Zellfixation vorausgegangen war. Ein weiterer Zerfall von beschädigten TEC, welche die Zellquantität beeinträchtigt hätte, ist damit gegebenenfalls verhindert worden. Dahingehend unterscheidet sich die Arbeit zu der Publikation von *Goerlich et al*. Zudem muss anerkannt werden, dass die Analyse von TEC mittels Durchflusszytometrie eine technische Herausforderung darstellt. Dies liegt zum einen an der variablen Größe der Zellen und zum anderen am Schaden, den sie erfahren haben. Somit werden diese autofluoreszent und erschweren die Messung. Eine weitere Erklärung könnte in der limitierten Spezifität der gewählten Marker zur Identifizierung liegen. CD10 und CD13 sind häufige Oberflächenmarker. Sie wurden ebenfalls an Bindegewebszellen der Blase beschrieben.<sup>72</sup>

Abschließend gilt es festzuhalten, dass der Unterschied der TEC zwischen den Erkrankungsgruppen in dieser Arbeit sehr gering war und damit zurückhaltend bewertet werden sollte.

#### **4.5 Verlaufskohorte**

Ein optimaler Biomarker für Abstoßungsreaktionen sollte das Potenzial haben, diese bereits vor einer signifikanten Schädigung des Transplantats zu erkennen.

Eine Aussage über die prognostischen Fähigkeiten der zellulären Biomarker lässt sich anhand dieser Arbeit nicht treffen. Die einzige Rejektion in der prospektiven Längsschnittkohorte war vor Probenentnahme bereits antiinflammatorisch behandelt worden und musste daher ausgeschlossen werden. Somit blieb lediglich ein Kollektiv zurück, welches als Gruppe mit stabiler Transplantatfunktion angesehen werden konnte.

Die Verlaufsmessungen dieser Gruppe zeigten unterschiedliche Ergebnisse. Die Menge der CD4+ T-Zellen blieb über die Zeit konstant. Eine Erklärung dafür wäre, dass sich unter dieser Gruppe die regulatorischen T-Zellen (Treg) befinden könnten. Diese Population ist wichtig für das Gleichgewicht des Immunsystems und unterstützt die Akzeptanz des Transplantats. Erste Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass sich stabile Nierentransplantierte mit höheren Treg-Leveln präsentieren als Patient\*innen mit Abstoßungsreaktionen.<sup>73</sup> Um genauere Aussagen darüber zu treffen wäre eine tiefere Charakterisierung der CD4+ T-Zellen notwendig. Hierfür würden sich Treg-spezifische Marker wie CD25 und Foxp3 anbieten.<sup>74,75</sup>

Zudem wurde ein signifikanter Rückgang der distalen TEC über 12 Monate beobachtet. Die ursprünglich erhöhten distalen TEC könnten Ausdruck des ischämischen Schadens gewesen sein, welchen alle Nieren während der Transplantation erleiden. Zudem wird nach Transplantation ein Umbauprozess in der Niere induziert.<sup>76</sup> Um die Hypothese genauer zu prüfen, müsste der Verlauf von distalen TEC bei Patient\*innen mit guter und schlechter Transplantatfunktion verglichen werden. Da die Komplikationsrate in dieser Kohorte glücklicherweise sehr niedrig war, lässt die Arbeit darüber keine Aussage zu.

Als nur die 9 Patient\*innen betrachtet wurden, welche ihre Nachsorgeuntersuchungen vollständig abschließen konnten, zeigte sich die Menge der CD8+ T-Zellen signifikant

rückläufig. Zudem wurde der Cut-Off von 263 CD8+HLA-DR+ T-Zellen pro 100 ml Urin an dieser Gruppe erprobt. Abgesehen von jeweils einer Person zum Messzeitpunkt nach einem und nach drei Monaten lagen alle Patient\*innen mit stabiler Transplantatfunktion unter dem Cut-Off für eine Rejektion. Es ist nicht auszuschließen, dass die beiden Messungen, welche über dem Cut-Off lagen, subklinische Rejektionen waren.<sup>26</sup> Protokollbiopsien könnten eine Antwort auf diese Frage geben.<sup>77</sup> Unabhängig davon legen die Ergebnisse nahe, dass CD8+-HLA-DR+ T-Zellen ab dem 3. Monat nach Transplantation als Biomarker anwendbar wären.

Jegliche Aussagen über die zeitlichen Verläufe der Zellen sind mit Zurückhaltung zu betrachten, da die Kohorten-Größe und die Nachsorgeuntersuchungen durch die COVID-19-Pandemie stark beeinträchtigt wurden.

#### **4.6 Limitationen**

Urin wird bereits an vielen Stellen im klinischen Alltag für diagnostische Zwecke eingesetzt. Für Zellen stellt Urin jedoch ein sehr toxisches Medium dar. *Stachowski et al* beschrieben bereits 1988, dass es Faktoren gibt, welche das Überleben von Lymphozyten in Urinproben deutlich beeinflussen. So wurde neben der Verweildauer im Urin auch die Osmolarität als entscheidender Faktor genannt.<sup>58</sup> Eine Berücksichtigung von Osmolarität und pH des Urins könnte die Aussagekraft von Urin-Biomarkern verbessern. Diese potenziellen Störfaktoren müssen für die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit berücksichtigt werden.

Der mRNA basierte CRM-Score erwies sich zwar als nützlich für das Monitoring von Nierentransplantierten, jedoch wurde in der Studie berichtet, dass Proben ausgeschlossen werden mussten, wenn sie nicht schnell genug verarbeitet wurden. Grund war der Zerfall der mRNA.<sup>38</sup> Die Anwendbarkeit im klinischen Alltag wird dadurch limitiert. Ein erster wichtiger Schritt zur Verbesserung der Präanalytik wurde von uns publiziert. In genannter Publikation berichten wir, dass wir die Urinzellen mit einem von unserer Arbeitsgruppe entwickelten Protokoll konservieren konnten. Die Haltbarkeit der Zellen bei Kühlschranktemperatur konnte damit auf bis zu sechs Tage erhöht werden. Das genannte Fixationsprotokoll konnte für diese Arbeit angewendet werden und verbesserte damit die Verlässlichkeit der Zellquantitäten.<sup>61</sup> Solche Erkenntnisse sind

essenziell, um experimentelle Biomarker an die Anforderung des klinischen Alltags heranzuführen und verlässlich einzusetzen. Inwiefern Ernährung der Patient\*innen, Tageszeit der Probe und Urinzusammensetzung die Zellzahl beeinflusst haben bleibt trotzdem ungeklärt. Daher können signifikante Einflussfaktoren nicht ausgeschlossen werden.

Während die Durchflusszytometrie von Blutproben bereits Routine im klinischen Alltag darstellt, befindet sich die durchflusszytometrische Analyse von Urin noch im experimentellen Setting.<sup>53</sup> Sie ist daher wenig standardisiert und erschwert den Vergleich zwischen Laboren. Nichtsdestotrotz ermutigen die Ergebnisse zu einer Integration der Methodik in den klinischen Alltag. Ein wichtiger Zwischenschritt wäre eine multizentrische Studie mit Probenauswertung in unterschiedlichen Laboren. Somit könnte der Einfluss der Untersucher\*innen auf das Ergebnis bestimmt werden.

Eine weitere Limitation dieser Arbeit besteht in ihrer explorativen Natur. Da keine prospektiven Endpunkte für die Biomarker festgelegt worden waren und es zu multiplem Testen kam, ist eine Verzerrung der realen Ergebnisse nicht auszuschließen. Die Übersichtsarbeit von *Guzzi et al* kam zu dem Ergebnis, dass der Großteil aller Publikationen zu Biomarkern aus dem Urin für Nierentransplantierte ein Risiko für Verzerrung der Ergebnisse aufweist. Die Autor\*innen nennen unter anderem Bias bei der Patient\*innenauswahl und Ausschluss von realistischen Störgrößen des klinischen Alltags.<sup>49</sup>

Um diese Störfaktoren zu beheben, würde sich ein prospektives Studiendesign mit festgelegtem Endpunkt anbieten.

#### **4.7 Zukunft des Transplant-Monitorings**

Die Biomarkerforschung für Abstoßungsreaktionen von Nierentransplantierten ist zu einem weiten Feld geworden. In Blut- und Urinproben konnten bereits viele spannende Kandidaten mit den einzelnen Entitäten der Rejektion in Verbindung gebracht werden. Diese Einteilung erfolgt aktuell anhand der histopathologischen Veränderungen der Nierenbiopsie. Da diese Klassifikation nach Banff jedoch ihre Limitationen aufweist und die klassische Dichotomie aus humoralen und zellulären Prozessen immer stärker

hinterfragt wird, haben es neue nicht invasive Biomarker schwer, wenn sie sich mit der Nierenbiopsie vergleichen.<sup>8</sup> *Madill-Thomsen et al* haben Genexpressions-Analysen ihren dazugehörigen histologischen Biopsie-Ergebnissen gegenübergestellt. In mehr als einem Drittel der Fälle kam die Genanalyse zu einer anderen Diagnose. Daraus lässt sich nicht ableiten, dass die Nierenbiopsien alle falsch kategorisiert wurden, aber die diagnostische Leistung der Biopsie ist damit nicht mehr unangefochten.<sup>78</sup> Grund dafür könnte sein, dass die histologischen Zeichen der Abstoßungsreaktion nur punktuell in der Niere auftreten und sich nicht einheitlich über das gesamte Gewebe verteilen. So könnten Histopathologien übersehen werden.

Ein Ansatz, um neuen Biomarkern einen fairen Vergleich zu ermöglichen, wäre, dass man sie ebenfalls mit klinischen Endpunkten vergleicht. Dies sollte in zukünftigen Studien berücksichtigt werden. *Huang et al* berichten in ihrer Übersichtsarbeit zudem, dass die Banff Klassifikation 2021 eine Arbeitsgruppe ins Leben gerufen hat, welche das Ziel verfolgt, nicht-invasive Biomarker mit der Histologie zu kombinieren. DSA haben bereits gezeigt, wie ein Blutparameter die Banff Klassifikation ergänzen kann.<sup>79</sup> Biomarker, welche Risikopatient\*innen präselektieren, könnten ebenfalls nützlich sein. Die bereits erwähnte Studie von *Hirt-Minkowski et al* hat Nierentransplantierte über Protokollbiopsien und Zytokine im Urin nachverfolgt. Das kontinuierliche Monitoring mit CXCL10 hätte laut der Autor\*innen den Bedarf der Protokollbiopsien um 61% und den Bedarf der Indikationsbiopsien um 64% senken können.<sup>31</sup> In diesem Anwendungsbereich könnte auch ein T-Zell-basierter Biomarker die Nierenbiopsie gezielt unterstützen. Läge bei einer Risikopatientin ein Verdacht auf eine *TCMR* vor, welche vor Therapieeinleitung zu bestätigen wäre, könnten laut den Ergebnissen dieser Arbeit, CD8+HLA-DR+ T-Zellen dafür eingesetzt werden. Somit könnten unnötige Komplikationen verhindert und gegebenenfalls Kosten gesenkt werden.

Die Kombination mehrerer diagnostischer Parameter ist bis dato der einzige Weg, um der Komplexität der Abstoßungsreaktion gerecht zu werden. Dies erscheint sinnvoll, da die Analyse von Parametern aus verschiedenen molekularen Ebenen auf spezifische Signalwege und Netzwerke hinweisen kann. Ein beeindruckendes Beispiel lieferte das Team von *Yang et al* mit ihrem QSant-Score. Kein einziger Biomarker, der für diese Arbeit untersucht wurde, konnte eine vergleichbare diagnostische Leistung erreichen.<sup>46</sup> Es ist jedoch wichtig anzumerken, dass der Score die Abstoßung nicht unter Patient\*innen mit

Transplantatdysfunktion erkannt hat, sondern gegenüber Patient\*innen mit stabiler Transplantatfunktion. Dieses Szenario ist wenig mit der klinischen Realität vereinbar und stellt eine wichtige Einschränkung dar. Zudem teilt der Score die grundlegende Limitation aller bis dato bekannten Biomarker: er kann Patient\*innen mit *ABMR* und *TCMR* nicht voneinander trennen. Potenzielle Biomarker setzen sich bis dato das Ziel entweder *ABMR*, *TCMR* oder Abstoßungen im Allgemeinen zu detektieren. Um dieser Limitation zu begegnen, arbeitet die Gruppe von *Yang et al* an einer Anpassung des bekannten Scores, welche auch die Entitäten *ABMR* und *TCMR* separat erkennen soll.

Demgegenüber sollten Biomarker auf zellulärer Ebene ebenfalls weiterverfolgt werden. Ihr entscheidender Vorteil liegt darin, dass sie Sender und Empfänger der biochemischen Signale sind, welche für andere Biomarker gemessen werden. Während Metabolite oder Zytokine durch unterschiedliche Prozesse anfallen können, wäre es zielführender genau die Zelle zu detektieren, welche den pathologischen Prozess auslöst. Um diese unter den Immunzellen aus Urinproben zu identifizieren, würde sich die RNA-Einzelzell-Sequenzierung vielversprechend anbieten.

Neben der Suche nach Biomarkern für Abstoßungsreaktionen, wäre es ebenfalls interessant Indikatoren für Toleranz zu ermitteln. Somit könnte die teils nephrotoxische Immunsuppression reduziert werden. Einige Forschungsprojekte verfolgen diesen Ansatz bereits.<sup>80,81</sup>

#### **4.8 Fazit**

Der Beitrag dieser Arbeit kann als ein verlässlicher Baustein für mögliche Biomarker Kombinationen zur Diagnostik von Pathologien in Nierentransplantaten gesehen werden. Er liefert mit einer Analyse auf zellulärer Ebene einen Einblick in die Zell-Signatur von Abstoßungsreaktionen gegen das Allograft. T-Zellen erweisen sich als präziser Indikator für Patient\*innen mit zellulärer Abstoßung. Welche pathophysiologische Rolle die CD8+HLA-DR+ T-Zellen dabei spielen ist noch nicht abschließend geklärt.

Darüber hinaus unterstreicht diese Arbeit, dass die durchflusszytometrische Analyse von Urinzellen eine robuste Methodik darstellt und in zukünftigen Arbeiten weiterverfolgt werden sollte.

## Literaturverzeichnis

1. Grothgar E, Goerlich N, Samans B, Skopnik CM, Metzke D, Klocke J, Prskalo L, Freund P, Wagner L, Duerr M, Matz M, Olek S, Budde K, Paliege A, Enghard P. Urinary CD8+HLA-DR+ T Cell Abundance Non-invasively Predicts Kidney Transplant Rejection. *Front Med (Lausanne)* 2022; **9**: 928516.
2. Ruiz-Ortega M, Rayego-Mateos S, Lamas S, Ortiz A, Rodrigues-Diez RR. Targeting the progression of chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2020; **16**(5): 269-88.
3. Levin A, Stevens PE. Summary of KDIGO 2012 CKD Guideline: behind the scenes, need for guidance, and a framework for moving forward. *Kidney Int* 2014; **85**(1): 49-61.
4. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, Held PJ, Port FK. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 1999; **341**(23): 1725-30.
5. Muñoz-Terol JM, Rocha JL, Castro-de la Nuez P, García-Cabrera E, Vilches-Arenas Á. Years of Potential Life Lost on Renal Replacement Therapy: Retrospective Study Cohort. *J Clin Med* 2022; **12**(1).
6. DSO. Jahresbericht Organspende und Transplantation in Deutschland 2022. 2023. <https://dso.de/SiteCollectionDocuments/DSO-Jahresbericht%202022.pdf> (accessed 30.08.2023).
7. Eurotransplant. Kennzahlen Deutschland. 2023. <https://www.eurotransplant.org/region/deutschland/> (accessed 30.08.2023).
8. Callemeyn J, Lamarthée B, Koenig A, Koshy P, Thauat O, Naesens M. Allorecognition and the spectrum of kidney transplant rejection. *Kidney Int* 2022; **101**(4): 692-710.
9. Hart A, Lentine KL, Smith JM, Miller JM, Skeans MA, Prentice M, Robinson A, Foutz J, Booker SE, Israni AK, Hirose R, Snyder JJ. OPTN/SRTR 2019 Annual Data Report: Kidney. *Am J Transplant* 2021; **21 Suppl 2**: 21-137.
10. Voora S, Adey DB. Management of Kidney Transplant Recipients by General Nephrologists: Core Curriculum 2019. *Am J Kidney Dis* 2019; **73**(6): 866-79.
11. Kasiske BL, Zeier MG, Chapman JR, Craig JC, Ekberg H, Garvey CA, Green MD, Jha V, Josephson MA, Kiberd BA, Kreis HA, McDonald RA, Newmann JM, Obrador GT, Vincenti FG, Cheung M, Earley A, Raman G, Abariga S, Wagner M, Balk

EM. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients: a summary. *Kidney Int* 2010; **77**(4): 299-311.

12. Agrawal A, Ison MG, Danziger-Isakov L. Long-Term Infectious Complications of Kidney Transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2022; **17**(2): 286-95.

13. 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**(3): 378-83.

14. Zhang R. Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplant Recipients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2018; **13**(1): 182-92.

15. Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. *N Engl J Med* 2010; **363**(15): 1451-62.

16. Djamali A, Kaufman DB, Ellis TM, Zhong W, Matas A, Samaniego M. Diagnosis and management of antibody-mediated rejection: current status and novel approaches. *Am J Transplant* 2014; **14**(2): 255-71.

17. Cornell LD. Histopathologic Features of Antibody Mediated Rejection: The Banff Classification and Beyond. *Front Immunol* 2021; **12**: 718122.

18. Kim M, Martin ST, Townsend KR, Gabardi S. Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: a review of pathophysiology, diagnosis, and treatment options. *Pharmacotherapy* 2014; **34**(7): 733-44.

19. 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, Duong van Huyen JP, Gibson IW, Kraus ES, Mannon RB, Naesens M, Nickleit 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**(2): 293-307.

20. Morozumi K, Takeda A, Otsuka Y, Horike K, Gotoh N, Narumi S, Watarai Y, Kobayashi T. Reviewing the pathogenesis of antibody-mediated rejection and renal graft pathology after kidney transplantation. *Nephrology (Carlton)* 2016; **21 Suppl 1**: 4-8.

21. Hall BM. Cells mediating allograft rejection. *Transplantation* 1991; **51**(6): 1141-51.

22. Siu JHY, Surendrakumar V, Richards JA, Pettigrew GJ. T cell Allorecognition Pathways in Solid Organ Transplantation. *Front Immunol* 2018; **9**: 2548.

23. Roufosse C, Simmonds N, Clahsen-van Groningen M, Haas M, Henriksen KJ, Horsfield C, Loupy A, Mengel M, Perkowska-Ptasinska A, Rabant M, Racusen LC, Solez K, Becker JU. A 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology. *Transplantation* 2018; **102**(11): 1795-814.
24. Inker LA, Titan S. Measurement and Estimation of GFR for Use in Clinical Practice: Core Curriculum 2021. *Am J Kidney Dis* 2021; **78**(5): 736-49.
25. Josephson MA. Monitoring and managing graft health in the kidney transplant recipient. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; **6**(7): 1774-80.
26. Ramalhete LM, Araújo R, Ferreira A, Calado CRC. Proteomics for Biomarker Discovery for Diagnosis and Prognosis of Kidney Transplantation Rejection. *Proteomes* 2022; **10**(3).
27. Ponticelli C, Graziani G. Proteinuria after kidney transplantation. *Transpl Int* 2012; **25**(9): 909-17.
28. Morgan TA, Chandran S, Burger IM, Zhang CA, Goldstein RB. Complications of Ultrasound-Guided Renal Transplant Biopsies. *Am J Transplant* 2016; **16**(4): 1298-305.
29. Jin PH, Sarwal RD, Sarwal MM. Urinary Biomarkers for Kidney Allograft Injury. *Transplantation* 2022; **106**(7): 1330-8.
30. Tinel C, Devresse A, Vermorel A, Sauvaget V, Marx D, Avettand-Fenoel V, Amrouche L, Timsit MO, Snanoudj R, Caillard S, Moulin B, Olagne J, Essig M, Gwinner W, Naesens M, Marquet P, Legendre C, Terzi F, Rabant M, Anglicheau D. Development and validation of an optimized integrative model using urinary chemokines for noninvasive diagnosis of acute allograft rejection. *Am J Transplant* 2020; **20**(12): 3462-76.
31. 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**(7): 1811-23.
32. Raza A, Firasat S, Khaliq S, Aziz T, Mubarak M, Naqvi SA, Mehdi SQ, Rizvi SA, Abid A. The association of urinary interferon-gamma inducible protein-10 (IP10/CXCL10) levels with kidney allograft rejection. *Inflamm Res* 2017; **66**(5): 425-32.
33. Blydt-Hansen TD, Sharma A, Gibson IW, Wiebe C, Sharma AP, Langlois V, Teoh CW, Rush D, Nickerson P, Wishart D, Ho J. Validity and utility of urinary CXCL10/Cr immune monitoring in pediatric kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2021; **21**(4): 1545-55.
34. 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**(11): 2840-51.

35. 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**(13): 947-54.

36. 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. Urinary-cell mRNA profile and acute cellular rejection in kidney allografts. *N Engl J Med* 2013; **369**(1): 20-31.

37. Nissaisorakarn V, Lee JR, Lubetzky M, Suthanthiran M. Urine biomarkers informative of human kidney allograft rejection and tolerance. *Hum Immunol* 2018; **79**(5): 343-55.

38. Sigdel TK, Yang JYC, Bestard O, Schroeder A, Hsieh SC, Liberto JM, Damm I, Geraedts ACM, Sarwal MM. A urinary Common Rejection Module (uCRM) score for non-invasive kidney transplant monitoring. *PLoS One* 2019; **14**(7): e0220052.

39. Verma A, Muthukumar T, Yang H, Lubetzky M, Cassidy MF, Lee JR, Dadhania DM, Snopkowski C, Shankaranarayanan D, Salvatore SP, Sharma VK, Xiang JZ, De Vlaminck I, Seshan SV, Mueller FB, Suhre K, Elemento O, Suthanthiran M. Urinary cell transcriptomics and acute rejection in human kidney allografts. *JCI Insight* 2020; **5**(4).

40. Banas MC, Neumann S, Pagel P, Putz FJ, Krämer BK, Böhmig GA, Eiglsperger J, Schiffer E, Ruemmele P, Banas B. A urinary metabolite constellation to detect acute rejection in kidney allografts. *EBioMedicine* 2019; **48**: 505-12.

41. Blydt-Hansen TD, Sharma A, Gibson IW, Mandal R, Wishart DS. Urinary metabolomics for noninvasive detection of borderline and acute T cell-mediated rejection in children after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2014; **14**(10): 2339-49.

42. 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, 2nd, Sarwal MM. Mining the human urine proteome for monitoring renal transplant injury. *Kidney Int* 2016; **89**(6): 1244-52.

43. Park J, Lin HY, Assaker JP, Jeong S, Huang CH, Kurdi T, Lee K, Fraser K, Min C, Eskandari S, Routray S, Tannous B, Abdi R, Riella L, Chandraker A, Castro CM, Weissleder R, Lee H, Azzi JR. Integrated Kidney Exosome Analysis for the Detection of Kidney Transplant Rejection. *ACS Nano* 2017; **11**(11): 11041-6.

44. Kanzelmeyer NK, Zürbig P, Mischak H, Metzger J, Fichtner A, Ruszai KH, Seemann T, Hansen M, Wygoda S, Krupka K, Tönshoff B, Melk A, Pape L. Urinary proteomics to diagnose chronic active antibody-mediated rejection in pediatric kidney transplantation - a pilot study. *Transpl Int* 2019; **32**(1): 28-37.
45. Mertens I, Willems H, Van Loon E, Schildermans K, Boonen K, Baggerman G, Valkenburg D, Gwinner W, Anglicheau D, Essig M, Marquet P, Naesens M. Urinary Protein Biomarker Panel for the Diagnosis of Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplant Recipients. *Kidney Int Rep* 2020; **5**(9): 1448-58.
46. Yang JYC, Sarwal RD, Sigdel TK, Damm I, Rosenbaum B, Liberto JM, Chan-On C, Arreola-Guerra JM, Alberu J, Vincenti F, Sarwal MM. A urine score for noninvasive accurate diagnosis and prediction of kidney transplant rejection. *Sci Transl Med* 2020; **12**(535).
47. 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**(2): 73-80.
48. 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**(1): 796.
49. Guzzi F, Cirillo L, Buti E, Becherucci F, Errichiello C, Roperto RM, Hunter JP, Romagnani P. Urinary Biomarkers for Diagnosis and Prediction of Acute Kidney Allograft Rejection: A Systematic Review. *Int J Mol Sci* 2020; **21**(18).
50. Bloom RD, Augustine JJ. Beyond the Biopsy: Monitoring Immune Status in Kidney Recipients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2021; **16**(9): 1413-22.
51. Rabant M, Amrouche L, Morin L, Bonifay R, Lebreton X, Aouni L, Benon A, Sauvaget V, Le Vaillant L, Aulagnon F, Sberro R, Snanoudj R, Mejean A, Legendre C, Terzi F, Anglicheau D. Early Low Urinary CXCL9 and CXCL10 Might Predict Immunological Quiescence in Clinically and Histologically Stable Kidney Recipients. *Am J Transplant* 2016; **16**(6): 1868-81.
52. Sigdel T, Nguyen M, Liberto J, Dobi D, Junger H, Vincenti F, Laszik Z, Sarwal MM. Assessment of 19 Genes and Validation of CRM Gene Panel for Quantitative Transcriptional Analysis of Molecular Rejection and Inflammation in Archival Kidney Transplant Biopsies. *Front Med (Lausanne)* 2019; **6**: 213.
53. Ward MS. The use of flow cytometry in the diagnosis and monitoring of malignant hematological disorders. *Pathology* 1999; **31**(4): 382-92.
54. Enghard P, Rieder C, Kopetschke K, Klocke JR, Undeutsch R, Biesen R, Dragun D, Gollasch M, Schneider U, Aupperle K, Humrich JY, Hiepe F, Backhaus M,

Radbruch AH, Burmester GR, Riemekasten G. Urinary CD4 T cells identify SLE patients with proliferative lupus nephritis and can be used to monitor treatment response. *Ann Rheum Dis* 2014; **73**(1): 277-83.

55. Sonnemann J, Klocke J, Bieringer M, Rousselle A, Eckardt K-U, Elitok S, Popovic S, Bachmann S, Kettritz R, Salama AD, Enghard P, Schreiber A. Urinary T Cells Identify Renal Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies-Associated Vasculitis and Predict Prognosis: A Proof of Concept Study. *Kidney International Reports* 2023.

56. 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.

57. Roberti I, Panico M, Reisman L. Urine flow cytometry as a tool to differentiate acute allograft rejection from other causes of acute renal graft dysfunction. *Transplantation* 1997; **64**(5): 731-4.

58. 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**(2): 145-55.

59. 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**(3): 143-6.

60. Roberti I, Reisman L. Serial evaluation of cell surface markers for immune activation after acute renal allograft rejection by urine flow cytometry--correlation with clinical outcome. *Transplantation* 2001; **71**(9): 1317-20.

61. Freund P, Skopnik CM, Metzke D, Goerlich N, Klocke J, Grothgar E, Prskalo L, Hiepe F, Enghard P. Addition of formaldehyde releaser imidazolidinyl urea and MOPS buffer to urine samples enables delayed processing for flow cytometric analysis of urinary cells: A simple, two step conservation method of urinary cells for flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2023.

62. Holling TM, Schooten E, van Den Elsen PJ. Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: of mice and men. *Hum Immunol* 2004; **65**(4): 282-90.

63. Tian Y, Babor M, Lane J, Schulten V, Patil VS, Seumois G, Rosales SL, Fu Z, Picarda G, Burel J, Zapardiel-Gonzalo J, Tennekoon RN, De Silva AD, Premawansa S, Premawansa G, Wijewickrama A, Greenbaum JA, Vijayanand P, Weiskopf D, Sette A, Peters B. Unique phenotypes and clonal expansions of human CD4 effector memory T cells re-expressing CD45RA. *Nat Commun* 2017; **8**(1): 1473.

64. 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**(6): e66750.
65. Luttmann W BK, Küpper M, Myrtek D. . Der Experimentator: Immunologie. 4. Auflage. . Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag; 2014.
66. Nankivell BJ, Kuypers DR. Diagnosis and prevention of chronic kidney allograft loss. *Lancet* 2011; **378**(9800): 1428-37.
67. Beimler J, Zeier M. Borderline rejection after renal transplantation--to treat or not to treat. *Clin Transplant* 2009; **23 Suppl 21**: 19-25.
68. 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**(1): 199-206.
69. Klocke J, Kim SJ, Skopnik CM, Hinze C, Boltengagen A, Metzke D, Grothgar E, Prskalo L, Wagner L, Freund P, Görlich N, Muench F, Schmidt-Ott KM, Mashreghi MF, Kocks C, Eckardt KU, Rajewsky N, Enghard P. Urinary single-cell sequencing captures kidney injury and repair processes in human acute kidney injury. *Kidney Int* 2022; **102**(6): 1359-70.
70. Laine J, Etelämäki P, Holmberg C, Dunkel L. Apoptotic cell death in human chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 1997; **63**(1): 101-5.
71. Jeong HJ. Diagnosis of renal transplant rejection: Banff classification and beyond. *Kidney Res Clin Pract* 2020; **39**(1): 17-31.
72. Liu AY, Vêncio RZ, Page LS, Ho ME, Loprieno MA, True LD. Bladder expression of CD cell surface antigens and cell-type-specific transcriptomes. *Cell Tissue Res* 2012; **348**(3): 589-600.
73. Brown K, Wong W. Diagnostic value of regulatory T cells: a new facet of a much studied cell population. *Transplantation* 2008; **86**(11): 1485-91.
74. Martin-Moreno PL, Tripathi S, Chandraker A. Regulatory T Cells and Kidney Transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2018; **13**(11): 1760-4.
75. Alessandrini A, Turka LA. FOXP3-Positive Regulatory T Cells and Kidney Allograft Tolerance. *Am J Kidney Dis* 2017; **69**(5): 667-74.
76. Salvadori M, Rosso G, Bertoni E. Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. *World J Transplant* 2015; **5**(2): 52-67.

77. Nankivell BJ, Chapman JR. The significance of subclinical rejection and the value of protocol biopsies. *Am J Transplant* 2006; **6**(9): 2006-12.
78. Madill-Thomsen K, Perkowska-Ptasińska A, Böhmig GA, Eskandary F, Einecke G, Gupta G, Halloran PF. Discrepancy analysis comparing molecular and histology diagnoses in kidney transplant biopsies. *Am J Transplant* 2020; **20**(5): 1341-50.
79. Huang E, Mengel M, Clahsen-van Groningen MC, Jackson AM. Diagnostic Potential of Minimally Invasive Biomarkers: A Biopsy-centered Viewpoint From the Banff Minimally Invasive Diagnostics Working Group. *Transplantation* 2023; **107**(1): 45-52.
80. Newell KA, Asare A, Kirk AD, Gisler TD, Bourcier K, Suthanthiran M, Burlingham WJ, Marks WH, Sanz I, Lechler RI, Hernandez-Fuentes MP, Turka LA, Seyfert-Margolis VL. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 2010; **120**(6): 1836-47.
81. Brouard S, Mansfield E, Braud C, Li L, Giral M, Hsieh SC, Baeten D, Zhang M, Ashton-Chess J, Braudeau C, Hsieh F, Dupont A, Pallier A, Moreau A, Louis S, Ruiz C, Salvatierra O, Souillou JP, Sarwal M. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**(39): 15448-53.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Emil Grothgar, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Durchflusszytometrische Rejektions-Prädiktion bei Nierentransplantierten // Flow cytometric rejection prediction in kidney transplant recipients“ 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](http://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**

Emil Grothgar hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

**Grothgar E\***, Goerlich N\*, Samans B\*, Skopnik CM, Metzke D, Klocke J, Prskalo L, Freund P, Wagner L, Duerr M, Matz M, Olek S, Budde K, Paliege A\*, Enghard P\*. **Urinary CD8+HLA-DR+ T Cell Abundance Non-invasively Predicts Kidney Transplant Rejection**. Front Med (Lausanne). 2022 Jul

\*geteilte Autor\*innenschaft

Beitrag im Einzelnen

- Konzeption und Design der Studie
- Akquisition von Patienten und Probenmaterial
- Erhebung der Patientendaten
- Durchführung der experimentellen Arbeit (Urinaufbereitung und Messung mittels Durchflusszytometer)
- Auswertung und Darstellung der Daten mittels FlowJo und R (alle Grafiken und Tabellen selbstständig erzeugt)
- Literaturrecherche
- Verfassen und Veröffentlichung des Manuskriptes

Emil Grothgar präsentierte die Arbeit (10-minütiger Symposiumsvortrag) auf einem nationalen Kongress und erhielt einen Preis für den besten Poster-Abstract (Kongress für Nephrologie, Rostock. 13. Jahrestagung der DGfN, 23.-26.09.2021).

Alle oben genannten Punkte erfolgten eigenständig und unter Supervision von Prof. 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.

## Publikationsliste

1. **Grothgar E\***, Goerlich N\*, Samans B\*, Skopnik CM, Metzke D, Klocke J, Prskalo L, Freund P, Wagner L, Duerr M, Matz M, Olek S, Budde K, Paliege A\*, Enghard P\*. **Urinary CD8+HLA-DR+ T Cell Abundance Non-invasively Predicts Kidney Transplant Rejection.** *Front Med (Lausanne)*. 2022 Jul
2. Klocke J, Kim SJ, Skopnik CM, Hinze C, Boltengagen A, Metzke D, **Grothgar E**, Prskalo L, Wagner L, Freund P, Görlich N, Muench F, Schmidt-Ott KM, Mashreghi MF, Kocks C, Eckardt KU, Rajewsky N, Enghard P. **Urinary single-cell sequencing captures kidney injury and repair processes in human acute kidney injury.** *Kidney Int*. 2022 Dec
3. Freund P, Skopnik CM, Metzke D, Goerlich N, Klocke J, **Grothgar E**, Prskalo L, Hiepe F, Enghard P. **Addition of formaldehyde releaser imidazolidinyl urea and MOPS buffer to urine samples enables delayed processing for flow cytometric analysis of urinary cells: A simple, two step conservation method of urinary cells for flow cytometry.** *Cytometry B Clin Cytom* 2023.
4. Prskalo L, Skopnik CM, Goerlich N, Freund P, Wagner L, **Grothgar E**, Mirkheshti P, Klocke J, Sonnemann J, Metzke D, Schneider U, Hiepe F, Eckardt KU, Salama AD, Bieringer M, Schreiber A, Enghard P. **Urinary CD4 + T Cells Predict Renal Relapse in ANCA-Associated Vasculitis.** *J Am Soc Nephrol* 2024

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die mich über die vier Jahre meiner Promotion begleitet und unterstützt haben.

Ohne die freundliche Bereitstellung von Proben wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Daher möchte ich mich herzlich bei allen Patient\*innen bedanken, welche sich in den Dienst dieser Arbeit gestellt haben.

Besonderen Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater Philipp Enghard, der diese Promotion ermöglichte und mir in allen Phasen des Projektes zur Seite stand. Seine motivierende Zuversicht und stetige Unterstützung haben mich ans Ziel gebracht. Über seine Arbeitsgruppe habe ich die Freude an der Forschung entdecken dürfen.

Ich möchte Diana Metzke für ihre Einarbeitung und Expertise im Rahmen der Durchflusszytometrie danken. Nina Görlich, Christoph Skopnik und Jan Klocke bin ich für ihre wissenschaftlichen und bioinformatischen Input dankbar. Zudem honoriere ich die Unterstützung durch die Mitarbeitenden des DRFZ.

Ich danke der Studienstiftung des deutschen Volkes für ihre großzügige Unterstützung über mein gesamtes Medizinstudium. Ohne die zwei finanzierten Freisemester für die Laborarbeit wäre diese Arbeit in der Form nie möglich gewesen.

Für den motivierenden Beistand danke ich meiner ganzen Familie, Freunden und Bekannten. Der größte Dank gebührt meinen Eltern Bettina und Andreas, meiner Großmutter Marianne und meiner wundervollen Partnerin Marie.

# Statistische Akkreditierung



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

**Name, Vorname: Grothgar, Emil**  
**Emailadresse: [emil.grothgar@charite.de](mailto:emil.grothgar@charite.de)**  
**Matrikelnummer: 222031**  
**PromotionsbetreuerIn: Enghard, Philipp**  
**Promotionsinstitution/Klinik: Medizinische Klinik m. S.**  
**Nephrologie**

**Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie (iBikE)**

Direktorin: Prof. Dr. Geraldine Rauch

Postanschrift:  
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin  
Besucheranschrift:  
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171  
[geraldine.rauch@charite.de](mailto:geraldine.rauch@charite.de)  
<https://biometrie.charite.de/>



## Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Herr *Emil Grothgar* innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und Klinische Epidemiologie (iBikE) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 19.02.2021*

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Augenmerk auf Deskription der Daten legen*
- p-Werte aus Wilcoxon-Mann-Whitney Tests als Teil der explorativen Analyse auffassen*

Diese Bescheinigung garantiert weder die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren noch die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.