

Aus dem
CharitéCentrum für Innere Medizin mit Gastroenterologie und Nephrologie
Medizinische Klinik m.S. Nephrologie und Intensivmedizin
Direktor: Prof. Dr. K.-U. Eckardt

Habilitationsschrift

Identifizierung und Validierung von Biomarkern für postoperative Komplikationen nach Nierentransplantation

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Experimentelle Nephrologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. rer. medic. Mareen Matz
aus Berlin

Eingereicht: Januar/2019

Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries

1. Gutachter/in: Prof. Dr. Christine Falk, Hannover

2. Gutachter/in: Prof. Dr. Timm Westhoff, Bochum

Für F., M., K. und K.

Inhalt

| | |
|--|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | 4 |
| 1. Einführung in die Thematik | 5 |
| 1.1 Nierentransplantation | 5 |
| 1.2 T-Lymphozyten-vermittelte Rejektion (TCMR) | 6 |
| 1.3 Antikörper-vermittelte Rejektion (ABMR) | 6 |
| 1.4 Interstitielle Fibrose und Tubuläre Atrophie (IFTA) | 7 |
| 1.5 Diagnose von postoperativen Komplikationen und Rejektionen | 7 |
| 1.6 Identifizierung nicht-invasiver Biomarker | 8 |
| 1.6.1 Metabolomik | 8 |
| 1.6.2 Proteomanalysen | 9 |
| 1.6.3 Transkriptom-Analysen | 10 |
| 1.7 Zielstellung der eigenen Arbeiten | 10 |
| 2. Eigene Arbeiten | 12 |
| 2.1 IP-10 Expression im Urin bei akuter T-Lymphozyten-vermittelter Rejektion nach Nierentransplantation | 12 |
| 2.2 MicroRNA Expression in Blutzellen bei schwerer T-Lymphozyten-vermittelter Rejektion nach Nierentransplantation | 22 |
| 2.3 MicroRNA Expression in Plasma bei T-Lymphozyten-vermittelter Rejektion nach Nierentransplantation | 34 |
| 2.4 mRNA Expression in Blutzellen bei ABMR nach Nierentransplantation | 44 |
| 2.5 MicroRNA Expression in Blutzellen bei ABMR nach Nierentransplantation | 54 |
| 2.6 mRNA Expression in Blutzellen bei IFTA nach Nierentransplantation | 71 |
| 3. Diskussion | 80 |
| 4. Zusammenfassung | 86 |
| 5. Literaturangaben | 88 |
| Danksagung | 94 |
| Erklärung | 95 |

Abkürzungsverzeichnis

ABMR antibody-mediated rejection; Antikörper-vermittelte Rejektion

BL Borderline

DSA donor-spezifische Antikörper

HLA human leucocyte antigen; humanes Leukozytenantigen

IFIG Interferon-induzierbares Gen

IFN Interferon

IFTA interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie

IP-10 Interferon-inducible protein 10

IVIG intravenöse Immunglobuline

MHC Major Histocompatibility Complex; Haupthistokompatibilitätskomplex

mRNA messenger RNA; Boten-RNA

RNA ribonucleic acid; Ribonukleinsäure

SLE systemischer Lupus erythematodes

TCMR T-cell-mediated rejection; T-Lymphozyten-vermittelte Rejektion

TCMVR T-cell-mediated vascular rejection; T-Lymphozyten-vermittelte vaskuläre Rejektion

1. Einführung in die Thematik

1.1 Nierentransplantation

Eine gesunde, funktionstüchtige Niere bilanziert u.a. den Wasserhaushalt, kontrolliert den Säure-Basen- sowie den Elektrolyt-Haushalt, produziert Hormone wie z.B. Erythropoetin und ist am Vitamin D-Stoffwechsel beteiligt. Vielfältige Erkrankungen wie Glomerulonephritis, Pyelonephritis, Diabetes mellitus oder Zystennieren, aber auch Risikofaktoren wie Übergewicht, Adipositas und hohe Blutzuckerwerte, können zu Störungen der Nierenfunktion führen [1]. Bei terminaler Niereninsuffizienz kann ein Teil der Nierenfunktion durch die Dialyse ersetzt werden [2]. Diese Nierenersatztherapie kann nicht alle Aufgaben eines gesunden Organs übernehmen, so dass die Patienten unter einer schlechten Stoffwechsellage leiden. Auch können eine geringe Leistungsfähigkeit und Ortsgebundenheit zu den Nachteilen der Dialyse gezählt werden [3-6]. Zur Reduzierung der Sterblichkeitsrate und zur Verbesserung der Lebensqualität gegenüber der Dialyse bietet sich alternativ die Transplantation einer allogenen Niere als Therapie der Wahl an. Laut des Statistischen Reports aus 2017 von Eurotransplant (www.eurotransplant.org) waren am Ende des Jahres 2017 7620 Patienten auf der aktiven Warteliste für ein Nierentransplantat in Deutschland verzeichnet. Basierend auf dem Zeitpunkt der Aufnahme auf die Warteliste betrug die statistische Wartezeit auf eine einzelne Spenderniere für 2895 Patienten 0-1 Jahr, für 2658 Patienten 2-4 Jahre und für 2067 Patienten 5 Jahre und mehr. Nachteilig wirkt sich bei einer soliden Organtransplantation die notwendige Applikation von immunsuppressiven Medikamenten mit zum Teil erheblichen Nebenwirkungen aus [7].

Die Gabe von immunsuppressiven Medikamenten nach einer Nierentransplantation ist obligat und muss dem immunologischen Risiko des Patienten angepasst werden. Nur so können Rejektionen des transplantierten Organs verhindert werden. Diese Abstoßungsreaktionen können T-Lymphozyten-vermittelt oder durch Antikörper mediiert sein, wobei Mischformen auftreten können. Immunologische Rejektionsmechanismen sind noch nicht im Detail aufgeklärt, jedoch können drei Schritte identifiziert werden: Nach der Erkennung von Alloantigenen im transplantierten Gewebe kommt es zur Generierung der Alloimmunantwort und folglich zur Zerstörung des Transplantatgewebes [8].

1.2 T-Lymphozyten-vermittelte Rejektion (TCMR)

T- Lymphozyten-vermittelte Rejektionen treten am häufigsten auf, sie werden durch die entzündliche Infiltration der Transplantatniere mit aktivierten mononukleären Zellen wie T-Lymphozyten, Makrophagen und Natürlichen Killerzellen hervorgerufen [9]. Die T-Helfer-Lymphozyten werden direkt oder indirekt mit fremden HLA-Mustern konfrontiert, zusätzliche kostimulatorische Signale tragen zu ihrer Aktivierung und Ausdifferenzierung und damit zur sukzessiven Sezernierung von Zytokinen bei. Die Produktion von Chemokinen ist ursächlich für die selektive Rekrutierung von weiteren T-Lymphozyten und Monozyten zur transplantierten Niere. Hierbei kann auch eine unspezifische Aktivierung von Makrophagen und Natürlichen Killerzellen zur Freisetzung von zytotoxischen Molekülen und damit zum Transplantatschaden führen. Zusätzlich schädigen zytotoxische T-Lymphozyten des adaptiven Immunsystems das Transplantat. Die inflammatorischen Prozesse, die zur Ausbildung einer zellulär vermittelten Rejektion führen, sind hoch komplex und beeinträchtigen hauptsächlich die Tubuluszellen. Sie sind durch Immunsuppressiva effektiv behandelbar und meist reversibel [10, 11], doch scheint die akute als auch subklinische zellulär vermittelte Abstoßung ein Risikofaktor für die Genese chronischer Rejektionen im späteren Verlauf der Transplantation zu sein [12, 13].

1.3 Antikörper-vermittelte Rejektion (ABMR)

ABMR ist assoziiert mit einer hohen Rate von Funktionsverlusten von Transplantatnieren und damit mit dem Verlust des Organs [14, 15]. Zirkulierende Antikörper gegen Gewebsantigene des Donors sind verantwortlich für die überwiegend in den Gefäßen des Organs auftretenden Entzündungsreaktionen. Speziell donor-spezifische anti-HLA Antikörper (DSA), aber vermutlich auch MHC class I-related chain A Antikörper [16], Angiotensin II Typ 1 Rezeptor-aktivierende Antikörper [17] und anti-endothelial cell Antikörper [18] sind in die Entwicklung von ABMR Episoden involviert [19]. Behandelt werden sie mit Plasmapheresen, intravenösen Immunglobulinen (IVIg) und immunsuppressiven Medikamenten, die u.a. B-Lymphozyten, Plasmazellen oder das Komplementsystem zum Ziel haben. Hier fehlen jedoch oftmals prospektive Studien, Therapeutika werden zulassungsüberschreitend eingesetzt und sind kostenintensiv. Das besondere Augenmerk richtete sich in den letzten Jahren auf die

Reduzierung der DSA-Produktion durch die Depletion von B-Lymphozyten und besonders Plasmazellen. Als vielversprechend wurde die Anwendung des α -CD20 Antikörpers Rituximab und des Proteasominhibitors Bortezomib angesehen, jedoch zeigten kürzlich zwei randomisiert-kontrollierte klinische Studien Ergebnisse, welche eine Anwendung in Patienten mit ABMR nicht unterstützen [20, 21]. Eculizumab, ein Inhibitor der terminalen Komplementaktivierung, wird derzeit auf seine Effizienz bei der Verhinderung von ABMR-Episoden getestet [22, 23].

1.4 Interstitielle Fibrose und Tubuläre Atrophie (IFTA)

Trotz der Inzidenzreduktion und adäquater Therapiemöglichkeiten von frühen klinischen und subklinischen Rejektionsepisoden konnte in den letzten Jahren keine Verlängerung des Transplantatüberlebens erreicht werden. Das Auftreten von IFTA wird mit einer eingeschränkten Nierenfunktion im Langzeitverlauf assoziiert [24-27], wobei die fibrotischen Prozesse häufig langsam sowie subklinisch verlaufen und erst bei letztendlich eingeschränkter Transplantatfunktion diagnostiziert werden. Therapierbar bzw. aufzuhalten sind die ausgedehnten Fibrosen des Parenchymgewebes nicht und sind somit irreversibel. Den oftmals multifaktoriellen Ätiologien von IFTA können sowohl immunologische als auch nicht-immunologische Vorgänge zugrunde liegen, wobei diese hoch komplex sind und oftmals nicht identifiziert werden können. Unabhängig von den Ursachen können die molekularen Signalwege und Mechanismen, die zu IFTA führen, identisch sein.

1.5 Diagnose von postoperativen Komplikationen und Rejektionen

Auf eine eingeschränkte Transplantatfunktion hinweisend können ein steigendes Serumkreatinin und Proteinurie sein, Rejektionsepisoden und IFTA können jedoch auch asymptomatisch verlaufen. Die genannten Parameter sind allerdings nicht nur unspezifisch, sondern auch zu einem Zeitpunkt auffällig, an dem meist schon ein signifikanter histologischer Schaden am Organ nachweisbar ist. Der Goldstandard zur spezifischen Beurteilung des Transplantats ist die histologische Gewebsuntersuchung nach einer Nierenbiopsie. Mit der

Einführung und ständigen Revision der Konventionen der Banff-Klassifikation wurde ein Standard zur histologischen Begutachtung und Diagnostik zugänglich [26, 28-34], obwohl im Besonderen die Kriterien zur Diagnostik der ABMR immer noch Änderungen und Weiterentwicklungen unterliegen [35].

1.6 Identifizierung nicht-invasiver Biomarker

Die Ausführung der Nadelbiopsie ist nicht nur relativ zeitaufwändig sowie kostenintensiv, sie erfordert auch einen stationären Klinikaufenthalt, kann zu Komplikationen führen und folglich nicht in kurzen Intervallen durchgeführt werden. Auch kann die Interpretation der histologischen Analysen durchaus variieren [36]. Es wäre deshalb wünschenswert, Biomarker im Urin, im Plasma bzw. Serum oder in Zellen des peripheren Blutes zu identifizieren, die minimal-invasiv analysierbar sowie sensitiv und spezifisch auf die unterschiedlichen Arten und Schweregrade von Rejektionen und auch IFTA hinweisen [37]. Ergänzend können solche objektiv gemessenen und bewerteten biologischen Marker Aufschluss über immer noch nicht vollständig aufgeklärte Signalwege und Mechanismen geben, die zum histologischen Bild der Antikörper-vermittelten bzw. T-Lymphozyten-vermittelten Rejektion, aber auch zu IFTA führen. Damit eröffnen sich nicht nur Möglichkeiten zur Entwicklung neuer diagnostischer Mittel, sondern auch innovativer Monitoring-Strategien und individueller Therapieansätze. Die schnelle Weiterentwicklung von Hochdurchsatz-Methoden wie der Massenspektrometrie, Kernspinresonanzspektroskopie, Genchips (Microarrays) und Sequenzierungen erlaubt das schnelle und kosten-effektive Screening verschiedener Strukturen auf Gen- und Proteinebene im Kontext verschiedenster Komplikationen nach einer Nierentransplantation.

1.6.1 Metabolomik

Selbst der Goldstandard Histopathologie zur Diagnosestellung von z.B. Rejektionen unterliegt Limitationen. Strategien, die sich mit der Systembiologie befassen, könnten helfen, die komplexen und gleichzeitig multifaktoriellen Prozesse nach einer Organtransplantation aufzuklären [38]. Die Analyse des Metaboloms in Blut oder Urin könnte zur Identifizierung von

Biomarkern führen, die sensitiver und spezifischer als die Messung von Serumkreatinin sind [39]. Serummetabolite wurden bereits in kleineren Studien mit dem Auftreten T-Lymphozyten-vermittelter Rejektion in Verbindung gebracht [40, 41]. Gleiches gilt für Studien mit Urin, die mit akuter Rejektion assoziierte metabolische Muster zu identifizieren suchten [42-44]. Zum derzeitigen Zeitpunkt stellt die Metabolomik-Technologie einen vielversprechenden Ansatz zur weiteren Identifizierung von Biomarkern nach Nierentransplantation dar, jedoch ist sie technisch und bioinformatisch anspruchsvoll sowie kostenintensiv. Auch ist die tatsächliche Konzentration von Metaboliten in Serum bzw. Plasma als auch im Urin fluktuierend und hängt von verschiedensten Faktoren wie dem Mikrobiom ab [45-48]. Es fehlen derzeit valide klinische Studien mit ausreichender Patientenzahl und Kontrollgruppen wie z.B. Patienten mit ABMR. Allerdings repräsentieren Analysen des Metaboloms im Vergleich zu Transkriptom- und Proteom-Untersuchungen möglicherweise eine realere Darstellung der Immunreaktion [49].

1.6.2 Proteomanalysen

Proteomanalysen erlauben den systematischen Nachweis und die anschließende funktionelle Analyse von Proteinen in einer bestimmten Matrix [50], d.h. sie ermöglichen –ähnlich wie Metabolom-Untersuchungen- die Aneignung von Wissen über die pathophysiologischen Mechanismen der Immunantwort nach einer Nierentransplantation. Ihre Auswertung im Hinblick auf die Biomarkersuche für Rejektionen ist sehr komplex und die anfängliche Untersuchung des Proteoms in minimal-invasiv zu erhaltenem Material, wie z.B. im Urin, ergab kontroverse Ergebnisse [51-53], die bis heute nicht zur Entwicklung eines neuen diagnostischen Mittels führten. Dies beruht u.a. auf fehlenden Standards und Abweichungen in Studiendesign, Durchführung und Analyse sowie fehlenden Validierungen der Daten [54]. Auffallend sind jedoch die Chemokine IP-10 und MIG, die in jüngeren Studien als vielversprechende Marker gelten [55, 56].

1.6.3 Transkriptom-Analysen

Mit Hilfe von Transkriptom-Analysen können systemisch die Expressionsstärke von Transkripten quantifiziert und somit exprimierte aktivierte Gene zum Zeitpunkt der Rejektion o.ä. identifiziert werden. Die Analyse der Expression von Ribonukleinsäuren (RNA) kann aufschlussreiche Implikationen zulassen, wenn die zugehörigen Proteine eine geringe Halbwertszeit bzw. geringe Expressionsstärken haben und somit schwierig zu detektieren sind. Besonders MicroRNAs rücken in den Fokus der Biomarkersuche. Diese kleinen RNAs kontrollieren post-transkriptionell mannigfaltige biologische Prozesse und sind auch in die B- und T-Lymphozyten-Differenzierung, die Funktion von regulatorischen T-Lymphozyten und in Antigen-Signalwege involviert [57-62]. Ihre Expression wird u.a. mit der Entwicklung humaner Pathologien der Niere und auch transplantiertes Organe in Verbindung gebracht [63-67]. Das kodierende und auch nicht-kodierende Genexpressionsmuster in Serum bzw. Plasma und im Urin nierentransplantierten Patienten wurde von vielen Gruppen im Kontext von Rejektionen und Transplantatfehlfunktionen analysiert [50].

Ähnliche Analysen mit Biopsiematerial haben zu Empfehlungen zur Verwendung von molekularen Markern in der Diagnostik geführt [68, 69], welche zur Verbesserung der Stratifikation von Patienten mit hohem Risiko eines Transplantatverlustes beitragen kann [70, 71]. Auch wenn eine standardisierte klinische Anwendung von Markern aus Transkriptom-Analysen in Serum bzw. Plasma oder Urin noch ausbleibt, so können die Erfahrungen der Studien mit Biopsie-Material genutzt und auf die minimal-invasiv gewonnenen Probenmaterialien übertragen werden.

1.7 Zielstellung der eigenen Arbeiten

Ziel der vorliegenden Arbeiten war die Identifizierung und Validierung von Kandidatenmarkern, die post-operative Komplikationen bei nierentransplantierten Patienten sensitiv und spezifisch anzeigen und so zukünftig die derzeitigen Methoden der Diagnosestellung sowie des Monitorings unterstützen könnten. Der besondere Fokus lag auf

der Bewertung von Markern, die sich in minimal- oder nicht invasiv gewonnenem Patientenmaterial bestimmen lassen.

2. Eigene Arbeiten

2.1 IP-10 Expression im Urin bei akuter T-Lymphozyten-vermittelter Rejektion nach Nierentransplantation

An Immunreaktionen in der transplantierten Niere sind maßgeblich Chemokine und ihre Rezeptoren beteiligt, z.B. durch die Rekrutierung aktivierter T-Lymphozyten in das Organ. In Originalarbeit 1 konnte gezeigt werden, dass sowohl die Boten-RNA (mRNA) Expression des Chemokins IP-10 im Urinsediment als auch die IP-10 Konzentration im Urin bereits vor der Diagnose einer akuten Abstoßung durch eine histopathologische Untersuchung von Biopsiematerial deutlich gesteigert und prädiktiv für die Kurz- und Langzeitfunktion von Nieren nach einer Transplantation ist. Diese gefundene Hochregulation von IP-10 bei akuten Abstoßungsepisoden war spezifisch im Vergleich zur stabilen Transplantatfunktion, Harnwegsinfekten und CMV-Antigenämie.

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Originalarbeit 1:

Early post-transplant urinary IP-10 expression after kidney transplantation is predictive of short- and long-term graft function

Kidney International (2006) 69, 1683–1690. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000343>.

“The early identification of renal transplant recipients at enhanced risk of developing acute and subclinical rejection would allow individualized adjustment of immunosuppression before functional graft injury occurs and would exclude these patients from drug-weaning studies. Protein and reverse transcriptase-polymerase chain reaction-based analyses of candidate markers in urine open the opportunity to closely monitor kidney-transplanted patients non-invasively. The chemokine interferon-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10) might be an interesting candidate to uncover ongoing immune processes within the graft. Urine samples from kidney-transplanted recipients were retrospectively analyzed for IP-10 mRNA and protein expression. IP-10 levels were correlated with the incidence of acute rejection episodes proven by histology and long-term graft function assessed by the glomerular filtration rate 6

months post transplantation. IP-10 expression in urine identified patients with ongoing acute rejection episodes several days before a biopsy was indicated by rising serum creatinine levels. Most importantly, elevated levels of urinary IP-10 protein within the first four postoperative weeks were predictive of graft function at 6 months even in the absence of acute rejection. These data reveal a correlation between elevated IP-10 expression in urine at early time points post-transplantation and intragraft immune activation that leads to acute rejection and compromised long-term graft function.”

2.2 MicroRNA Expression in Blutzellen bei schwerer T-Lymphozyten-vermittelter Rejektion nach Nierentransplantation

MicroRNAs sind kurze, nicht-kodierende RNAs, die in das hoch komplexe System der Genregulation involviert sind. Originalarbeit 2 beruht auf Microarray-Experimenten zur Kandidatensuche nach Biomarkern für T-Lymphozyten-vermittelte Rejektion nach Nierentransplantation und zeigt, dass die gleichzeitige Messung der Expression von fünf MicroRNAs in Blutzellen nierentransplantierte Patienten die sensitive und spezifische Identifizierung von schweren T-Lymphozyten-vermittelten Rejektionsepisoden ermöglicht.

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Originalarbeit 2:

Identification of T Cell–Mediated Vascular Rejection After Kidney Transplantation by the Combined Measurement of 5 Specific MicroRNAs in Blood

Transplantation. 2016 Apr;100(4):898-907. <http://doi.org/10.1097/tp.0000000000000873>.

„Background. MicroRNAs (miRNAs, miR) hold important roles in the posttranscriptional regulation of gene expression. Their function has been correlated with kidney disease, and they might represent a new class of biomarkers for frequent evaluation of renal graft status. We analyzed their potential in identifying severe T cell–mediated vascular rejection (TCMVR) (Banff 4-II/III) in kidney transplanted patients. Methods. Microarray experiments and semiquantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction were performed with total RNA isolated from blood cells of kidney graft recipients. Initial microarray analysis revealed 23 differentially expressed miRNAs distinguishing patients with TCMVR from patients with stable grafts. From these, we validated and further determined the expression of 6 differentially expressed miRNAs and 2 control miRNAs in 161 samples from patients with T cell–mediated rejection (Banff 3-Borderline, Banff 4-I/II/III), Banff-2 antibody-mediated rejection, Banff-5 interstitial fibrosis/ tubular atrophy, in samples from stable patients and in samples from patients with urinary tract infection using real-time reverse transcription polymerase chain reaction. Results. Expression levels of all 6 candidate miRNAs were significantly downregulated in blood of TCMVR patients compared to the other groups and displayed high sensitivities and specificities for diagnosing TCMVR. The combination of 5

miRNAs, identified by an unbiased multivariate logistic regression followed by cross validation, enhanced the sensitivity and specificity for the diagnosis of TCMVR after renal transplantation. Conclusions. The combined measurement of miRNA-15B, miRNA-16, miRNA-103A, miRNA-106A, and miRNA-107 may help to better identify TCMVR after renal transplantation in a precise and clinically applicable way.”

2.3 MicroRNA Expression in Plasma bei T-Lymphozyten-vermittelter Rejektion nach Nierentransplantation

In dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob die in Originalarbeit 2 in Blutzellen identifizierten MicroRNAs in freier Form im Plasma nierentransplantierte Patienten ebenso sensitiv und spezifisch für die Diagnose von T-Zell-vermittelten Rejektionsepisoden sind. Die Messung der Kandidatenexpression im Plasma ergab einen signifikanten Unterschied zwischen Patienten mit stabiler Transplantatfunktion und T-Lymphozyten-vermittelter Abstoßung. Es konnte jedoch kein deutlicher Unterschied zu Patienten mit Infekten, IFTA bzw. ABMR gefunden werden. Die Messung der in Originalarbeit 2 gefundenen Kandidatengene in Blutzellen hat folglich einen höheren diagnostischen Wert als die Messung der freien Form im Plasma.

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Originalarbeit 3:

Free microRNA levels in plasma distinguish T-cell mediated rejection from stable graft function after kidney transplantation

Transpl Immunol. 2016 Nov;39:52-59. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2016.09.001>.

„The potential diagnostic value of circulating free miRNAs in plasma compared to miRNA expression in blood cells for rejection processes after kidney transplantation is largely unknown, but offers the potential for better and timely diagnosis of acute rejection. Free microRNA expression of specific blood cell markers was measured in 160 plasma samples from kidney transplant patients under standard immunosuppressive therapy (steroids ± mycophenolic acid ± calcineurin inhibitor) with stable graft function, urinary tract infection, interstitial fibrosis and tubular atrophy, antibody-mediated rejection (ABMR), Borderline (Banff3), tubulo-interstitial (Banff4-I) and vascular rejection (Banff4-II/III) applying RT-PCR. The expression levels of specific microRNAs miR-15B, miR-103A and miR-106A discriminated patients with stable graft function significantly (p-values 0.001996, 0.0054 and 0.0019 resp.) from patients with T-cell mediated rejection (TCMR) and from patients with urinary tract infection (p-values 0.0001, <0.0001 and 0.0001, resp.). A combined measurement of several microRNAs after multivariate logistic regression improved the diagnostic value supported by subsequent cross-validation. In conclusion, the measurement of circulating microRNAs in

plasma from patients with renal transplants distinguishes TCMR and urinary tract infection from stable graft function. In contrast to miRNA expression measurement in blood cells it does not allow a discrimination from ABMR or interstitial fibrosis and tubular atrophy.“

2.4 MRNA Expression in Blutzellen bei ABMR nach Nierentransplantation

Parallel zu den Hochdurchsatzsequenzierungen für kurze RNAs (MicroRNAs) aus Originalarbeit 5 wurden mit den Blutproben der gleichen Patienten Sequenzierungen für mRNAs durchgeführt und analysiert, um potentielle Biomarker-Kandidaten für ABMR nach Nierentransplantation zu identifizieren. Auffällig war eine Gensignatur von Interferon (IFN) Typ I assoziierten Genen. Die Validierung und Bestimmung geeigneter Marker in einer großen Patientenkohorte ergab eine für ABMR spezifische Regulation von ETV7 und RSAD2.

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Originalarbeit 4:

The Regulation of IFN Type I Pathway Related Genes RSAD2 and ETV7 Specifically Indicate Antibody-Mediated Rejection After Kidney Transplantation.

Clin Transplant. 2018 Oct 20:e13429. <https://doi.org/10.1111/ctr.13429>.

“Context: Antibody-mediated rejection (ABMR) after kidney transplantation (KTx) remains the crucial obstacle to successful long-term graft function. The identification of gene signatures involved in ABMR could grant the basis for better prevention and treatment strategies.

Objective: The identification of gene signatures in whole blood cells specific for ABMR after KTx.

Material and Methods: Total RNA from blood cells of 16 kidney transplanted patients with ABMR, stable graft function (SGF) and with T-cell mediated rejection (TCMR) was isolated. Gene expression was determined by high-throughput sequencing followed by validation and analyses of differentially expressed candidates on mRNA level and on protein level in a large patient cohort (n=185) in patients with SGF, urinary tract infection (UTI), borderline rejection (BL), TCMR, ABMR and interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA).

Results: From the 570 genes detected, 111 discriminated ABMR from SGF and TCMR. A distinct enrichment of IFN type I and type II signature gene set was observed. The expression of candidate genes *IFIT1*, *ETV7* and *RSAD2* distinguished ABMR patients from patients with SGF and also TCMR, whereas *ETV7* and *RSAD2* differentiated ABMR also from BL.

Conclusion: The IFN-inducible genes (IFIGs) *ETV7* and *RSAD2* represent specific biomarkers for ABMR episodes after KTx. ”

2.5 MicroRNA Expression in Blutzellen bei ABMR nach Nierentransplantation

In Anlehnung an Originalarbeit 2 sollte analysiert werden, ob für ABMR ähnlich sensitive und spezifische Kandidaten MicroRNAs in Blutzellen von nierentransplantierten Patienten gefunden werden können. Auf der Grundlage von Hochdurchsatzsequenzierungen wurden Kandidaten identifiziert, die in einer großen Patientenkohorte mit verschiedenen Kontrollgruppen verifiziert werden sollten. Die gefundenen Marker konnten nicht als hochspezifisch für ABMR bestätigt werden, jedoch stellte sich miR-145-5p als IFTA spezifische MicroRNA in Blutzellen heraus.

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Originalarbeit 5:

MicroRNA regulation in blood cells of renal transplanted patients with interstitial fibrosis/tubular atrophy and antibody-mediated rejection.

PLoS One. 2018 Aug 13;13(8):e0201925. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201925>.

„Interstitial fibrosis/tubular atrophy (IFTA) is associated with reduced allograft survival, whereas antibody-mediated rejection (ABMR) is the major cause for renal allograft failure. To identify specific microRNAs and their regulation involved in these processes, total RNA from blood cells of 16 kidney transplanted (KTx) patients with ABMR, stable graft function (SGF) and with T-cell mediated rejection (TCMR) was isolated. MicroRNA expression was determined by high-throughput sequencing. Differentially expressed candidate microRNAs were analyzed with RT-PCR in patients with SGF (n = 53), urinary tract infection (UTI) (n = 17), borderline rejection (BL) (n = 19), TCMR (n = 40), ABMR (n = 22) and IFTA (n = 30). From the 301 detected microRNAs, 64 were significantly regulated between the three cohorts. Selected candidate microRNAs miR-223-3p, miR-424-3p and miR-145-5p distinguished TCMR and ABMR from SGF, but not from other pathologies. Most importantly, miR-145-5p expression in IFTA patients was significantly downregulated and displayed a high diagnostic accuracy compared to SGF alone (AUC = 0.891) and compared to SGF, UTI, BL, TCMR and ABMR patients combined (AUC = 0.835), which was verified by cross-validation. The identification of miR-145-5p as IFTA specific marker in blood constitutes the basis for evaluating this potentially diagnostic microRNA as biomarker in studies including high numbers of patients and different

pathologies and also the further analysis of fibrosis causing etiologies after kidney transplantation.”

2.6 mRNA Expression in Blutzellen bei IFTA nach Nierentransplantation

In früheren Publikationen vorgeschlagene Kandidatenmarker sollten in einer großen Patientenkohorte mit verschiedenen Pathologien nach Nierentransplantation auf mRNA- und auch auf Proteinebene validiert werden. Besonders die Expression von IL-8 mRNA in Blutzellen von Patienten mit IFTA konnte als deutlich abweichend von den Expressionsgraden in Blutzellen von Patienten mit Rejektionen unterschiedlichen Typs und auch mit stabiler Transplantatfunktion gezeigt werden. Dieses Ergebnis konnte nicht auf die Proteinebene im Serum übertragen werden.

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Originalarbeit 6:

The selective biomarker IL-8 identifies IFTA after kidney transplantation in blood cells.

Transplant Immunology 39 (2016) 18–24. <https://doi.org/0.1016/j.trim.2016.09.003>.

“Cellular and antibody-mediated rejection processes and also interstitial fibrosis/tubular atrophy (IFTA) lead to allograft dysfunction and loss. The search for accurate, specific and non-invasive diagnostic tools is still ongoing and essential for successful treatment of renal transplanted patients. Molecular markers in blood cells and serum may serve as diagnostic tools but studies with high patient numbers and differential groups are rare. We validated the potential value of several markers on mRNA level in blood cells and serum protein level in 166 samples from kidney transplanted patients under standard immunosuppressive therapy (steroids±mycophenolic acid±calcineurin inhibitor) with stable graft function, urinary tract infection (UTI), IFTA, antibody-mediated rejection (ABMR), and T-cell-mediated rejection (TCMR) applying RT-PCR and ELISA. The mRNA expression of RANTES, granulysin, granzyme-B, IP-10, Mic-A and Interferon- γ in blood cells did not distinguish specifically between the different pathologies. We furthermore discovered that the mRNA expression of the chemokine IL-8 is significantly lower in samples from IFTA patients than in samples from patients with stable graft function ($p < 0.001$), ABMR ($p < 0.001$), Borderline (BL) TCMR ($p < 0.001$), tubulo-interstitial TCMR ($p < 0.001$) and vascular TCMR ($p < 0.01$), but not with UTI. Serum protein concentrations of granzyme-B, Interferon- γ and IL-8 did not differ between the patient groups, RANTES concentration was significantly different when comparing UTI and

ABMR ($p < 0.01$), whereas granulysin, Mic-A and IP-10 measurement differentiated ongoing rejection or IFTA processes from stable graft function but not from each other. The measurement of IL-8 mRNA in blood cells distinguishes clearly between IFTA and other complication after kidney transplantation and could easily be used as diagnostic tool in the clinic.”

3. Diskussion

Die Verwendung des derzeitig zur Verfügung stehenden Portfolios immunsuppressiver Medikamente erlaubt die effektive Behandlung T-Lymphozyten-vermittelter Rejektionen nach Nierentransplantation mit anschließender guter Langzeitfunktion. Gleichwohl könnte die Identifizierung spezifischer und sensitiver Marker dazu beitragen, die Weiterentwicklung individualisierter Therapien zu fördern und somit eine Optimierung des Verhältnisses ihrer Kosten, Nutzen und des entsprechenden Risikos zu erlauben. Speziell die T-Lymphozyten-medierten Rejektionen mit vaskulärer Komponente (TCMVR), d.h. nach Banff-Klassifikation Typ II und III, sollten möglichst frühzeitig erkannt werden, da Patienten mit dieser Form im Vergleich zum tubulär-interstitiellen Typ ein vermindertes Transplantatüberleben aufzeigen [72, 73]. Auch scheint die Wahrscheinlichkeit des Ansprechens auf die Anti-Rejektions-Therapie mit dem Schweregrad der vaskulären Rejektion zu sinken [68]. Basierend auf Microarray-Experimenten konnten im Rahmen einer der vorgelegten Arbeiten Kandidaten-MicroRNAs identifiziert und validiert werden, welche in Kombination Patienten mit schwerer TCMVR von Patienten mit Harnwegsinfekten, IFTA, ABMR, Borderline (BL)-Rejektion und tubulär-interstitieller Rejektion differenzieren [74]. Dieses Ergebnis birgt nach umfassender Validierung durchaus das Potential, die diagnostischen Möglichkeiten zu ergänzen und eine zeitnahe Therapie der vaskulären Rejektion einzuleiten. Als labortechnisch weniger aufwendig und ökonomischer zeigt sich die Messung der Expression freier MicroRNA in Serum und Plasma, auch sind die Moleküle in dieser Umgebung sehr stabil und trotz der hohen RNase-Konzentration verlässlich messbar [75]. Zusätzlich interessiert der Expressionsvergleich und damit die Bewertung des Potentials von Kandidaten in Blutzellen und in freier Form. In einer vorgelegten Arbeit wurde dieser Sachverhalt durch die Messung der für die Diagnosestellung von TCMVR überzeugenden Kandidaten-MicroRNAs durch ihre Messung in Plasma bzw. Serum geprüft [76]. Die Messung der Kandidaten-Marker in freier Form erlaubte die Diskriminierung von TCMVR und Harnwegsinfekten und auch stabiler Transplantatfunktion. Jedoch unterschied sich die Expressionsstärke nicht signifikant gegenüber ABMR bzw. IFTA. Obwohl Blutzellen eine Quelle für zirkulierende MicroRNAs darstellen [77], konnte in unseren Studien nicht gezeigt werden, dass die Expression in Blutzellen und in freier Form korreliert. Ergebnisse von Markerstudien in Blutzellen lassen sich folglich nicht auf Serum bzw. Plasma übertragen. Grundsätzlich wurden jedoch besonders in der Krebsforschung [78-80], aber auch

in Studien zu Nierenerkrankungen [81-83], freie bzw. zirkulierende MicroRNAs als mögliche Biomarker für die Diagnosestellung, Prognose oder auch das Therapieansprechen postuliert. Die hochinteressante Frage des Ursprungs von freien bzw. zirkulierenden MicroRNAs wird derzeit kontrovers diskutiert. Sie bildet die Basis für ein weites Forschungsfeld, denn freie MicroRNAs werden in einer Vielzahl von Körperflüssigkeiten gefunden. Nicht nur in Serum und Plasma konnte ein Nachweis erfolgen, sondern beispielweise auch in Urin, Speichel, Tränenflüssigkeit, Muttermilch, Kolostrum und Peritonealflüssigkeit [84]. Aufgrund von gefundenen Expressionsmustern wird vermutet, dass MicroRNAs nicht nur passiv von Zellen abgegeben, sondern selektiv sezerniert werden können [85]. Tatsächlich können nicht-kodierende RNAs wie MicroRNAs Funktionen auch außerhalb ihrer Ursprungszellen ausüben und sogar aus den Körperflüssigkeiten von anderen Zellen aufgenommen werden [86]. Diese Vorgänge sollten im Kontext der Transplantation im Detail untersucht werden. Im Unterschied zu Transplantationen anderer Organe wären nach Nierentransplantation Untersuchungen der Zusammenhänge im Urin besonders aufschlussreich.

Neben der bereits diskutierten TCMR mit positiver Prognose kann nach Nierentransplantation weiterhin die ABMR auftreten. Die erreichte gute Langzeitfunktion nach einer TCMR kann nach einer ABMR und im Besonderen bei Auftreten ihrer chronischen Form nicht beobachtet werden. Die Diagnose ABMR geht häufig mit einem Langzeitversagen des Transplantats einher [87-90]. Es steht sowohl keine standardisierte, wirkungsreiche Therapie zur Verfügung als auch keine Möglichkeit, Patienten mit einem hohen ABMR Risiko frühzeitig zu identifizieren. Weiterhin ist die effektive Prävention von DSA und HLA-Antikörper-Konstituierung derzeit nicht erreicht. Dies ist auch im Kontext von potentiellen zukünftigen Transplantationen nach Verlust des ersten Transplantats zu beachten, da ein stark sensibilisiertes Immunsystem mit präformierten DSA den Erfolg wiederholter Eingriffe gefährdet. Die Suche nach nicht-invasiv messbaren Biomarkern wird als besonders dringlich empfunden, da die Antikörper-vermittelten Prozesse, die zum histologischen Bild ABMR und damit zu einer schlechten Prognose führen, oftmals subklinisch, sehr langsam und indolent verlaufen. Zwei der vorgestellten Studien beruhen auf Hochdurchsatz-Sequenzierungen von kurzen und langen RNAs aus Blutzellen von Patienten mit ABMR im Vergleich zu TCMR sowie stabiler Transplantatfunktion. Im Rahmen der Validierung von Kandidaten durch die Untersuchung der Expressionsunterschiede von MicroRNAs zwischen verschiedenen Patientengruppen wurde

ein überraschendes Ergebnis gefunden. Die Kandidaten-MicroRNA miR-145-5p erwies sich nicht als spezifisch für ABMR, sondern als hochspezifisch für IFTA nach Nierentransplantation [91]. Der deskriptive Term IFTA wird seit 2005 herangezogen [30], um interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie der transplantierten Niere zu beschreiben, wenn die Ätiologie der zugrundeliegenden nicht-immunologischen bzw. immunologischen Prozesse nicht bestimmbar ist. Ergebnisse wie das o.g. zeigen deutlich auf, wie essentiell die Analyse von Kandidatenmarkern in einer Vielzahl von Patientengruppen mit den verschiedensten Pathologien nach Nierentransplantation ist. ABMR wird in der Banff-Klassifikation u.a. auch durch fibrotische Vorgänge beschrieben und verschiedene Studien bringen miR-145-5p mit Fibrose in Verbindung [92, 93]. Durchaus gerechtfertigt wäre folglich die Hypothese, dass es nach der Identifizierung der miR-145-5p Ursprungszellen im Blut möglich wäre, die Mechanismen einer möglichen Rekrutierung dieser Zellen zur transplantierten Niere und die Beteiligung an fibrotischen Veränderungen bei IFTA, aber auch ABMR zu beleuchten. Grundsätzlich bildet also die Feststellung der Ursprungszellen von spezifischen Markern und besonders der in dieser Hinsicht noch nicht im Detail untersuchten MicroRNAs die Grundlage für weiterführende Studien. Nur solche Analysen werden schlussendlich die Aufschlüsselung von molekularen Mechanismen erlauben, welche zur Identifizierung von Therapiezielen sowie zur Entwicklung von prognostischen und diagnostischen Tests für ABMR führen können.

Die Hochdurchsatz-Sequenzierungen von langen, kodierenden mRNAs in Blutzellen von nierentransplantierten Patienten mit ABMR führten zur Identifizierung von Kandidaten, die interessanterweise zu einem Cluster von Genen gehören, die IFN-induzierbar sind. Besonders die Signalwege, in die IFN Typ I involviert ist, sind für den Crosstalk zwischen angeborener und adaptiver Immunität nach Transplantation relevant [94, 95], wobei die Toll-like-Rezeptoren (TLR) eine zentrale Rolle zu spielen scheinen [96-99]. Interferon Signalwege und damit auch Interferon-induzierbare Gene (IFIGs) scheinen in Patienten mit Autoimmunerkrankungen reguliert zu sein [100]. Diese Erkenntnis führte tatsächlich zur Entwicklung eines therapeutischen Ansatzes für Patienten mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) [101, 102]. Als besonders interessant sind diese Entwicklungen zu beurteilen, da ähnliche Mechanismen der Pathogenesen von SLE und ABMR vermutet werden, die IFN sowie IFIGs beinhalten [103]. Die vorgestellte Studie bestätigt die Regulation von IFIGs in ABMR und erweitert damit die Analysen von Rascio et al. [104]. Eine solide Grundlage für weitere Studien

zur Expression und Bedeutung von IFIGs nach Nierentransplantation ist somit geschaffen, wobei zu bemerken ist, dass sich die Ergebnisse der mRNA Analysen in Blutzellen nicht auf die Proteinebene in Serum sowie Plasma übertragen ließen [104].

Aufgrund des geringeren Aufwands für Zeit, Methodik und Kosten ist aber gerade die Messung der Proteinexpression in Körperflüssigkeiten wie Serum, Plasma und Urin nach einer Nierentransplantation bei der Suche nach nicht-invasiv messbaren Biomarkern attraktiver als die Messung der mRNA Expression. Zahlreiche Marker wurden im Rahmen der in den letzten Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführten Proteomanalysen vorgeschlagen. Zwei der hier vorgestellten Studien beschäftigen sich mit diesen interessanten Kandidaten und analysierten ihre Expression in Patienten mit den verschiedensten Pathologien nach Nierentransplantation [105, 106]. Bereits mehrfach wurde die Expression des Chemokins IP-10 im Serum mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht [107]. Auch sein Vorkommen im Urin ließ sich mit pathologischen Vorkommnissen nach Nierentransplantation korrelieren [108-110]. Diese Ergebnisse konnten durch die Studie bestätigt und erheblich erweitert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die nicht-invasive Messung der Proteinkonzentration im Urin nicht ausschließlich diagnostischen, sondern ebenfalls prognostischen Wert aufwies, bevor ein Anstieg des Serumkreatinins eine eingeschränkte Nierenfunktion anzeigte [105], wobei diese Ergebnisse nicht auf Messungen im Serum übertragen werden konnten. Die beschriebenen Analysen liegen bereits über ein Jahrzehnt zurück und zahlreiche weitere Studien zu IP-10 als nicht-invasivem Biomarkerkandidaten sind durchgeführt worden [111-116]. Auch wenn dieser Marker nicht übergreifend in den Klinikbetrieb als unterstützendes diagnostisches Mittel integriert wurde, wird seine Messung in Patientenserum doch z.B. vom Institut für Medizinische Diagnostik Berlin-Potsdam GbR zum Nachweis einer T-zellulär-induzierten Immunaktivierung sowie zur Verlaufskontrolle und Monitoring immunmodulierender Therapien angeboten.

Zahlreiche Forschergruppen haben auf Genchips (Microarray) bzw. Hochdurchsatzsequenzierungen basierte Studien zur Biomarkersuche nach Nierentransplantation durchgeführt und publiziert. Es konnten für die verschiedenen Arten von Rejektion [69, 117-125] oder Transplantatdysfunktion [69, 126-129] spezifische Marker

oder Markersignaturen in Biopsiematerial oder weniger invasiv im Blut bzw. Urin gefunden werden. Es muss jedoch angemerkt werden, dass diese Untersuchungen fast ausschließlich an einzelnen Zentren mit relativ geringen Patientenzahlen und nicht ausreichenden Kontrollgruppen durchgeführt wurden. Eine Validierung der Ergebnisse durch Multi-Center-Studien mit großen Patientenkohorten steht noch aus, um einen tatsächlichen diagnostischen oder sogar prognostischen Wert zu bestimmen. Zusätzlich muss bei der Betrachtung biologischer Proben wie Blut oder Urin deren heterogene Zusammensetzung berücksichtigt werden. Regulatorische Moleküle wie z.B. MicroRNAs können mehrere Ziel-Gene haben, kommen in den verschiedensten Geweben vor und „verhalten“ sich folglich dynamisch. Auch die Zusammensetzung der Zellen im Blut bzw. des Zellsedimentes im Urin kann variieren. Deshalb sind parallel zu den Markermessungen durchgeführte Analysen zur Zellularität zur Interpretation von Expressionsmustern und –Regulation eigentlich unumgänglich, werden jedoch selten durchgeführt. In einer der vorgestellten Arbeiten konnte so eine detailreiche Teilstudie zur Zellverteilung im Blut präsentiert werden [74].

Qualitativ hochwertig durchgeführte Studien, die auf Discovery-Analysen von Hochdurchsatzsequenzierungen bzw. Genchipexperimenten beruhen, können als wertvolle Grundlage für mechanistische Studien dienen, die langfristig zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze führen könnten. Besonders im Kontext der ABMR müssen die sehr variablen Formen ihres Auftretens und damit die Komplexität ihrer Ursachen beachtet und untersucht werden [130]. Dazu gehören die Aufklärung genetischer Polymorphismen, welche die B-Lymphozyten-Funktionen beeinflussen, aber auch der individuellen Effektorfunktionen von Antikörpern. Weiterhin treten oftmals Mischformen von ABMR und TCMR auf, die ein komplexes Behandlungsschema erfordern. Sowohl die Identifizierung nicht-invasiver Biomarker nach Nierentransplantation als auch ihre Applikation in mechanistischen Untersuchungen soll letztendlich die Entwicklung individualisierter Therapien der nierentransplantierten Patienten fördern und damit das Langzeitüberleben sowie die Langzeitfunktion des Transplantats sichern.

Ganz sicher muss der Ansatz gewählt und weitergeführt werden, dass dem Rejektionsgeschehen, im Besonderen den Antikörper-vermittelten Mechanismen, ein hoch komplexes System aus Signalen und Vernetzungen zwischen verschiedenen Immunzellen,

Geweben und Molekülen zugrunde liegt. Die gleichen molekularen Signalwege können an der Entstehung differenter Krankheitsbilder nach einer Nierentransplantation beteiligt sein, auch können unterschiedliche Mechanismen zu identischen klinischen Beschwerden führen. Es erscheint demnach höchst unwahrscheinlich, dass ein einzelner Biomarker bzw. Parameter zur sensitiven und spezifischen Feststellung der mannigfaltigen Formen und damit auch Ursachen der Rejektion und Dysfunktion einer Transplantatniere zu identifizieren sein wird. Vermutlich wird vielmehr eine praktikable, standardisierte und kosteneffektive Kombination mehrerer Parameter dazu beitragen, in der Zukunft das Monitoring, die Diagnosestellung und damit die individualisierte Therapie von nierentransplantierten Patienten zu reformieren und zu verbessern.

4. Zusammenfassung

Die Transplantation einer gesunden Spenderniere ist die etablierte Behandlungsmethode der Wahl bei terminaler Niereninsuffizienz. Trotz hervorragender Kurzzeit-Überlebensraten des Transplantats, die durch Weiter- und Neuentwicklungen immunsuppressiver Therapieschemata sowie eine gute Typisierungsqualität und Patientenversorgung erreicht werden konnten, gefährdet doch jede Rejektionsepisode den Transplantationserfolg. Neben der T-Lymphozyten-vermittelten Rejektion sowie der Interstitiellen Fibrose/Tubulären Atrophie ist besonders die durch Antikörper medierte Rejektion als Hauptrisikofaktor für Transplantatschädigung und –Verlust zu nennen. Eine möglichst frühe spezifische, sensitive und wenig invasive Diagnose dieser Komplikationen nach einer Nierentransplantation wäre folglich von großem Interesse für die Klinik. Die Identifizierung kodierender RNAs und ihrer Translationsprodukte, aber auch nichtkodierender RNAs, die in Rejektionsmechanismen involviert und infolgedessen reguliert sind, könnte zur Entwicklung neuer Monitoringstrategien und Möglichkeiten zur Diagnostik beitragen.

Basierend auf Genchip-Experimenten sowie Hochdurchsatzsequenzierungen konnten in Studien mit großen Kohorten von Patienten mit verschiedenen Pathologien nach Nierentransplantation Kandidatenmarker in Zellen des peripheren Blutes identifiziert und validiert werden, deren Expressionsregulierung hinweisend für Antikörper-vermittelte Rejektion, T-Lymphozyten-vermittelte Rejektion und Interstitielle Fibrose/Tubuläre Atrophie sein kann. Hierbei wurden sowohl kodierende RNAs als auch nicht-kodierende MicroRNAs analysiert. Weiterhin wurde die Expression der MicroRNA-Kandidaten in freier Form sowie die Translationsprodukte der mRNA-Kandidaten in Serum bzw. Plasma und auch im Urin untersucht. Der besondere Fokus lag dabei auf dem Vergleich von differierenden Komplikationen nach einer Nierentransplantation mit entsprechend voneinander abweichenden Therapieschemata, um eine spezifische und sensitive Diagnosestellung zu erlauben. Um die Möglichkeiten zur Translation der Ergebnisse in die Klinik zu bewerten, sind Folgestudien unter Einbindung mehrerer Transplantationszentren und damit einer hohen Patientenzahl zwingend notwendig.

Wünschenswert sind weiterhin mechanistische Studien, die über die Identifizierung von Biomarkern für Komplikationen nach Nierentransplantation hinausgehen. Ein tieferes Verständnis der Pathologien von Antikörper-vermittelten Rejektion, T-Lymphozyten-vermittelten Rejektion und Interstitieller Fibrose/Tubulärer Atrophie könnte die Weiterentwicklung von individualisierten Behandlungsmöglichkeiten der nierentransplantierten Patienten fördern.

5. Literaturangaben

1. Vanholder, R., et al., *Deleting Death and Dialysis: Conservative Care of Cardio-Vascular Risk and Kidney Function Loss in Chronic Kidney Disease (CKD)*. Toxins (Basel), 2018. **10**(6).
2. Benjamin, O. and S.L. Lappin, *End-Stage Renal Disease*, in *StatPearls*. 2018: Treasure Island (FL).
3. Kooman, J.P., et al., *Hemodialysis: A model for extreme physiology in a vulnerable patient population*. Semin Dial, 2018. **31**(5): p. 500-506.
4. Hakimi, S.S., et al., *Carotid artery stenosis in patients with chronic kidney disease undergoing dialysis: epidemiological aspects, main risk factors and appropriate diagnostic criteria*. Saudi J Kidney Dis Transpl, 2014. **25**(1): p. 58-65.
5. Deng, D. and A. Forbes, *Cardiovascular Risk Factors in Patients on Dialysis*. Nephrol Nurs J, 2015. **42**(1): p. 45-50; quiz 51.
6. Huang, K.W., et al., *Different peptic ulcer bleeding risk in chronic kidney disease and end-stage renal disease patients receiving different dialysis*. Dig Dis Sci, 2014. **59**(4): p. 807-13.
7. Colaneri, J., *An Overview of Transplant Immunosuppression--History, Principles, and Current Practices in Kidney Transplantation*. Nephrol Nurs J, 2014. **41**(6): p. 549-60; quiz 561.
8. Becker, L.E., C. Morath, and C. Suesal, *Immune mechanisms of acute and chronic rejection*. Clin Biochem, 2016. **49**(4-5): p. 320-3.
9. Hara, S., *Cell mediated rejection revisited: Past, current, and future directions*. Nephrology (Carlton), 2018. **23 Suppl 2**: p. 45-51.
10. Wong, T.C., C.M. Lo, and J.Y. Fung, *Emerging drugs for prevention of T-cell mediated rejection in liver and kidney transplantation*. Expert Opin Emerg Drugs, 2017. **22**(2): p. 123-136.
11. Bamoulid, J., et al., *Advances in pharmacotherapy to treat kidney transplant rejection*. Expert Opin Pharmacother, 2015. **16**(11): p. 1627-48.
12. Moreso, F., et al., *Subclinical rejection associated with chronic allograft nephropathy in protocol biopsies as a risk factor for late graft loss*. Am J Transplant, 2006. **6**(4): p. 747-52.
13. Randhawa, P., *T-cell-mediated rejection of the kidney in the era of donor-specific antibodies: diagnostic challenges and clinical significance*. Curr Opin Organ Transplant, 2015. **20**(3): p. 325-32.
14. Lucas, J.G., et al., *Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: an update*. Expert Opin Pharmacother, 2011. **12**(4): p. 579-92.
15. Kim, M., et al., *Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: a review of pathophysiology, diagnosis, and treatment options*. Pharmacotherapy, 2014. **34**(7): p. 733-44.
16. Zou, Y., et al., *Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection*. N Engl J Med, 2007. **357**(13): p. 1293-300.
17. Reinsmoen, N.L., et al., *Anti-angiotensin type 1 receptor antibodies associated with antibody mediated rejection in donor HLA antibody negative patients*. Transplantation, 2010. **90**(12): p. 1473-7.
18. Mohanakumar, T., et al., *Serological characterization of antibodies eluted from chronically rejected human renal allografts*. Transplantation, 1981. **32**(1): p. 61-6.
19. Colvin, R.B. and R.N. Smith, *Antibody-mediated organ-allograft rejection*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(10): p. 807-17.
20. Sautenet, B., et al., *One-year Results of the Effects of Rituximab on Acute Antibody-Mediated Rejection in Renal Transplantation: RITUX ERAH, a Multicenter Double-blind Randomized Placebo-controlled Trial*. Transplantation, 2016. **100**(2): p. 391-9.
21. Eskandary, F., et al., *A Randomized Trial of Bortezomib in Late Antibody-Mediated Kidney Transplant Rejection*. J Am Soc Nephrol, 2018. **29**(2): p. 591-605.
22. Legendre, C., et al., *Eculizumab in renal transplantation*. Transplant Rev (Orlando), 2013. **27**(3): p. 90-2.

23. Lefaucheur, C., et al., *Complement-Activating Anti-HLA Antibodies in Kidney Transplantation: Allograft Gene Expression Profiling and Response to Treatment*. J Am Soc Nephrol, 2018. **29**(2): p. 620-635.
24. Park, W.D., et al., *Fibrosis with inflammation at one year predicts transplant functional decline*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(11): p. 1987-97.
25. Nankivell, B.J., et al., *The natural history of chronic allograft nephropathy*. N Engl J Med, 2003. **349**(24): p. 2326-33.
26. Haas, M., et al., *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): p. 293-307.
27. Haas, M., *Chronic allograft nephropathy or interstitial fibrosis and tubular atrophy: what is in a name?* Curr Opin Nephrol Hypertens, 2014. **23**(3): p. 245-50.
28. Racusen, L.C., et al., *Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection*. Am J Transplant, 2003. **3**(6): p. 708-14.
29. Solez, K., et al., *Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions*. Am J Transplant, 2008. **8**(4): p. 753-60.
30. Solez, K., et al., *Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN')*. Am J Transplant, 2007. **7**(3): p. 518-26.
31. Racusen, L.C., et al., *The Banff 97 working classification of renal allograft pathology*. Kidney Int, 1999. **55**(2): p. 713-23.
32. Mengel, M., et al., *Banff 2011 Meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection*. Am J Transplant, 2012. **12**(3): p. 563-70.
33. Loupy, A., et al., *The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology*. Am J Transplant, 2017. **17**(1): p. 28-41.
34. Gimeno, J., et al., *Impact of the Banff 2013 classification on the diagnosis of suspicious versus conclusive late antibody-mediated rejection in allografts without acute dysfunction*. Nephrol Dial Transplant, 2016. **31**(11): p. 1938-1946.
35. Farkash, E.A. and R.B. Colvin, *Diagnostic challenges in chronic antibody-mediated rejection*. Nat Rev Nephrol, 2012. **8**(5): p. 255-7.
36. Furness, P.N., N. Taub, and P. Convergence of European Renal Transplant Pathology Assessment Procedures, *International variation in the interpretation of renal transplant biopsies: report of the CERTPAP Project*. Kidney Int, 2001. **60**(5): p. 1998-2012.
37. Safa, K., C.N. Magee, and J. Azzi, *A critical review of biomarkers in kidney transplantation*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2017. **26**(6): p. 509-515.
38. Bonneau, E., et al., *Metabolomics: Perspectives on potential biomarkers in organ transplantation and immunosuppressant toxicity*. Clin Biochem, 2016. **49**(4-5): p. 377-84.
39. Wishart, D.S., *Metabolomics in monitoring kidney transplants*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2006. **15**(6): p. 637-42.
40. Mao, Y.Y., et al., *A pilot study of GC/MS-based serum metabolic profiling of acute rejection in renal transplantation*. Transpl Immunol, 2008. **19**(1): p. 74-80.
41. Zhao, X., et al., *Serum metabolomics study of the acute graft rejection in human renal transplantation based on liquid chromatography-mass spectrometry*. J Proteome Res, 2014. **13**(5): p. 2659-67.
42. Wang, J.N., et al., *Prediction of acute cellular renal allograft rejection by urinary metabolomics using MALDI-FTMS*. J Proteome Res, 2008. **7**(8): p. 3597-601.
43. Blydt-Hansen, T.D., et al., *Urinary metabolomics for noninvasive detection of borderline and acute T cell-mediated rejection in children after kidney transplantation*. Am J Transplant, 2014. **14**(10): p. 2339-49.
44. Suhre, K., et al., *Urine Metabolite Profiles Predictive of Human Kidney Allograft Status*. J Am Soc Nephrol, 2016. **27**(2): p. 626-36.

45. Cosola, C., et al., *Microbiota issue in CKD: how promising are gut-targeted approaches?* J Nephrol, 2018.
46. Shore, S.A. and Y. Cho, *Obesity and Asthma: Microbiome-Metabolome Interactions*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2016. **54**(5): p. 609-17.
47. Koppe, L., D. Fouque, and C.O. Soulage, *Metabolic Abnormalities in Diabetes and Kidney Disease: Role of Uremic Toxins*. Curr Diab Rep, 2018. **18**(10): p. 97.
48. Chen, M.X., et al., *Metabolome analysis for investigating host-gut microbiota interactions*. J Formos Med Assoc, 2018.
49. Nordstrom, A. and R. Lewensohn, *Metabolomics: moving to the clinic*. J Neuroimmune Pharmacol, 2010. **5**(1): p. 4-17.
50. Erpicum, P., et al., *Non-invasive approaches in the diagnosis of acute rejection in kidney transplant recipients, part II: omics analyses of urine and blood samples*. Clin Kidney J, 2017. **10**(1): p. 106-115.
51. Clarke, W., et al., *Characterization of renal allograft rejection by urinary proteomic analysis*. Ann Surg, 2003. **237**(5): p. 660-4; discussion 664-5.
52. Schaub, S., et al., *Proteomic-based detection of urine proteins associated with acute renal allograft rejection*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(1): p. 219-27.
53. O'Riordan, E., et al., *Bioinformatic analysis of the urine proteome of acute allograft rejection*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(12): p. 3240-8.
54. Kienzl-Wagner, K., J. Pratschke, and G. Brandacher, *Proteomics--a blessing or a curse? Application of proteomics technology to transplant medicine*. Transplantation, 2011. **92**(5): p. 499-509.
55. Hricik, D.E., et al., *Multicenter validation of urinary CXCL9 as a risk-stratifying biomarker for kidney transplant injury*. Am J Transplant, 2013. **13**(10): p. 2634-44.
56. Jackson, J.A., et al., *Urinary chemokines CXCL9 and CXCL10 are noninvasive markers of renal allograft rejection and BK viral infection*. Am J Transplant, 2011. **11**(10): p. 2228-34.
57. Kumar Kingsley, S.M. and B. Vishnu Bhat, *Role of MicroRNAs in the development and function of innate immune cells*. Int Rev Immunol, 2017. **36**(3): p. 154-175.
58. Mehta, A. and D. Baltimore, *MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(5): p. 279-94.
59. Stittrich, A.B., et al., *The microRNA miR-182 is induced by IL-2 and promotes clonal expansion of activated helper T lymphocytes*. Nat Immunol, 2010. **11**(11): p. 1057-62.
60. Haftmann, C., et al., *miR-148a is upregulated by Twist1 and T-bet and promotes Th1-cell survival by regulating the proapoptotic gene Bim*. Eur J Immunol, 2015. **45**(4): p. 1192-205.
61. O'Connell, R.M., et al., *Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(2): p. 111-22.
62. Lodish, H.F., et al., *Micromanagement of the immune system by microRNAs*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(2): p. 120-30.
63. Trionfini, P., A. Benigni, and G. Remuzzi, *MicroRNAs in kidney physiology and disease*. Nat Rev Nephrol, 2015. **11**(1): p. 23-33.
64. Li, R., et al., *MicroRNAs in Diabetic Kidney Disease*. Int J Endocrinol, 2014. **2014**: p. 593956.
65. Duffield, J.S., M. Grafals, and D. Portilla, *MicroRNAs are potential therapeutic targets in fibrosing kidney disease: lessons from animal models*. Drug Discov Today Dis Models, 2013. **10**(3): p. e127-e135.
66. Patel, V. and L. Nouredine, *MicroRNAs and fibrosis*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2012. **21**(4): p. 410-6.
67. Chafin, C.B. and C.M. Reilly, *MicroRNAs implicated in the immunopathogenesis of lupus nephritis*. Clin Dev Immunol, 2013. **2013**: p. 430239.
68. Haas, M., et al., *Acute renal allograft rejection with intimal arteritis: histologic predictors of response to therapy and graft survival*. Kidney Int, 2002. **61**(4): p. 1516-26.
69. Halloran, P.F., et al., *Review: The transcripts associated with organ allograft rejection*. Am J Transplant, 2018. **18**(4): p. 785-795.

70. Loupy, A., et al., *Molecular microscope strategy to improve risk stratification in early antibody-mediated kidney allograft rejection*. J Am Soc Nephrol, 2014. **25**(10): p. 2267-77.
71. Sis, B., et al., *Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining*. Am J Transplant, 2009. **9**(10): p. 2312-23.
72. Wu, K., et al., *The severity of acute cellular rejection defined by Banff classification is associated with kidney allograft outcomes*. Transplantation, 2014. **97**(11): p. 1146-54.
73. Kooijmans-Coutinho, M.F., et al., *Interstitial rejection, vascular rejection, and diffuse thrombosis of renal allografts. Predisposing factors, histology, immunohistochemistry, and relation to outcome*. Transplantation, 1996. **61**(9): p. 1338-44.
74. Matz, M., et al., *Identification of T Cell-Mediated Vascular Rejection After Kidney Transplantation by the Combined Measurement of 5 Specific MicroRNAs in Blood*. Transplantation, 2016. **100**(4): p. 898-907.
75. Creemers, E.E., A.J. Tijssen, and Y.M. Pinto, *Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease?* Circ Res, 2012. **110**(3): p. 483-95.
76. Matz, M., et al., *Free microRNA levels in plasma distinguish T-cell mediated rejection from stable graft function after kidney transplantation*. Transpl Immunol, 2016. **39**: p. 52-59.
77. Pritchard, C.C., et al., *Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies*. Cancer Prev Res (Phila), 2012. **5**(3): p. 492-497.
78. Del Vescovo, V., et al., *MicroRNAs as lung cancer biomarkers*. World J Clin Oncol, 2014. **5**(4): p. 604-20.
79. Anwar, S.L. and U. Lehmann, *MicroRNAs: Emerging Novel Clinical Biomarkers for Hepatocellular Carcinomas*. J Clin Med, 2015. **4**(8): p. 1631-50.
80. Ellinger, J., S.C. Muller, and D. Dietrich, *Epigenetic biomarkers in the blood of patients with urological malignancies*. Expert Rev Mol Diagn, 2015. **15**(4): p. 505-16.
81. Ramezani, A., et al., *Circulating and urinary microRNA profile in focal segmental glomerulosclerosis: a pilot study*. Eur J Clin Invest, 2015. **45**(4): p. 394-404.
82. Assmann, T.S., et al., *Circulating miRNAs in diabetic kidney disease: case-control study and in silico analyses*. Acta Diabetol, 2018.
83. Mafi, A., et al., *The effects of expression of different microRNAs on insulin secretion and diabetic nephropathy progression*. J Cell Physiol, 2018. **234**(1): p. 42-50.
84. Weber, J.A., et al., *The microRNA spectrum in 12 body fluids*. Clin Chem, 2010. **56**(11): p. 1733-41.
85. Soheli, M.H., *Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges*. Achievements in the Life Sciences, 2016. **Volume 10**(Issue 2): p. 175-186.
86. Anfossi, S., et al., *Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update*. Nat Rev Clin Oncol, 2018. **15**(9): p. 541-563.
87. Senev, A., et al., *Histological picture of antibody-mediated rejection without donor-specific anti-HLA antibodies: Clinical presentation and implications for outcome*. Am J Transplant, 2018.
88. Luque, S., et al., *Value of monitoring circulating donor-reactive memory B cells to characterize antibody-mediated rejection after kidney transplantation*. Am J Transplant, 2018.
89. Montgomery, R.A., A. Loupy, and D.L. Segev, *Antibody-mediated rejection: New approaches in prevention and management*. Am J Transplant, 2018. **18 Suppl 3**: p. 3-17.
90. Mulley, W.R., et al., *Long-term graft survival in patients with chronic antibody-mediated rejection with persistent peritubular capillaritis treated with intravenous immunoglobulin and rituximab*. Clin Transplant, 2017. **31**(9).
91. Matz, M., et al., *MicroRNA regulation in blood cells of renal transplanted patients with interstitial fibrosis/tubular atrophy and antibody-mediated rejection*. PLoS One, 2018. **13**(8): p. e0201925.

92. Wang, G.D., et al., *Effects of miR-145 on the inhibition of chondrocyte proliferation and fibrosis by targeting TNFRSF11B in human osteoarthritis*. Mol Med Rep, 2017. **15**(1): p. 75-80.
93. Yang, S., et al., *miR-145 regulates myofibroblast differentiation and lung fibrosis*. FASEB J, 2013. **27**(6): p. 2382-91.
94. Robb, R.J. and G.R. Hill, *The interferon-dependent orchestration of innate and adaptive immunity after transplantation*. Blood, 2012. **119**(23): p. 5351-8.
95. Thornley, T.B., et al., *Type 1 IFN mediates cross-talk between innate and adaptive immunity that abrogates transplantation tolerance*. J Immunol, 2007. **179**(10): p. 6620-9.
96. Farrar, C.A., J.W. Kupiec-Weglinski, and S.H. Sacks, *The innate immune system and transplantation*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013. **3**(10): p. a015479.
97. Braza, F., et al., *Role of TLRs and DAMPs in allograft inflammation and transplant outcomes*. Nat Rev Nephrol, 2016. **12**(5): p. 281-90.
98. Howell, J., et al., *Role of toll-like receptors in liver transplantation*. Liver Transpl, 2014. **20**(3): p. 270-80.
99. Hosseinzadeh, M., et al., *Increased Expression of Toll-Like Receptors 2 and 4 in Renal Transplant Recipients that Develop Allograft Dysfunction: A Cohort Study*. Iran J Immunol, 2017. **14**(1): p. 24-34.
100. Baechler, E.C., P.K. Gregersen, and T.W. Behrens, *The emerging role of interferon in human systemic lupus erythematosus*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(6): p. 801-7.
101. Riggs, J.M., et al., *Characterisation of anifrolumab, a fully human anti-interferon receptor antagonist antibody for the treatment of systemic lupus erythematosus*. Lupus Sci Med, 2018. **5**(1): p. e000261.
102. Furie, R., et al., *Anifrolumab, an Anti-Interferon-alpha Receptor Monoclonal Antibody, in Moderate-to-Severe Systemic Lupus Erythematosus*. Arthritis Rheumatol, 2017. **69**(2): p. 376-386.
103. Rascio, F., et al., *A type I interferon signature characterizes chronic antibody-mediated rejection in kidney transplantation*. J Pathol, 2015. **237**(1): p. 72-84.
104. Matz, M., et al., *The Regulation of IFN Type I Pathway Related Genes RSAD2 and ETV7 Specifically Indicate Antibody-Mediated Rejection After Kidney Transplantation*. Clin Transplant, 2018: p. e13429.
105. Matz, M., et al., *Early post-transplant urinary IP-10 expression after kidney transplantation is predictive of short- and long-term graft function*. Kidney Int, 2006. **69**(9): p. 1683-90.
106. Matz, M., et al., *The selective biomarker IL-8 identifies IFTA after kidney transplantation in blood cells*. Transpl Immunol, 2016. **39**: p. 18-24.
107. Antonelli, A., et al., *Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)10 in autoimmune diseases*. Autoimmun Rev, 2014. **13**(3): p. 272-80.
108. Panzer, U., et al., *CXCR3 and CCR5 positive T-cell recruitment in acute human renal allograft rejection*. Transplantation, 2004. **78**(9): p. 1341-50.
109. Hu, H., et al., *Elevation of CXCR3-binding chemokines in urine indicates acute renal-allograft dysfunction*. Am J Transplant, 2004. **4**(3): p. 432-7.
110. Tatapudi, R.R., et al., *Noninvasive detection of renal allograft inflammation by measurements of mRNA for IP-10 and CXCR3 in urine*. Kidney Int, 2004. **65**(6): p. 2390-7.
111. Xu, C.X., et al., *Multiple-biomarkers provide powerful prediction of early acute renal allograft rejection by combination of serum fractalkine, IFN-gamma and IP-10*. Transpl Immunol, 2018. **50**: p. 68-74.
112. Seo, J.W., et al., *Both absolute and relative quantification of urinary mRNA are useful for non-invasive diagnosis of acute kidney allograft rejection*. PLoS One, 2017. **12**(6): p. e0180045.
113. Raza, A., et al., *The association of urinary interferon-gamma inducible protein-10 (IP10/CXCL10) levels with kidney allograft rejection*. Inflamm Res, 2017. **66**(5): p. 425-432.
114. Fairchild, R.L. and M. Suthanthiran, *Urine CXCL10/IP-10 Fingers Ongoing Antibody-Mediated Kidney Graft Rejection*. J Am Soc Nephrol, 2015. **26**(11): p. 2607-9.

115. Lee, J.R., et al., *Urinary cell mRNA profiles predictive of human kidney allograft status*. Immunol Rev, 2014. **258**(1): p. 218-40.
116. Field, M., et al., *The use of NGAL and IP-10 in the prediction of early acute rejection in highly sensitized patients following HLA-incompatible renal transplantation*. Transpl Int, 2014. **27**(4): p. 362-70.
117. Iwasaki, K., et al., *MiR-142-5p and miR-486-5p as biomarkers for early detection of chronic antibody-mediated rejection in kidney transplantation*. Biomarkers, 2017. **22**(1): p. 45-54.
118. Danger, R., et al., *Expression of miR-142-5p in peripheral blood mononuclear cells from renal transplant patients with chronic antibody-mediated rejection*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e60702.
119. Tao, J., et al., *Serum MicroRNA-99a Helps Detect Acute Rejection in Renal Transplantation*. Transplant Proc, 2015. **47**(6): p. 1683-7.
120. Soltaninejad, E., et al., *Differential expression of microRNAs in renal transplant patients with acute T-cell mediated rejection*. Transpl Immunol, 2015. **33**(1): p. 1-6.
121. Betts, G., et al., *Examination of serum miRNA levels in kidney transplant recipients with acute rejection*. Transplantation, 2014. **97**(4): p. e28-30.
122. Lorenzen, J.M., et al., *Urinary miR-210 as a mediator of acute T-cell mediated rejection in renal allograft recipients*. Am J Transplant, 2011. **11**(10): p. 2221-7.
123. Reeve, J., et al., *Assessing rejection-related disease in kidney transplant biopsies based on archetypal analysis of molecular phenotypes*. JCI Insight, 2017. **2**(12).
124. Jamshaid, F., et al., *Novel non-invasive biomarkers diagnostic of acute rejection in renal transplant recipients: A systematic review*. Int J Clin Pract, 2018: p. e13220.
125. Lo, D.J., B. Kaplan, and A.D. Kirk, *Biomarkers for kidney transplant rejection*. Nat Rev Nephrol, 2014. **10**(4): p. 215-25.
126. Glowacki, F., et al., *Increased circulating miR-21 levels are associated with kidney fibrosis*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e58014.
127. Soltaninejad, E., et al., *Altered Expression of MicroRNAs Following Chronic Allograft Dysfunction with Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy*. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2015. **14**(6): p. 615-23.
128. Scian, M.J., et al., *MicroRNA profiles in allograft tissues and paired urines associate with chronic allograft dysfunction with IF/TA*. Am J Transplant, 2011. **11**(10): p. 2110-22.
129. Menon, M.C., B. Murphy, and P.S. Heeger, *Moving Biomarkers toward Clinical Implementation in Kidney Transplantation*. J Am Soc Nephrol, 2017. **28**(3): p. 735-747.
130. Banham, G.D. and M.R. Clatworthy, *B-cell biomarkers in transplantation--from genes to therapy*. Tissue Antigens, 2015. **85**(2): p. 82-92.

Danksagung

Für die stetige und großzügige Unterstützung sowie die Möglichkeit zur freien Entfaltung im Nephrologischen Forschungslabor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und Internistische Intensivmedizin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Klemens Budde und Herrn Prof. Dr. Neumayer. Den Grundstein für mein Interesse an der Transplantationsimmunologie und somit auch für diese Arbeit haben Herr Prof. H.-D. Volk und Frau Prof. Petra Reinke gelegt, dafür bedanke ich mich. Für seine großartigen wissenschaftlichen Ideen, Anregungen und immerwährende Kooperation und Unterstützung danke ich Dr. Mir-Farzin Mashreghi.

Mein weiterer besonderer Dank gilt den nierentransplantierten Patienten der Klinik, die mit ihrer Bereitschaft zur Studienteilnahme die vorliegende Arbeit erst ermöglicht haben.

Stellvertretend für alle Ärzte, deren Unterstützung eine wesentliche Grundlage für die vorliegende Arbeit war, danke ich Dr. Jens Gaedeke, Dr. Michael Dürr, Dr. Ulrike Weber, Dr. Friederike Bachmann, Dr. Evelyn Seelow, Dr. Anne-Katrin Göstemeyer und Nadine Unterwalder.

Insbesondere möchte ich Frau Christine Lorkowski für ihren unermüdlichen Einsatz im Nephrologischen Forschungslabor und unsere konstruktive Zusammenarbeit danken. Mein Dank für ihre technische Unterstützung gilt Katharina Petermann und Marco Mai, sowie Danilo Schmidt, Dr. Frederik Heinrich und Dr. Pawel Durek für ihre unverzichtbare bioinformatische Unterstützung.

Weiterhin danke ich der Charité-Universitätsmedizin für die Förderung meiner Arbeit durch die Gewährung eines Habilitationsstipendiums „Rahel Hirsch“ sowie der Sonnenfeld-Stiftung für ihre Projektförderung.

Abschließend gilt meine besonderer Dank meiner Familie - für einfach alles.... .

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....
Datum

.....
Unterschrift