

Klinik für Nieren- und Hochdruckkrankheiten  
der Medizinischen Hochschule Hannover

Leitung: Prof. Dr. med. H. Haller

**Diagnose der subklinischen und klinischen akuten T-Zell  
vermittelten Rejektion bei Nierentransplantatempfängern  
mittels Proteomanalyse des Urins**

---

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin an der  
Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von

**Christos Chatzikyrkou**

aus Ludwigshafen am Rhein

Hannover 2014

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover am 16.10.2014

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. med. Christopher Baum

Betreuer : Prof. Dr. med. Wilfried Gwinner

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Volkhard Kaefer

Korreferent: PD Dr. med. Gregor Warnecke

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.2014

Promotionsausschussmitglieder:

Prof. Dr. med. Reinhold Schmidt

Prof. Dr. med. Hüseyin Bektas

Prof. Dr. med. Tim Oliver Lankisch

## **Inhaltsverzeichnis**

### **1. Einleitung**

### **2. Material und Methoden**

#### 2.1. Patienten

#### 2.2. Massenspektrometrische Technik

#### 2.3. Morphologische Studien

##### 2.3.1. Immunhistologie zur MMP-8 und Lokisationsnachweis

##### 2.3.2. Kompartimentspezifische Analyse der PREP, MMP-8 und CD-15 Expression mittels Einzel- und Doppelimmunfluoreszenzen

#### 2.4. Statistische Analyse

### **3. Ergebnisse**

#### 3.1. Etablierung und Validierung des diagnostischen Peptidmusters für akute T-Zell vermittelte Rejektionen

#### 3.2. Identifizierung einzelner Peptide

#### 3.3. Lokalisation der PREP/MMP-8 Expression und Relation zur Transplantation

##### 3.3.1 Etablierung der PREP, MMP-8 und CD-15 Färbung in der Einzel- und Doppelimmunfluoreszenz

##### 3.3.2 PREP Einzelexpression, MMP-8 Einzelexpression, und PREP/MMP-8 Doppelexpression in den Biopsien mit und ohne Abstoßung und Korrelation mit der Transplantatfunktion

##### 3.3.3 CD-15 Einzelexpression und PREP/CD-15 Doppelexpression in den Biopsien mit und ohne Abstoßung und Korrelation mit der Nierentransplantatfunktion

##### 3.3.4 Zusammenfassende Gegenüberstellung der Immunfluoreszenzuntersuchungen für PREP, MMP-8 und CD-15.

### **4. Diskussion und Ausblick**

### **5. Zusammenfassung**

### **6. Literaturverzeichnis**

### **7. Anhang Methoden**

### **8. Publikation & Supplements**

### **9. Danksagung**

### **10. Lebenslauf**

### **11. Erklärung nach § 2 Abs.2 Nr. 6 und 7 PromO**

## 1. Einleitung

Die akute Rejektion von Nierentransplantaten ist ein gut beschriebener Risikofaktor, der das kurz- und langfristige Transplantatüberleben erheblich beeinträchtigen kann <sup>(1,2)</sup>. Die zeitgerechte Diagnose und Therapie von Abstoßungsreaktionen ist ausschlaggebend für die Gewährleistung einer guten und stabilen Transplantatfunktion und steht somit im Mittelpunkt der ambulanten Nachbetreuung unserer Patienten. Da heutzutage, nach der Einführung moderner Immunsuppressiva und Gewebetypisierungsverfahren, Rejektionsepisoden klinisch nahezu asymptomatisch ablaufen, stützt sich die Diagnose der akuten Rejektion im Wesentlichen auf Verlaufskontrollen der Nierenfunktion mittels Bestimmung der Serumkreatininwerte. Bei einem anhaltenden und unerklärten Anstieg des Serumkreatinins wird üblicherweise eine Transplantatnierenbiopsie vorgenommen, um eine akute Rejektion zu bestätigen oder auszuschließen. Nachteil dieses Verfahrens ist, dass akute Rejektionen erst in einem Stadium detektiert werden, indem der immunologische Prozess zu morphologischen Veränderungen mit konsekutiver funktioneller Verschlechterung des Transplantates geführt hat. Des Weiteren können mit dieser Strategie subklinisch ablaufende Rejektionen (ohne Funktionsverschlechterung, sog. stumme Abstoßungen), die nach einigen Autoren mit kontinuierlichem Funktionsverlust assoziiert sind <sup>(2-8)</sup>, nicht erfasst werden. Regelmäßig zu vorher festgelegten Zeitpunkten nach der Transplantation und unabhängig von der aktuellen Transplantatfunktion durchgeführte Biopsien („Protokollbiopsien“) könnten diese Rejektionen detektieren und haben in den letzten Jahren eine zunehmende Verbreitung gefunden <sup>(9)</sup>. Protokollbiopsien können aber nicht sicherstellen, dass alle Rejektionsepisoden im Zeitverlauf erfasst werden <sup>(10)</sup>. Weitere Einschränkungen können sein, dass manche Rejektionen aufgrund der Fokalität der Befunde in der Biopsie nicht ausreichend sicher detektiert werden (sampling error). Weitere wichtige Fragen in diesem Zusammenhang sind die Reproduzierbarkeit der histologischen Befunde (interobserver variability) <sup>(11,12)</sup> und die möglichen Risiken der Protokollbiopsien <sup>(13)</sup>. Es wurde daher wiederholt versucht, Surrogatparameter im Urin oder Serum zur Diagnose der akuten Rejektion einzusetzen. Diese beruhen überwiegend auf dem Nachweis von einzelnen Mediatoren aus aktivierten Zellen des adaptiven Immunsystems oder von Molekülen, die durch die sekundäre immunologische Schädigung ortsständiger Zellen des Nierenparenchyms in Blut oder Urin generiert werden. Nicht ausreichende Sensitivität und Spezifität dieser Marker, selbst wenn in Kombination verwendet, sind die Hauptgründe, dass keiner der Tests in der routinemäßigen Nachsorge der Patienten bisher eine Bedeutung erlangt hat <sup>(14)</sup>.

Ausgehend von dem Konzept, dass der komplexe und heterogene Prozess der akuten Rejektion besser detektiert werden kann, wenn eine größere Zahl der relevanten molekularen Vorgänge erfasst wird, hat es Versuche gegeben, mit verschiedenen massenspektrometrischen Verfahren im Urin Peptidmuster zu definieren, die für die akute Rejektion charakteristisch sind (**Tabelle 1**).

| Reference              | Samples to establish the peptide marker set                    | Biopsy                | Proteomic method | Number of peptides for AR diagnosis | Examined confounding factors | Diagnostic performance (AUC) | Independent validation samples        | Biomarker identification (↑ increased; ↓ decreased in AR) |
|------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------|------------------|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Clarke <i>et al</i>    | AR (n=17)<br>noAR (n=15)                                       | +<br>–                | SELDI-MS         | 2                                   | none                         | 0.80-0.84                    | no                                    | none                                                      |
| Schaub <i>et al</i>    | AR (n=18)<br>noAR (n=22)<br>ATI (n=5)<br>GN (n=5)<br>HC (n=28) | +<br>+<br>+<br>+      | SELDI-MS         | 3                                   | CMV                          | not reported                 | no                                    | cleaved $\beta_2$ -microglobulin ↑                        |
| O’Riordan <i>et al</i> | AR (n=23)<br>noAR (n=22)<br>HC (n=20)                          | +<br>–<br>–           | SELDI-MS         | 7                                   | none                         | 0.91                         | no                                    | $\beta$ -defensin ↓<br>$\alpha$ -anti-chymotrypsin ↑      |
| Wittke <i>et al</i>    | AR (n=19)<br>noAR (n=29)<br>UTI (n=19)                         | +<br>+<br>+           | CE-MS            | 17                                  | UTI<br>CMV<br>ATI            | not reported                 | AR (n=9)<br>noAR (n=10)<br>UTI (n=7)  | none                                                      |
| Sigdel <i>et al</i>    | AR (n=10)<br>noAR (n=10)<br>NS (n=10)<br>HC (n=10)             | +<br>+<br>+<br>–      | LC-MS/MS         | 3                                   | none                         | 0.85-0.97                    | AR (n=20)<br>noAR (n=20)<br>HC (n=20) | uromodulin ↓<br>SERPINF1 ↑<br>CD44 ↓                      |
| Ling <i>et al</i>      | AR (n=10)<br>noAR (n=10)<br>BK (n=6)<br>NS (n=10)<br>HC (n=10) | +<br>+<br>+<br>–<br>– | LC-MALDI-TOF-MS  | 40                                  | BK virus                     | 0.96                         | AR (n=10)<br>noAR (n=10)<br>BK (n=4)  | uromodulin ↓<br>diverse collagen fragments ↑; ↓           |

AR= acute renal allograft rejection  
noAR=no acute renal allograft rejection  
ATI=acute tubular injury  
GN=recurrent/de novo glomerulonephritis  
HC=healthy controls with native kidneys  
UTI=urinary tract infection (noAR)  
NS=nephrotic syndrome in native kidneys  
BK=BK virus nephropathy or viuria

SELDI=surface-enhanced laser desorption/ionisation  
MS=mass spectrometry  
CE=capillary electrophoresis  
LC=liquid chromatography  
MALDI=matrix assisted laser desorption/ionisation  
TOF=time of flight  
CMV=cytomegaly viremia  
SERPINF1=pigment epithelium derived factor 1

**Tabelle 1** zeigt wichtige Details der bis jetzt publizierten Studien, in welchen die Proteomanalyse des Urins zur Diagnose der akuten Rejektion nierentransplantierter Patienten benutzt wurde.

Clark und Mitarbeiter haben zuerst mittels SELDI-MS (surface-enhanced laser desorption ionisation mass spectrometry) 2 Peptide identifiziert, die Patienten mit akuter Rejektion von Patienten mit stabiler Transplantatfunktion differenzieren konnten <sup>(15)</sup>. Die Arbeitsgruppe von Schaub berichtete über ein Peptidmuster, das Patienten mit akuter Abstoßung von denen mit akuter tubulärer Nekrose, Harnwegsinfektion, rekurrerender Glomerulonephritis und von gesunden Kontrollen unterscheiden kann <sup>(16)</sup>. Drei dieser Peptide waren Fragmente des  $\beta_2$ -Mikroglobulins, das mit Schädigung der proximalen Tubulusepithelzellen assoziiert ist <sup>(17)</sup>. O’ Riordan und Mitarbeiter wendeten eine gleichartige massenspektrometrische Methode an, um insgesamt 7 Peptide zu identifizieren, welche transplantierte Patienten mit akuter

Rejektion von Transplantierten ohne Rejektion und gesunden nichttransplantierten Kontrollen mit großer Sensitivität unterscheiden <sup>(18)</sup>. Zwei der Peptide wurden konsekutiv als  $\alpha$ -1-Antichymotrypsin und als eine Variante des humanen  $\beta$ -Defensin charakterisiert, beide bekannte Regulatoren des angeborenen Immunsystems <sup>(19)</sup>. In einer älteren Studie aus unserem Zentrum wurde im Gegensatz zu den anderen zitierten Untersuchungen nicht die SELDI-MS basierte Detektion verwendet, sondern die CE-MS Technik (an Kapillarelektrophorese gekoppelte Massenspektrometrie), die ein größeres Spektrum von Peptiden differenzieren kann <sup>(20)</sup>. Die Rejektionsproben waren in allen Fällen Biopsiebestätigte und nach der BANFF-Klassifikation definierte akute Rejektionen aus unserem Protokollbiopsieprogramm. Es wurde dabei ein Set von 17 Peptiden definiert, das 16 von 17 Patienten mit akuter tubulointerstitieller Abstoßung korrekt klassifizieren konnte. Ein kleines unabhängiges Validierungsset von Proben mit und ohne Rejektion sowie Proben mit Harnwegsinfekt ergab eine Rate von 2/10 falsch positiven Befunden und 1/9 falsch negativen Befunden <sup>(21)</sup>. Die Arbeitsgruppe von Sarwal publizierte zwei weitere Studien. In der ersten Studie wurde eine Reihe von rejektionsspezifischen Peptiden identifiziert, die mit Antigenen des Haupthistokompatibilitätskomplexes, Proteinen der Komplement-Kaskade und extrazellulären Matrixproteinen assoziiert sind. Drei dieser Peptide wurden mit einer anderen Methode, nämlich ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), in einer zweiten unabhängigen Gruppe von Patienten validiert. Die Befunde der ELISAs korrelierten gut mit den Ergebnissen der massenspektrometrischen Analyse <sup>(22)</sup>. In der zweiten Studie wurden Urinproben von 50 nierentransplantierten Patienten und 20 Kontrollen analysiert, um insgesamt 40 für eine akute Rejektion spezifische Peptide zu detektieren. Die große Mehrheit dieser Peptide waren Kollagenfragmente und präsentierten sich in reduzierten Konzentrationen während der akuten Rejektion. Genomweite Expressionsanalysen der korrespondierenden Biopsien zeigten eine Hochregulation von Kollagengenen, sowie eine Dysregulation kollagendegradierender Enzyme, wie Metalloproteasen und Kollagenase-Inhibitoren <sup>(23)</sup>.

Sensitivität und Spezifität bei der Detektion akuter Rejektionen bis über 90% wurden in diesen Arbeiten beschrieben. Limitationen sind jedoch die geringen Patientenzahlen zur Etablierung der Peptidmuster, die Tatsache, dass Rejektionen bei den Kontrollen teilweise nicht histologisch ausgeschlossen wurden, die fehlende Validierung der Peptidmuster an einem ausreichend großen unabhängigen Kollektiv, sowie methodische Unterschiede der massenspektrometrischen Verfahren in den einzelnen Studien, welche einen direkten Vergleich der Ergebnisse einschränken. Eine weitere Einschränkung ist die unzureichende Exploration von gleichzeitig vorhandenen Faktoren, die das Urinproteom beeinflussen (confounding factors) und damit das diagnostische Potential der relevanten Peptide

beeinträchtigen können. Zusammenfassend legen diese Studienergebnisse nahe, dass die beschriebenen massenspektrometrischen Methoden das Potential haben, als nicht-invasives Verfahren in der Transplantationsnachsorge akute Rejektionen zu detektieren, vorausgesetzt, die oben genannten Limitationen lassen sich überwinden.

Es ist daher wichtig, eine ausreichend große diagnostische Studie durchzuführen, um ein gut etabliertes Peptidmuster genauer zu untersuchen, bzw. um zu testen, ob es zuverlässig Patienten mit akuter Rejektion von Patienten ohne Nachweis einer Rejektion unterscheiden kann. In diesem Zusammenhang müssen sowohl die erwartete Sensitivität und Spezifität, als auch die potentiellen Limitationen, definiert werden.

Diese Arbeit wollte daher insbesondere folgenden Fragen nachgehen:

1. Ob mit histologisch gut klassifizierten Patienten sich Urinpeptide isolieren lassen, die für die Abstoßung charakteristisch sind.
2. Ob sich dies in einem unabhängigen Kollektiv bestätigen lässt.
3. Ob es an der Gesamtheit des Kollektivs Störfaktoren (confounder) gibt, die zu einer falschen Klassifikation führen.
4. Ob die Identifizierung einzelner Peptide Hinweise auf die zugrunde liegenden pathophysiologischen Prozesse während der akuten Rejektion geben kann.

Entsprechend war die Zielsetzung:

1. Etablierung eines Peptidmusters für akute Rejektion im Urin der Patienten
2. Validierung des Peptidmusters in einem unabhängigen Kollektiv
3. Analyse potentieller Confounder (z.B. Infektionen, andere pathologische Befunde in der Biopsie etc.)
4. Korrelation pathophysiologischer Prozesse der akuten Rejektion mit den molekularen Befunden der Urinproteomanalyse.

### **3. Material und Methoden**

#### **2.1. Patienten**

Für die Etablierung des Peptidmusters wurden 16 Urinproben von Patienten mit subklinischer akuter zellulärer tubulointerstitieller Rejektion (Banff Ia N=13 und Ib N=3) und 23 Urinproben von Patienten ohne Nachweis einer Rejektion in der Biopsie (Kontrollgruppe) verwendet. Urinproben von Patienten mit vaskulärer oder humoraler Abstoßung wurden aufgrund möglicher unterschiedlicher zugrundeliegender pathophysiologischer Mechanismen nicht untersucht. Die Validierung des Peptidmusters wurde mit separaten Proben (18 subklinische und zehn klinische akute Rejektionen Banff Ia und Ib und 36 Proben ohne Rejektion) vorgenommen. Als subklinische Rejektion wurde eine histologisch nachweisbare akute Rejektion nach den üblichen Banff Kriterien <sup>(24)</sup> ohne signifikante Verschlechterung der Transplantatfunktion (Anstieg des Serumkreatinins um weniger als 20% im Vergleich zu vorherigen Werten) zum Zeitpunkt der Biopsie definiert. Klinische Rejektionen wurden definiert, wenn eine erkennbare Verschlechterung der Transplantatfunktion ( $\geq 20\%$ iger Anstieg des Serumkreatinins) vorgelegen hatte. Das Validierungsset wurde ferner für die Analyse möglicher Confounder benutzt.

Für die Patientengruppen (Kontrollen, subklinische und klinische Rejektionen) wurden anthropometrische und klinische Daten in Form von Alter, Geschlecht, Serum-Kreatinin zum Zeitpunkt der Biopsie, niedrigstes Serum-Kreatinin 6 Wochen vor der Biopsie, Spenderalter, Spendergeschlecht, HLA-(human leucocyte antigen) mismatches, PRA-(plasma reactive antibodies) Titer, DGF (delayed graft function), immunsuppressive Therapie, sonstige Medikation und Komorbiditäten, wie Infektionen und kardiovaskuläre Begleiterkrankungen erhoben. Die GFR wurde mit Hilfe der Cockcroft-Gault-Formel berechnet.

#### **2.2. Massenspektrometrische Technik**

Die CE-MS Technik (an Kapillarelektrophorese gekoppelte Massenspektrometrie) kann ein sehr großes Spektrum vor allem kleinerer Peptide ( $< 20\text{kD}$ ) schnell und effizient differenzieren und ist somit für die Analyse biologischer Flüssigkeiten komplexer Zusammensetzung gut geeignet <sup>(20)</sup>. Im Rahmen der Probenpräparation wurden Ultrazentrifugationsfilter angewendet, um die Entfernung der im Urin häufig vorkommenden Albumin-Derivate zu verbessern. Weiterhin basierte die Selektion der Peptide sowohl auf den Vergleich ihrer Signalstärke (Amplitudenintensität) als auch auf die Häufigkeit ihres Vorhandenseins (Frequenz) in den einzelnen Patientengruppen. Einzelheiten sind der Publikation zur entnehmen.

## **2.3. Morphologische Studien**

Die Diagnose aus den Biopsien erfolgte durch die Abteilung Pathologie auf der Grundlage der Banff Klassifikation <sup>(24)</sup> mittels üblicher lichtmikroskopischer Routinefärbungen (Hämatoxylin-Eosin-HE- und Periodic Acid Schiff Reaktion-PAS), immunhistologischer Untersuchungen (mit Antikörpern gegen das Komplementspaltprodukt C4d und gegen das Simvian Virus 40-large T-Antigen) und bei Bedarf der Elektronenmikroskopie.

Weitere immunhistologische Studien auf der Basis des identifizierten Peptidmusters für Rejektion erfolgten an insgesamt 18 humanen Nierentransplantatbiopsien von achtzehn unterschiedlichen Patienten. Zur Etablierung der verschiedenen Färbungen gegen spezifische Antigene wurde humanes Lebergewebe und Präparate aus zwei humanen Transplantatnephrektomien verwendet.

Die immunhistochemischen Färbungen zum Nachweis von MMP-8 (matrix metalloprotease-8)-Lokalisation und semiquantitative Beurteilung in den Biopsien mit und ohne Abstoßung werden in der Publikation beschrieben und sind nochmals in **2.3.1** zusammengefasst.

Die weiteren in der Folge im Detail beschriebenen Färbungen (**2.3.2**) umfassen neben MMP-8 auch Prolylendopeptidase (PREP) und den Neutrophilenmarker CD-15 (cluster of differentiation 15). Ziel war es hierbei, eine systematische Analyse in den einzelnen mikroanatomischen Kompartimenten hinsichtlich der Expression dieser Antigene durchzuführen. Hierzu wurde mittels Doppelimmunfluoreszenz-Nachweis auch die Ko-Lokalisation der Antigene untersucht. Die primären Antikörper, die für die zusätzlich zur Publikation durchgeführten Färbungen verwendet wurden, werden im Anhang aufgeführt.

Die folgenden Abschnitte beschreiben Einzelheiten zu den Färbungen.

### **2.3.1. Immunhistologie zur MMP-8 und Lokalisationsnachweis**

Formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Biopsiematerial von nierentransplantierten Patienten mit klinischer (n=6) und subklinischer (n=6) Abstoßung, sowie von nierentransplantierten Patienten ohne Nachweis einer Abstoßung (Kontrollen, n=5) des Validierungssets wurde für lichtmikroskopische Färbungen und immunhistologische Untersuchungen in Serienschnittechnik aufgearbeitet. Zur Übersichtsfärbung wurden die HE-Färbung und die PAS-Färbung verwendet.

Entsprechend der erhobenen Ergebnisse der Urinproteomanalyse mit Hinweisen auf eine pathophysiologische Rolle von MMP-8 wurde die anatomische Lokalisation von MMP-8 exprimierenden Zellen beschrieben und deren räumliche Beziehung zum Endothel der peritubulären und glomerulären Kapillaren untersucht. Dazu wurden immunhistochemische Doppelfärbungen gegen den Endothelzellmarker CD 31 und MMP-8 durchgeführt. Für die

semiquantitative Auswertung wurden Kortexareale aller Transplantatbiopsien bei einer 400-fachen Vergrößerung fotografiert, dann die MMP-8 positiven Zellen pro Gesichtsfeld ausgezählt und anschließend die Mittelwerte berechnet. Zur weiteren Identifizierung der Zellen, die MMP-8 exprimieren, wurden immunhistochemische Färbungen mit mono- bzw. polyklonalen Antikörpern gegen die Zielantigene CD 68 (Makrophagen), CD 20 (B Lymphozyten), CD 3 (T-Lymphozyten), CD 15 (Neutrophile) und CD 115 (Mastzellen) durchgeführt. Der Zelltyp der MMP-8 exprimierenden Zellen wurde durch den direkten Vergleich der unterschiedlichen Färbungen aus den angrenzenden Serienschnitten der Biopsien beurteilt. Weitere methodische Einzelheiten für diesen Teil der Färbungen werden in der Publikation beschrieben.

### **2.3.2. Kompartimentspezifische Analyse der PREP, MMP-8 und CD-15 Expression mittels Einzel- und Doppelimmunfluoreszenzen**

Aufgrund der Befunde der massenspektrometrischen Analyse, dass außer der MMP-8 auch anderen matrixdegradierenden Enzymen wie PREP eine pathogenetische Rolle in der akuten Rejektion zugeordnet werden könnte und aufgrund der bislang vorliegenden histologischen Befunde, dass MMP-8 exprimierenden Zellen morphologische und immunhistochemische Charakteristika der Neutrophilen aufwiesen (siehe Publikation), wurde eine kompartimentspezifische Analyse der PREP, MMP-8 und CD-15 Expression mittels Immunfluoreszenzen durchgeführt.

#### **Etablierung der Einzel- und Doppelimmunfluoreszenzen**

Für die Zuordnung und Charakterisierung der PREP exprimierenden Zellen wurden Einzelimmunfluoreszenzen für PREP und Doppelimmunfluoreszenzen für PREP/MMP-8 und für PREP/CD-15 untersucht. PREP wurde als grün leuchtend und MMP-8 und CD-15 jeweils als rot leuchtend dargestellt. Zellkerne wurden mit dem Zellkernmarker DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol) visualisiert. Für die Immunfluoreszenzuntersuchungen wurde ein nicht kommerzieller anti-PREP Antikörper verwendet, der in der Abteilung für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Helsinki hergestellt <sup>(25,26)</sup> und von Dr. Myöhänen zur Verfügung gestellt wurde.

Nicht tumoröses Lebergewebe aus einem Leberteilresektat einer Patientin mit solitärer Lebermetastase eines Sigmakarzinoms wurde für die Etablierung der PREP und der MMP-8 Einzelimmunfluoreszenzen verwendet. Die weitere Etablierung der Färbungen erfolgte auf Transplantatnephrektomien. Ein Nierenexplantat mit Pyelonephritis wurde für Einzel- und Doppelimmunfluoreszenzen gegen PREP/MMP-8 und PREP/CD-15 verwendet. Ein zweites

Explantat ohne Pyelonephritis wurde für Einzel- und Doppelimmunfluoreszenzen gegen PREP/CD-15 verwendet.

Die Einzel- und Doppelimmunfluoreszenzen wurden nach dem bereits beschriebenen Protokoll von Dr. Myöhänen ausgeführt. Das komplette Protokoll befindet sich im Anhang.

### **Analyse der PREP, MMP-8 und CD-15 Expression in den Nierentransplantatbiopsien mit und ohne Abstoßung.**

Formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Biopsiematerial von nierentransplantierten Patienten mit klinischer (n=4) und subklinischer (n=6) Abstoßung, sowie von nierentransplantierten Patienten ohne Nachweis einer Abstoßung (Kontrollen, n=5) des Validierungssets wurde für die Immunfluoreszenzuntersuchungen gegen die Zielantigene PREP und MMP-8 aufgearbeitet. Für die Immunfluoreszenzuntersuchungen gegen die Zielantigene PREP und CD-15 konnten n=7 Biopsien mit subklinischer Abstoßung, n=5 Biopsien mit klinischer Abstoßung und n=5 Biopsien ohne Abstoßung ausgewertet werden.

In jeder Biopsie wurden einzel- und doppelpositive Zellen im Nierenkortex ausgezählt und deren anatomische Lokalisation ermittelt (**Abbildung 1**). Wenn möglich wurden 10 Gesichtsfelder und mindestens 2 Glomeruli pro Präparat berücksichtigt. Die Auswertung erfolgte bei einer 400-fachen Vergrößerung. In allen Biopsien wurde der Mittelwert der positiven Zellen pro Gesichtsfeld und Nierenkompartiment berechnet.

Da von vornherein nicht bekannt war, ob Zellen mehrere der untersuchten Antigene gleichzeitig exprimieren, wurden separate Auszählungen bei den jeweiligen Doppelfärbungen gemacht (z.B. PREP positiv und MMP-8 positiv, PREP positiv und MMP-8 negativ, PREP negativ und MMP-8 positiv, PREP positiv CD-15 positiv etc.). Zellkerne wurden mittels DAPI visualisiert.

Folgende Nierenkompartimente wurden getrennt untersucht: **Tu**=Expression in tubulären Epithelzellen des Kortex, **Ti**= infiltrierende Zellen zwischen den tubulären Epithelzellen, **Pt**=im unmittelbaren Bereich peritubulärer Kapillaren, **In**=Interstitium außerhalb von tubulären Epithelzellen / Tubulusquerschnitten sowie außerhalb von peritubulären Kapillaren. **Gl**= glomeruläre Zellen. Die Unterteilung der Nierenkompartimente wird in **Abbildung 1** verdeutlicht.

Letztlich wurde überprüft, ob zwischen Anzahl einzel- und doppelpositiver Zellen (MMP-8/PREP und PREP/CD-15) der jeweiligen Kompartimente und der eGFR zum Zeitpunkt der Biopsie (als aktuelle GFR definiert) und der Änderung der Transplantatfunktion zum Zeitpunkt der Biopsie im Vergleich zu der Funktion vor der Biopsie („GFR change“) ein

Zusammenhang besteht. Definiert wurde der „GFR change“ als die absolute Differenz (ml/min) zwischen der aktuellen GFR und der durchschnittlichen GFR 6 Wochen zuvor.

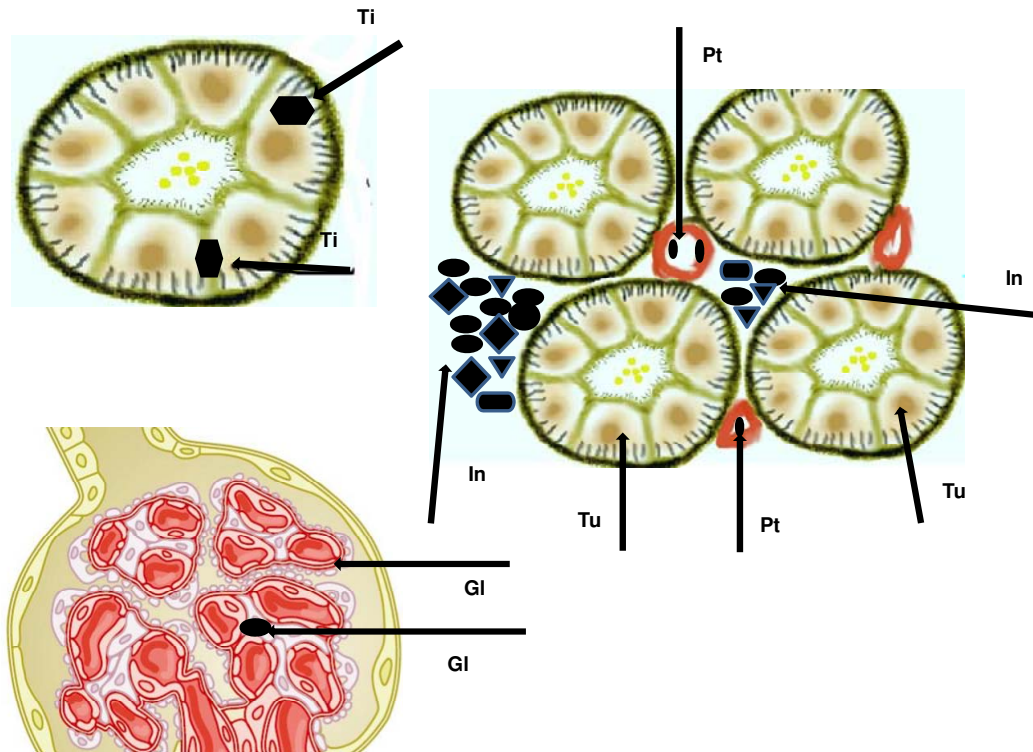


**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der einzelnen renalen Kompartimente. Unterschieden werden positive Zellen im Interstitium (In), positive Zellen, die den Tubulus infiltrieren (Ti), ortsständige tubuläre Zellen (Tu), positive Zellen im Bereich peritubulärer Kapillaren (Pt) und im Glomerulum (Gl)

## 2.4. Statistische Analyse

Neben den in der existierenden Publikation beschriebenen statistischen Verfahren wurde der Kruskal Wallis-Test für den Vergleich der Zellpopulationen der einzelnen Kompartimente zwischen den drei Patientengruppen benutzt, gefolgt vom Einzelgruppenvergleich mittels des Mann-Whitney-U-Tests. Für die Korrelation zwischen Transplantatfunktion bzw. Transplantatfunktionsänderung und Anzahl der MMP-8/PREP bzw. CD15-PREP positiven Zellen in den einzelnen Kompartimenten wurde der Rangkorrelationstest nach Spearman verwendet. Grundsätzlich wurde in der Publikation ein  $p < 0,05$  als signifikant angesehen. Da

in der histologischen Auswertung relativ kleine Stichproben zur Auswertung kamen, werden p Werte bis 0,2 deskriptiv angegeben.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Etablierung und Validierung des diagnostischen Peptidmusters für akute T-Zell vermittelte Rejektionen**

Das Peptidmuster für Rejektion wurde aus den Urinproben des Etablierungssets entwickelt. Das resultierende Modell besteht aus 14 Peptiden, die bei einer Rejektion hoch- oder unterreguliert werden. Insgesamt acht von den 14 Peptiden zeigten sich herunterreguliert und die restlichen sechs hochreguliert in den Rejektionsproben des Etablierungssets (**Publikation, table 4**).

Bei der Validierung des Peptidmusters mit den separaten Proben des Validierungssets (subklinische und klinische Rejektionen zusammen) ergab sich eine ROC (receiver operating characteristic)-Kurve mit einer AUC (area under the curve) von 0,91 (95% CI: 0.82-0.97,  $p=0.0001$ ). 28 von 36 Kontrollen ohne Rejektion, 16 von 18 subklinischen Rejektionen und 10 von 10 klinischen Rejektionen wurden korrekt klassifiziert.

In den Urinproben des Validierungssets waren acht Peptide des Modells bei den subklinischen Rejektionen (im Vergleich zu den Nicht-Rejektionen) reduziert, fünf vermehrt und eins unverändert. Es zeigten zudem sich keine wesentliche Unterschiede in der Regulation der diagnostischen Peptide im Validierungs- und im Etablierungsset, da sieben der herunterregulierten und fünf der hochregulierten Peptide gleich in beiden Probensets waren. In den Proben des Validierungssets mit den klinischen Abstoßungen zeigten sich (im Vergleich zu den Nicht-Rejektionen) sieben Peptide reduziert und sieben vermehrt. Die Regulation der diagnostischen Peptide im Validierungs- und im Etablierungsset war damit fast identisch, außer Peptid ID-86025, welches im Validierungsset in den Rejektionsproben vermehrt vorkam. Unterschiede in einzelnen Peptiden zwischen den Gruppen mit den Abstoßungen (subklinisch vs. klinisch) waren ebenso evident. So zeigte das Peptid ID-3796 in den subklinischen Abstoßungen eine fast doppelhöhere Amplitude im Vergleich zu den klinischen, wohingegen die Peptide ID-114633 und ID-151296 in den klinischen Rejektionen eine 8-10mal stärkere Signalstärke als bei den subklinischen aufwiesen (**Publikation, table 5**).

Bei fehlklassifizierten Proben wurde untersucht, ob bestimmte Faktoren für die fehlerhafte Einordnung ursächlich sein könnten. Die Analyse der Störfaktoren umfasste eine Reihe von demographischen, immunologischen, klinischen, laborchemischen und histologischen Parametern (**Publikation, supplementary table 1**). Es konnte dabei kein signifikanter Störfaktor identifiziert werden. Vor allem simultan existierende histologische Befunde oder Krankheitsentitäten, wie akuter Tubulusschaden und Harnwegsinfekt, die die Zusammensetzung des Urinproteoms verändern könnten, haben die Klassifizierung der Proben nicht beeinflusst.

### 3.2. Identifizierung einzelner Peptide

Vier Peptide des Modells wurden sequenziert. Drei davon waren Fragmente vom Kollagen Typ I alpha (I) (Col1A1) und das vierte vom Kollagen Typ I alpha (III). Zwei der drei Col1A1-Peptide des Modells waren in den Rejektionsproben reduziert und das dritte (ID-114633) vermehrt. Aufgrund des Vorhandenseins von Col1A1 Fragmenten im diagnostischen Peptidmodell wurden alle Proben des Validierungssets nach den in der CE-MS Datenbank bekannten Col1A1 Fragmenten untersucht. 39% der Col1A1 Fragmente, die in den Rejektionsproben vermehrt vorkamen (darunter Peptid ID 114633), zeigten ein PGP-(Prolin-Glycin-Prolin) Motif am C-Terminus. Im Gegensatz dazu ließ sich das PGP-Motif nur bei 13% der Col1A1 Fragmente nachweisen, die in den Rejektionsproben vermindert waren. Dieses Expressionsmuster war sowohl in den klinischen als auch in den subklinischen Rejektionen präsent, Col1A1-Fragmente mit dem PGP-Motif waren jedoch in den klinischen Rejektionen generell häufiger vorhanden (**Publikation, figure 3**).

Da Kollagenfragmente mit dem PGP-Motif auf einen proteolytischen Abbau der extrazellulären Matrix durch MMP-8 und PREP hindeuten <sup>(27)</sup>, wollten wir der Hypothese nachgehen, ob diese beiden Enzyme eine Rolle im Prozess der akuten Rejektion haben.

In präliminären Untersuchungen (siehe Publikation) zeigten sich in den Biopsien mit akuter klinischer Rejektion im Vergleich zu den Biopsien ohne Rejektion signifikant mehr MMP-8 positive Zellen (0,5-28,3/Gesichtsfeld; Median 4,1 versus 0,0-1,1 pro Gesichtsfeld; Median 0,2). Diese Zellen wiesen teilweise die morphologischen, histochemischen und immunhistochemischen Charakteristika der Neutrophilen auf und waren überwiegend in den peritubulären und glomerulären Kapillaren und sporadisch in den tubulointerstitiellen Infiltraten lokalisiert (**siehe Publikation**).

### **3.3. Lokalisation der PREP/MMP-8 Expression und Relation zur Transplantatfunktion**

In den präliminären Untersuchungen wurden die MMP-8 positiven Zellen nicht systematisch kompartimentspezifisch ausgewertet. Weiterhin konnte die Expression von PREP in den Biopsien nicht untersucht und auch nicht geklärt werden, ob Änderungen in der MMP-8 und PREP Expression ausschließlich Neutrophilen zugeordnet werden können.

Deshalb wurde eine systematische Analyse definierter Nierenkompartimente unter Verwendung von Immunfluoreszenzen gegen die Zielantigene PREP, MMP-8 und CD-15 durchgeführt. In einem ersten Schritt wurden die Immunfluoreszenzuntersuchungen etabliert.

#### **3.3.1 Etablierung der PREP, MMP-8 und CD-15 Färbung in der Einzel- und Doppelimmunfluoreszenz**

Für die Etablierung der PREP und MMP-8 Färbungen wurde Nieren- und Lebergewebe verwendet (siehe Material und Methoden).

Als Vorarbeit für die Untersuchung und Auswertung der Nierentransplantatbiopsien wurden Einzelimmunfluoreszenzen mit PREP und MMP-8 in Lebergewebe durchgeführt, um Positivkontrollen für PREP und Negativkontrollen für MMP-8 zu entwickeln. Aufgrund der mehr oder weniger starken ubiquitären Expression von PREP in fast allen peripheren Geweben <sup>(28)</sup> wurden keine Negativkontrollen für PREP untersucht. Die Auswahl der Leber als positive Kontrolle für die PREP Immunfluoreszenz stützt sich auf die bereits beschriebene sehr starke zytoplasmatische Expression dieses Enzymes in den Hepatozyten <sup>(28,29)</sup>, wohingegen MMP-8 in den Hepatozyten nicht exprimiert wird <sup>(29)</sup>.

PREP zeigte ein eindeutiges zytoplasmatisches Expressionsmuster in den Hepatozyten. Im Gegensatz dazu war MMP-8 in den Hepatozyten, wie erwartet, nicht nachweisbar. MMP-8 wurde nur sporadisch in infiltrierenden Zellen (in diesem Fall Neutrophile in Arealen mit Steatose) des Leberparenchyms identifiziert (**Abbildung 2**).

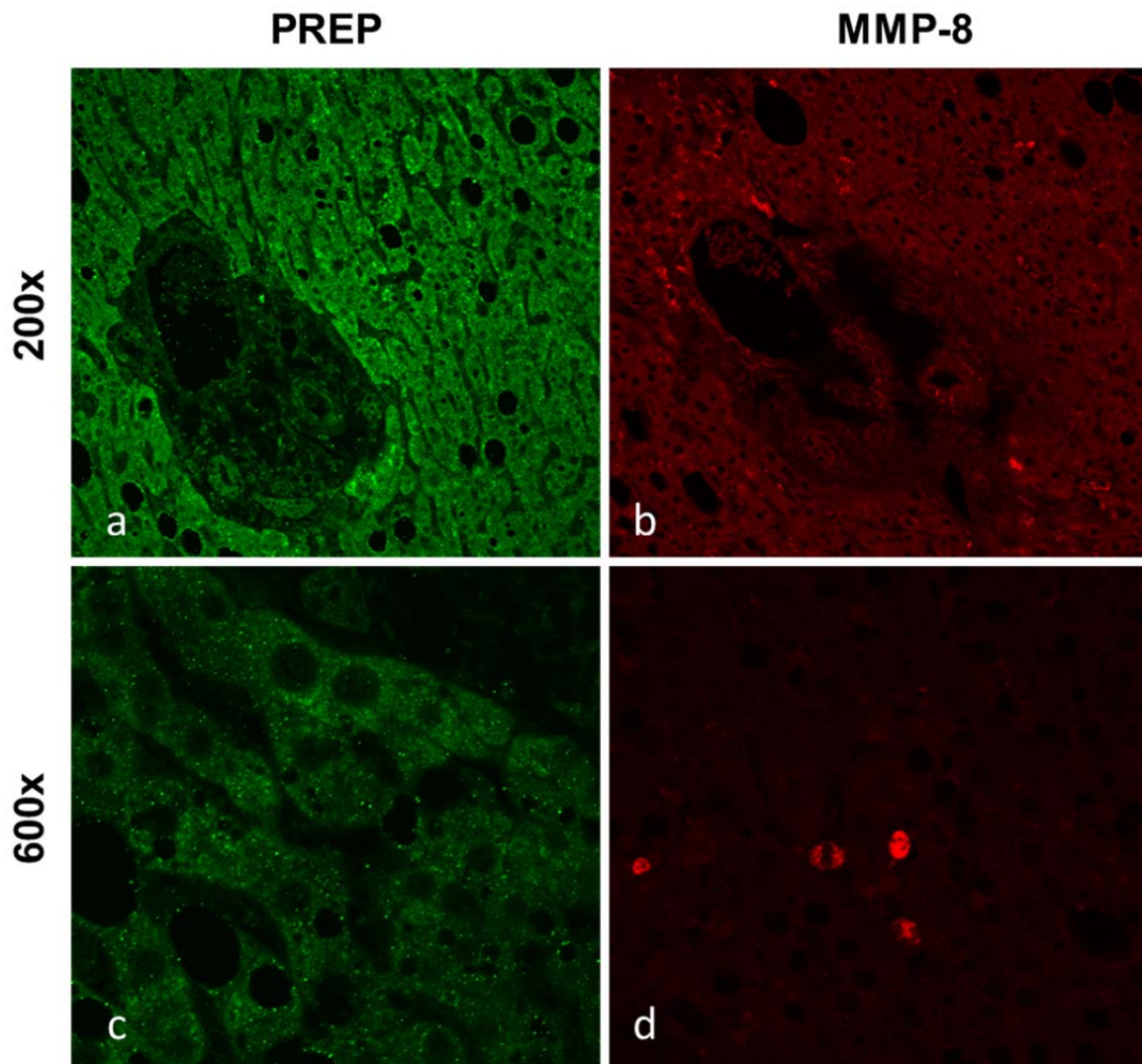


**Abbildung 2:** Einzelimmunfluoreszenzen für PREP (a, c) und MMP-8 (b, d) an Lebergewebe. Nicht tumoröses Gewebe aus einem Leberteilresektat mit solitärer Metastase wird gezeigt. In der Übersichtsvergrößerung (200fach, a und b) ist eine Zentralvene angeschnitten bzw. sind perizentrale Hepatozyten zu sehen. Hochauflösend (600fache Vergrößerung, c und d) sind repräsentative Areale der Hepatozyten mit infiltrierenden Zellen dargestellt. PREP (grüne Fluoreszenz) wird fast ausschließlich im Zytoplasma der Hepatozyten stark exprimiert. MMP-8 (rote Fluoreszenz) ist in den Hepatozyten nicht nachweisbar, sondern nur vereinzelt in den infiltrierenden Zellen.

Die weitere Etablierung erfolgte an Nierenexplantaten mit und ohne Pyelonephritis. Nierenexplantate mit und ohne eitrige Nephritis wurden ausgesucht, um die zu erwartende Expression von PREP und MMP-8 in renalen und infiltrierenden Zellen zu untersuchen.

Hintergrund hierfür war die bereits publizierte starke zytoplasmatische Expression von PREP in den proximalen Tubulusepithelzellen der Niere <sup>(29)</sup>. PREP wird ferner in den Zellen des hämatopoetischen Systems und vor allem in Monozyten und Basophilen eindeutig exprimiert <sup>(28,29)</sup>. Eine spezifische zytoplasmatische Expression von PREP in den Neutrophilen wurde ebenso beschrieben <sup>(30)</sup>. MMP-8 wird in den proximalen Tubulusepithelzellen nur schwach und in den Neutrophilen stark exprimiert <sup>(29)</sup>. Das Explantat mit Pyelonephritis wurde als positive Kontrolle für die Einzel- und Doppelimmunfluoreszenzen gegen PREP/MMP-8 und PREP/CD-15 verwendet. Das Transplantat ohne Pyelonephritis diente als negative Kontrolle für die CD-15 Immunfluoreszenzen. Repräsentative Bilder werden in den **Abbildungen 3 und 4** gezeigt.

MMP-8 einzelpositive und PREP/MMP-8 doppelpositive Zellen wurden in den interstitiellen Infiltraten und in den intratubulären Neutrophilenzylindern nachgewiesen. Tubulusepithelzellen sowie Zellen in den interstitiellen Infiltraten und in den intratubulären Zylindern zeigten eine positive Immunfluoreszenz für PREP. (**Abbildung 3**).

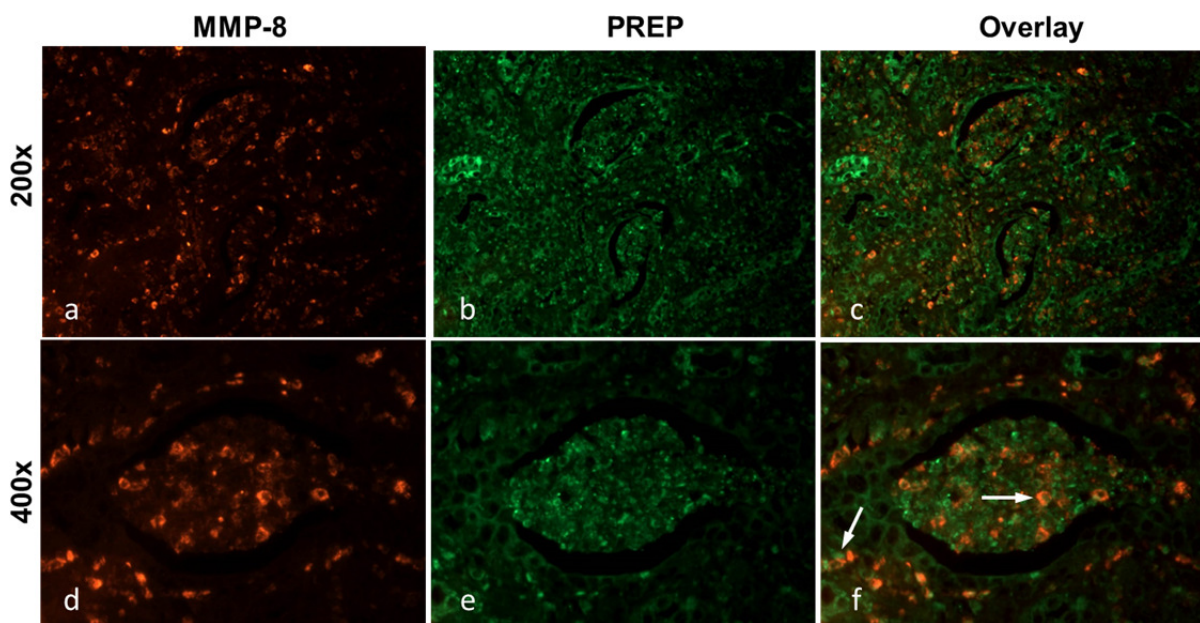


**Abbildung 3:** Einzel- und Doppelimmunfluoreszenzen für MMP-8 und PREP im Nierengewebe eines Nierenexplantates mit schwerer eitriger abszedierender Pyelonephritis. Immunfluoreszenzen zur Darstellung von MMP-8 (a, d), PREP (b, e) und MMP-8/PREP (c, f) in 200 facher (a, b, c) und 400facher (d, e, f) Vergrößerung. PREP einzelpositive Zellen

werden in den Tubuli, im Interstitium und in den intratubulären Zylindern dargestellt. MMP-8 einzelpositive Zellen sind im Interstitium und in den intratubulären Zylindern nachweisbar. MMP-8+/PREP+ doppelpositive Zellen zeigten sich im Interstitium und in den Tubuluslumina und werden mit weißen Pfeilen angedeutet (f).

Eine große Anzahl von CD-15 bzw. PREP einzelpositiven Zellen und PREP/CD15 doppelpositiven Zellen war in den interstitiellen Infiltraten und in den intratubulären Zylindern des Transplantates mit Pyelonephritis nachweisbar. Im Gegensatz dazu war im Explantat ohne Pyelonephritis PREP ganz überwiegend in Tubulusepithelzellen nachweisbar. CD-15 einzelpositive und PREP/CD-15 doppelpositive Zellen wurden nicht nachgewiesen (**Abbildung 4**).

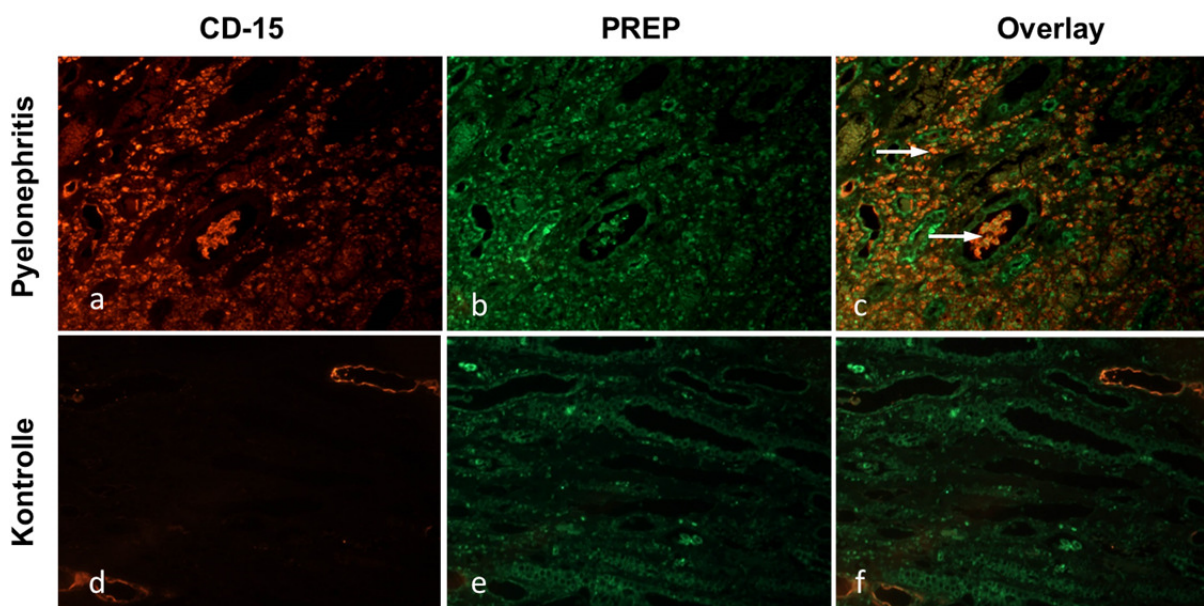


**Abbildung 4:** Einzel- und Doppelimmunfluoreszenzen für CD-15 und PREP im Nierengewebe. Gezeigt werden Nierenexplantate mit (a, b, c) und ohne Pyelonephritis (d, e, f). Immunfluoreszenzen zur Darstellung von CD-15 (a, d), PREP (b, e) und CD-15/PREP (c, f) in 200facher Vergrößerung. CD-15 einzel- und PREP/CD-15 doppelmarkierte Zellen zeigten sich im Interstitium und in den intratubulären Zylindern nur im Transplantat mit der Pyelonephritis (a, c).

### 3.3.2. PREP Einzelexpression, MMP-8 Einzelexpression, und PREP/MMP-8 Doppelexpression in den Biopsien mit und ohne Abstoßung und Korrelation mit der Transplantatfunktion

In einem ersten Schritt wurde PREP in definierten Nierenkompartimenten in den Biopsien mit und ohne Abstoßung untersucht. PREP wurde in allen Biopsien überwiegend in den Tubuli und in den interstitiellen Infiltraten und nur wenig in den Glomeruli exprimiert. In den Abstoßungen war die Expression von PREP in den interstitiellen Infiltraten viel stärker als bei den Kontrollen. Repräsentative Bilder werden in der nachfolgenden **Abbildung 5** gezeigt. Abbildung 5 zeigt die Lokalisation von PREP positiven /MMP-8 bzw. CD-15 negativen Zellen im Nierengewebe von Kontrollen, einer subklinischen und einer klinischen Abstoßung. In der Übersicht imponieren PREP positive Zellen in den Tubuli bei Kontrollen und Abstoßungen und im Interstitium bei den Abstoßungen.

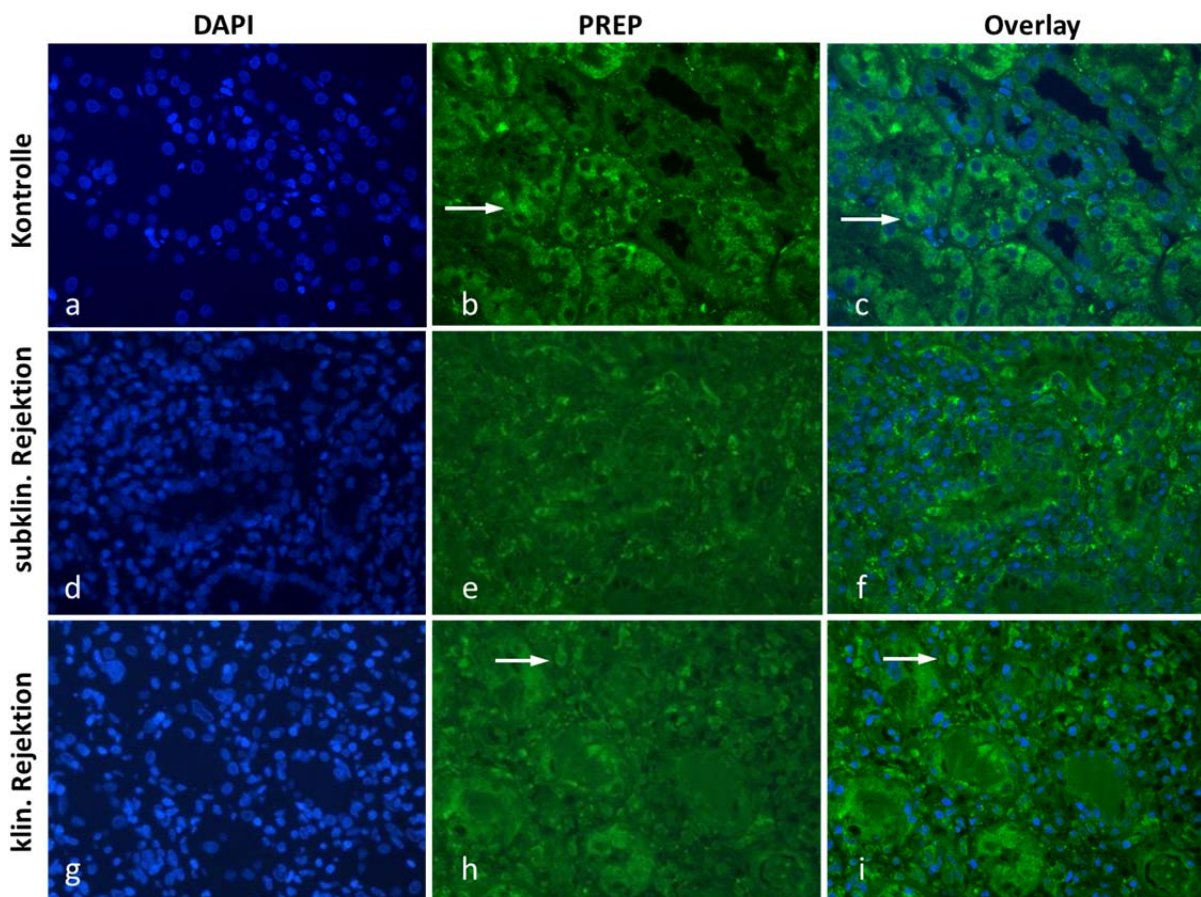


**Abbildung 5:** PREP Expression in Biopsien mit und ohne Abstoßung. Immunfluoreszenzen zur Darstellung von DAPI (a, d, g) und PREP (b, e, h). Repräsentative Bilder einer Kontrolle (a, b, c), einer subklinischen (d, e, f) und einer klinischen Abstoßung (g, h, i). PREP positive tubuläre und interstitielle Zellen sind mit Pfeilen markiert (Vergrößerung x400).

PREP wurde in den tubulären Zellen am stärksten exprimiert (7-9/Gesichtsfeld). Die zweithöchste PREP Expression war in den interstitiellen Zellen zu sehen (3-7/Gesichtsfeld). Im interstitiellen Kompartiment war die Anzahl der PREP positiven Zellen in den Biopsien mit klinischer und subklinischer Abstoßung am höchsten, wohingegen in den tubulären Zellen PREP bei den Abstoßungen weniger exprimiert wurde. Es zeigte sich ein numerischer Unterschied in den PREP-positiven interstitiellen Zellen zwischen Kontrollen und Abstoßungen sowohl subklinisch als auch klinisch (3 vs. 7 pro Gesichtsfeld  $p=0,09$  und 3 vs. 5,5 pro Gesichtsfeld,  $p=0,09$ ).

Die Ergebnisse der Auszählung dieser Zellen werden in **Tabelle 2** zusammengefasst

| Lokalisation | Kontrollen<br>ohne Rejektion | Subklinische<br>Rejektionen | Klinische Rejektionen |
|--------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| <b>Tu</b>    | 9 (5-11)                     | 7,0 (6-9)                   | 7,0 (5-8,5)           |
| <b>Ti</b>    | 0,38 (0-3)                   | 0,88 (0-4)                  | 0,5 (0-5)             |
| <b>In</b>    | 3,0 (1-6)                    | 7 (0-12,5)                  | 5,5 (3-14)            |
| <b>Gl</b>    | 1,5 (1-2)                    | 0,6 (0-5)                   | 0,3 (0-2)             |
| <b>Pt</b>    | 1,0 (0,5-2)                  | 1,0 (0-2,5)                 | 1,1 (0-2)             |

**Tabelle 2:** Auswertung der Immunfluoreszenzen für PREP einzelpositiven Zellen. Es werden die gruppierten Medianwerte (min-max) pro Nierenkompartiment in den Biopsien mit subklinischer und klinischer Abstoßung und in den Kontrollen gezeigt.

Die Anzahl der PREP positiven Zellen in den einzelnen Kompartimenten wurde zur aktuellen eGFR und zu eGFR-Änderung korreliert. Eine positive Korrelation zur aktuellen GFR zeigte sich nur für das tubuläre Kompartiment (**Abbildung 6**).

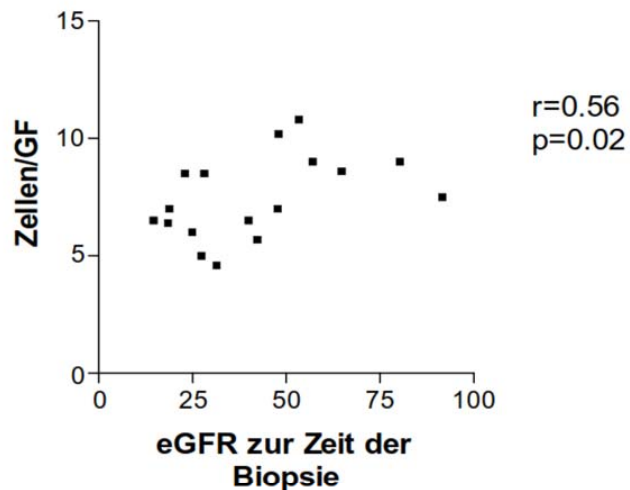


**Abbildung 6:** Zusammenhang zwischen den tubulären PREP einzelpositiven Zellen (MMP-8 und CD-15 negativ) und der GFR zum Zeitpunkt der Biopsie. Es besteht eine positive Korrelation zwischen PREP positiven tubulären Zellen und der aktuellen Nierenfunktion.

In einem zweiten Schritt wurden die Expression und die Verteilung sowohl der MMP-8 einzelpositiven als auch der PREP/MMP-8 doppelpositiven Zellen untersucht. **Abbildung 7** zeigt die Lokalisation von MMP-8 einzelpositiven und PREP/MMP-8 doppelpositiven Zellen im tubulären, interstitiellen und glomerulären Nierenkompartiment von Kontrollen und Biopsien mit Abstoßung.

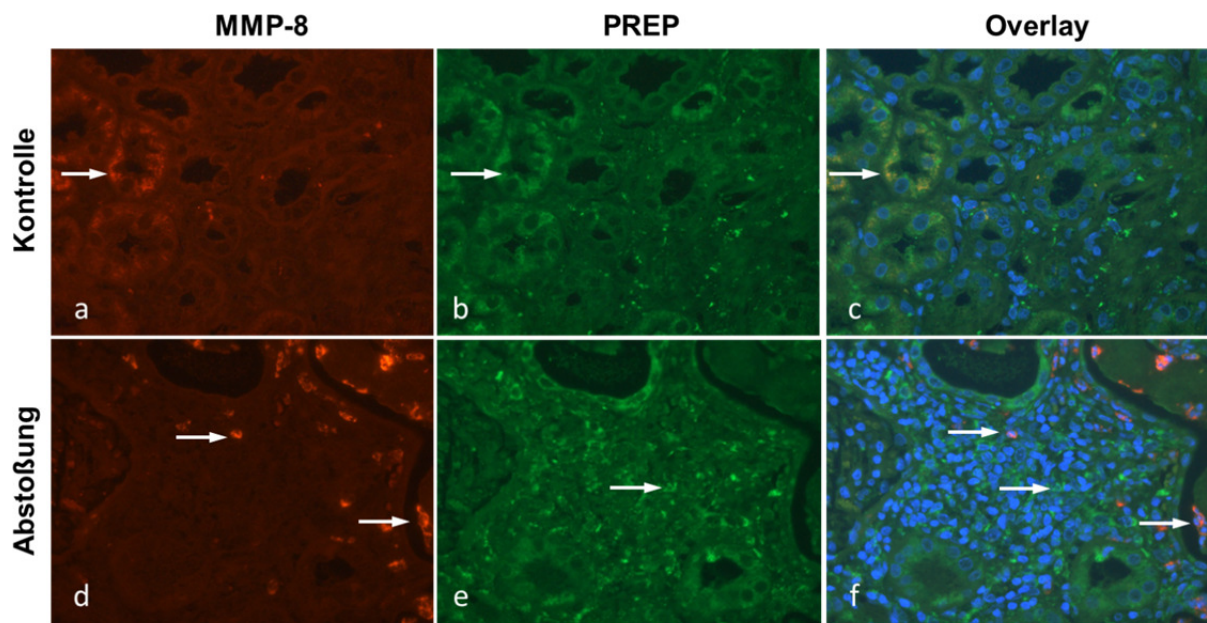


**Abbildung 7:** MMP-8 Einzelexpression und PREP/MMP-8 Doppelexpression in Biopsien mit und ohne Abstoßung. Gezeigt werden (weiße Pfeile) MMP-8 positive (a), PREP positive (b), und MMP-8/PREP doppelpositive (c) tubuläre Zellen in einer Biopsie ohne Abstoßung, sowie MMP-8 einzelpositive interstitielle und glomeruläre Zellen (d, f), und PREP einzelpositive interstitielle Zellen (e) einer Biopsie mit Abstoßung (400fache Vergrößerung). In c und f werden Zellkerne mit DAPI in blau dargestellt.

MMP-8 einzelpositive Zellen waren in Kontrollen und Abstoßungen im tubulären und im interstitiellen Kompartiment kaum bzw. in geringen Mengen vorhanden. In den Biopsien mit Abstoßungen zeigten sich im Vergleich zu den Kontrollen signifikant mehr MMP-8 einzelpositive Zellen im Interstitium ( $p=0,03$ ). MMP-8 positive Zellen wurden im glomerulären und peritubulären Kompartiment der Abstoßungen und Kontrollen kaum nachgewiesen.

Die Ergebnisse der Auszählung werden in **Tabelle 3** zusammengefasst.

| <b>Lokalisation</b> | <b>Kontrollen<br/>ohne Rejektion</b> | <b>Subklinische<br/>Rejektionen</b> | <b>Klinische Rejektionen</b> |
|---------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| <b>Tu</b>           | 0,2 (0-1)                            | 0,3 (0-2)                           | 0,0 (0)                      |
| <b>Ti</b>           | 0,0 (0)                              | 0,2 (0-1)                           | 0,5 (0-2)                    |
| <b>In</b>           | <b>0,2 (0-1)</b>                     | <b>1,7 (0-4)</b>                    | 2,1 (0-9)                    |
| <b>Gl</b>           | 1,3 (0-2)                            | 0,8 (0-3)                           | 1,0 (0-2)                    |
| <b>Pt</b>           | 0,6 (0-1)                            | 0,7 (0-1)                           | 0,7 (0-2)                    |

**Tabelle 3:** Auswertung der Immunfluoreszenzen für MMP-8 einzelpositiven Zellen. Es werden die gruppierten Medianwerte (min-max) pro Nierenkompartiment in den Biopsien mit subklinischer und klinischer Abstoßung und in den Kontrollen gezeigt. Die statistisch signifikanten Ergebnisse sind hervorgehoben ( $p=0,03$  für Kontrolle vs. subklinisch).

Doppelmarkierte PREP/MMP-8 Zellen (M+P+) wurden im tubulären (2-7/Gesichtsfeld) und im interstitiellen Kompartiment (2-5/Gesichtsfeld) eindeutig nachgewiesen. Die glomerulären Kapillaren wiesen eine moderate Anzahl doppelmarkierter PREP/MMP-8 Zellen auf (1,5-7,8/Gesichtsfeld).

Tubulär wurden weniger PREP/MMP-8 Zellen in den klinischen im Vergleich zu den subklinischen Rejektionen und zu den Kontrollen gefunden. Die Anzahl der interstitiellen doppelmarkierten PREP/MMP-8 positiven Zellen war bei den Rejektionen nur numerisch erhöht ( $p=0,67$  für subklinisch vs. klinisch und  $p=0,19$  für Kontrollen vs. subklinisch). Glomerulär wiesen die klinischen Abstoßungen im Vergleich zu den subklinischen Abstoßungen und zu den Kontrollen mehr doppelpositive Zellen auf (M+P+). Der Unterschied war aber hier nicht statistisch signifikant ( $p=0,66$  für subklinisch vs. Kontrollen und  $p=0,45$  für Kontrollen vs. subklinisch).

Die Ergebnisse der Auszählung werden in **Tabelle 4** zusammengefasst.

| <b>Lokalisation</b> | <b>Kontrollen ohne Rejektion</b> | <b>Subklinische Rejektionen</b> | <b>Klinische Rejektionen</b> |
|---------------------|----------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| <b>Tu</b>           | 5,0 (2-8)                        | 7,0 (0-11)                      | 2,0 (0-8)                    |
| <b>Ti</b>           | 0,2 (0-1)                        | 0,8 (0-3)                       | 0,3 (0-1)                    |
| <b>In</b>           | 2,0 (0-5)                        | 4,0 (2-10)                      | 3,3 (0-14)                   |
| <b>Gl</b>           | 1,5 (0-18)                       | 4,5 (0-19)                      | 7,8 (0-13)                   |
| <b>Pt</b>           | 1,0 (0-2)                        | 1,5 (0-5)                       | 2,0 (0-4)                    |

**Tabelle 4:** Auswertung der Immunfluoreszenzen für PREP/MMP-8 doppelpositiven Zellen. Es werden die gruppierten Medianwerte (min-max) pro Nierenkompartiment in den Biopsien mit subklinischer und klinischer Abstoßung und in den Kontrollen gezeigt.

Die Anzahl der MMP-8 einzelpositiven und PREP/MMP-8 doppelpositiven Zellen in den einzelnen Kompartimenten wurde zur aktuellen eGFR und zu eGFR-Änderung korreliert. Eine Korrelation zeigte sich auch hier nur für das tubuläre Kompartiment. Tubuläre doppelpositive Zellen korrelierten positiv mit der GFR-Änderung (**Abbildung 8**). Der Effekt verfehlte jedoch das Signifikanzniveau ( $p=0,15$ ).

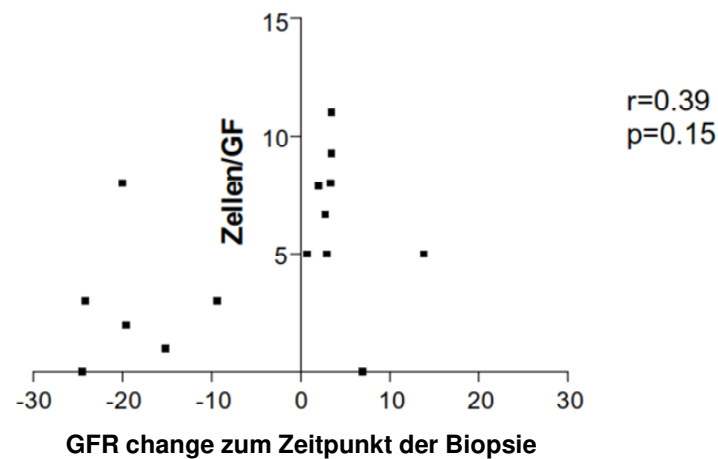


**Abbildung 8:** Zusammenhang zwischen den tubulären P+M+ doppelpositiven Zellen und der GFR Änderung. Es besteht eine nicht signifikante positive Korrelation zwischen PREP/MMP-8 doppelpositiven Zellen und der GFR-Änderung zum Zeitpunkt der Biopsie.

### 3.3.3. CD-15 Einzelexpression und PREP/CD-15 Doppelexpression in den Biopsien mit und ohne Abstoßung und Korrelation mit der Nierentransplantatfunktion

Da die präliminären histologischen Färbungen auf einen Zusammenhang zwischen MMP-8 exprimierenden Zellen und Neutrophilen bei den Abstoßungen hindeuteten, wurde untersucht, ob ein solcher Zusammenhang auch für PREP existiert. Zu diesem Zweck wurden Einzel- und Doppelimmunfluoreszenzen mit dem neutrophilenspezifischen Marker CD-15 und PREP in Biopsien mit und ohne Abstoßung durchgeführt. Neutrophile waren in den Kontrollen kaum nachweisbar. Repräsentative Bilder aus Biopsien mit Abstoßungen werden in der nachfolgenden **Abbildung 9** gezeigt. Abbildung 9 zeigt die Lokalisation von CD-15 einzelpositiven und PREP/CD-15 doppelpositiven Zellen im interstitiellen Kompartiment.

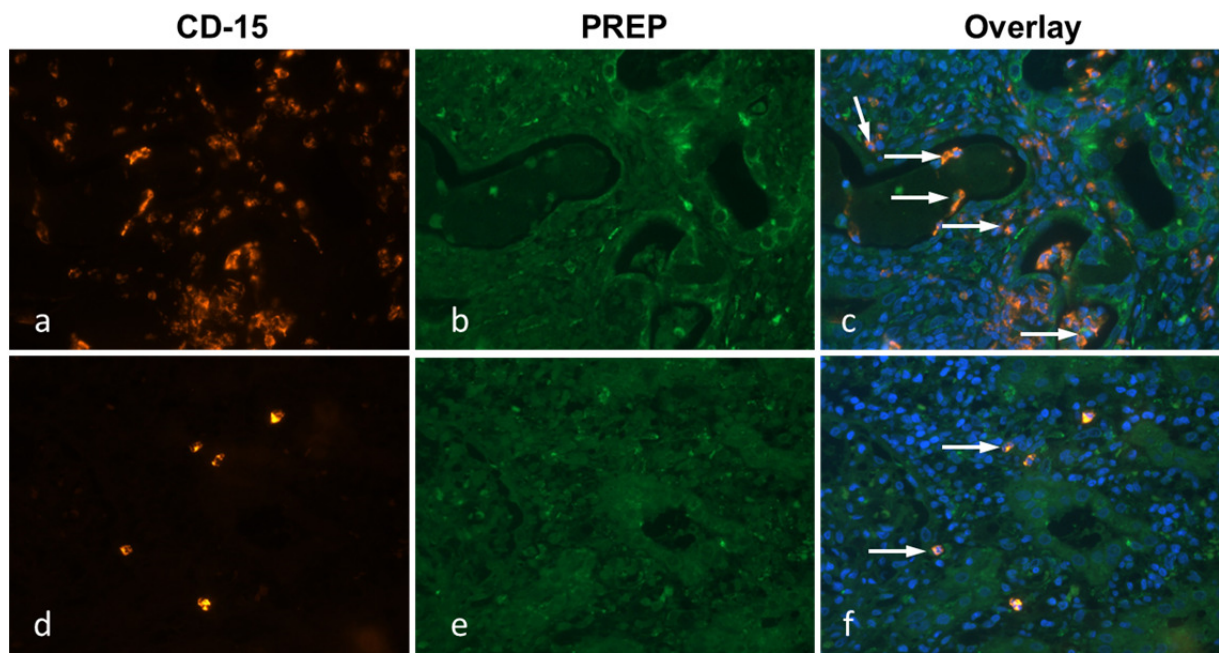


**Abbildung 9:** CD-15 Einzelexpression und PREP/CD-15 Doppelexpression in Biopsien mit Abstoßung. Gezeigt werden CD-15 positive/PREP negative und PREP /CD-15 doppelpositive Zellen in Infiltraten und in intratubulären Zylindern (a, b, c) sowie CD-15 einzelpositive/PREP negative Zellen in interstitiellen Infiltraten (d, e, f).

Die Anzahl der CD-15 einzelpositiven und PREP/CD-15 doppelpositiven Zellen war in allen Kompartimenten sehr gering. Fast alle Zellen, die PREP exprimieren, gehören nicht zu den Neutrophilen, da der Neutrophilenmarker CD-15 an nur ca. 10% aller PREP positiven Zellen nachgewiesen wurde (vergleiche auch zu 3.3.2, Tabelle 2). Neutrophile, die PREP exprimieren, sind auch sehr selten, weil sie nur knapp die Hälfte der Neutrophilenpopulation formten.

Die Ergebnisse der Auszählung werden in **Tabelle 5** und **Tabelle 6** zusammengefasst.

| <b>Lokalisation</b> | <b>Kontrollen ohne Rejektion</b> | <b>Subklinische Rejektionen</b> | <b>Klinische Rejektionen</b> |
|---------------------|----------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| <b>Tu</b>           | 0,0 (0)                          | 1,7 (0-10)                      | 0,0 (0)                      |
| <b>Ti</b>           | 0,0 (0)                          | 0,3 (0-2)                       | 0,2 (0-1)                    |
| <b>In</b>           | 0,2 (0-1)                        | 0,8 (0-5)                       | 1,5 (0-5)                    |
| <b>Gl</b>           | 0,2 (0-1)                        | 0,4 (0-1)                       | 0,5 (0-2)                    |
| <b>Pt</b>           | 0,5 (0-2)                        | 1,0 (0-4)                       | 0,5 (0-2)                    |

**Tabelle 5:** Auswertung der Immunfluoreszenzen für CD-15 einzelpositiven Zellen. Es werden die gruppierten Medianwerte (min-max) pro Nierenkompartiment in den Biopsien mit subklinischer und klinischer Abstoßung und in den Kontrollen gezeigt.

| <b>Lokalisation</b> | <b>Kontrollen ohne Rejektion</b> | <b>Subklinische Rejektionen</b> | <b>Klinische Rejektionen</b> |
|---------------------|----------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| <b>Tu</b>           | 0,2 (0-1)                        | 0,6 (0-2)                       | 0,0 (0)                      |
| <b>Ti</b>           | 0,0 (0)                          | 0,5 (0-2)                       | 0,0 (0)                      |
| <b>In</b>           | 0,2 (0-1)                        | 1,0 (0-5)                       | 0,2 (0-1)                    |
| <b>Gl</b>           | 0,5 (0-13)                       | 0,0 (0)                         | 0,5 (0-2)                    |
| <b>Pt</b>           | 0,2 (0-1)                        | 0,5 (0-3)                       | 0,0 (0)                      |

**Tabelle 6:** Auswertung der Immunfluoreszenzen für PREP/CD-15 doppelpositiven Zellen. Es werden die gruppierten Medianwerte (min-max) pro Nierenkompartiment in den Biopsien mit subklinischer und klinischer Abstoßung und in den Kontrollen gezeigt. P+: PREP positiv, C+: CD15 positiv.

Im Ti Kompartiment existiert eine positive Korrelation zwischen der Gesamtzahl der Neutrophilen (sowohl P+ als auch P-) und der GFR Änderung, d.h. je mehr Neutrophile desto besser die Funktion zum Zeitpunkt der Biopsie (**Abbildung 10**). Formal besteht eine Korrelation, es ist jedoch anzumerken, dass 5 der 6 Patienten mit  $\geq 1$  Neutrophilen pro Gesichtsfeld im Ti Kompartiment zu der Gruppe mit den subklinischen Abstoßungen gehörte. Die GFR Änderung zum Zeitpunkt der Biopsie bei diesen Patienten war um 1-15ml/min besser im Vergleich zur Ausgangs-GFR. In allen anderen Kompartimenten fand sich keine Korrelation zwischen Neutrophilen und der Nierenfunktion.

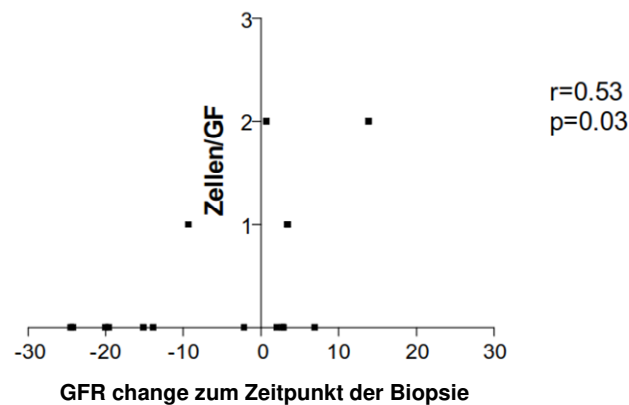


**Abbildung 10:** Zusammenhang zwischen der Gesamtzahl (PREP positiv und PREP negativ) der die Tubulusepithelzellen infiltrierenden Neutrophilen (Ti) und der GFR change. Es besteht eine positive Korrelation zwischen CD-15 einzelpositiven und PREP/CD-15 doppelpositiven Zellen und der GFR-Änderung zum Zeitpunkt der Biopsie.

### 3.3.4. Zusammenfassende Gegenüberstellung der Immunfluoreszenzuntersuchungen für PREP, MMP-8 und CD-15.

Die Auswertung von allen in den vorangegangenen Kapiteln (3.3.2, 3.3.3, 3.3.4) beschriebenen Fluoreszenzfärbungen in den Biopsien mit subklinischen und klinischen Rejektionen und in den Kontrollen wird in der nachfolgenden **Abbildung 11** vergleichend

dargestellt. In dieser Abbildung werden die definierten Nierenkompartimente aus Gründen der Übersichtlichkeit in zwei größere Gruppen zusammengefasst. Die Gruppe „Tubulointerstitium“ umfasst die Kompartimente Tu, Ti und In (**Abbildung 11a**) und die Gruppe „Mikrozirkulation“ die Kompartimente Gl und Pt (**Abbildung 11b**).

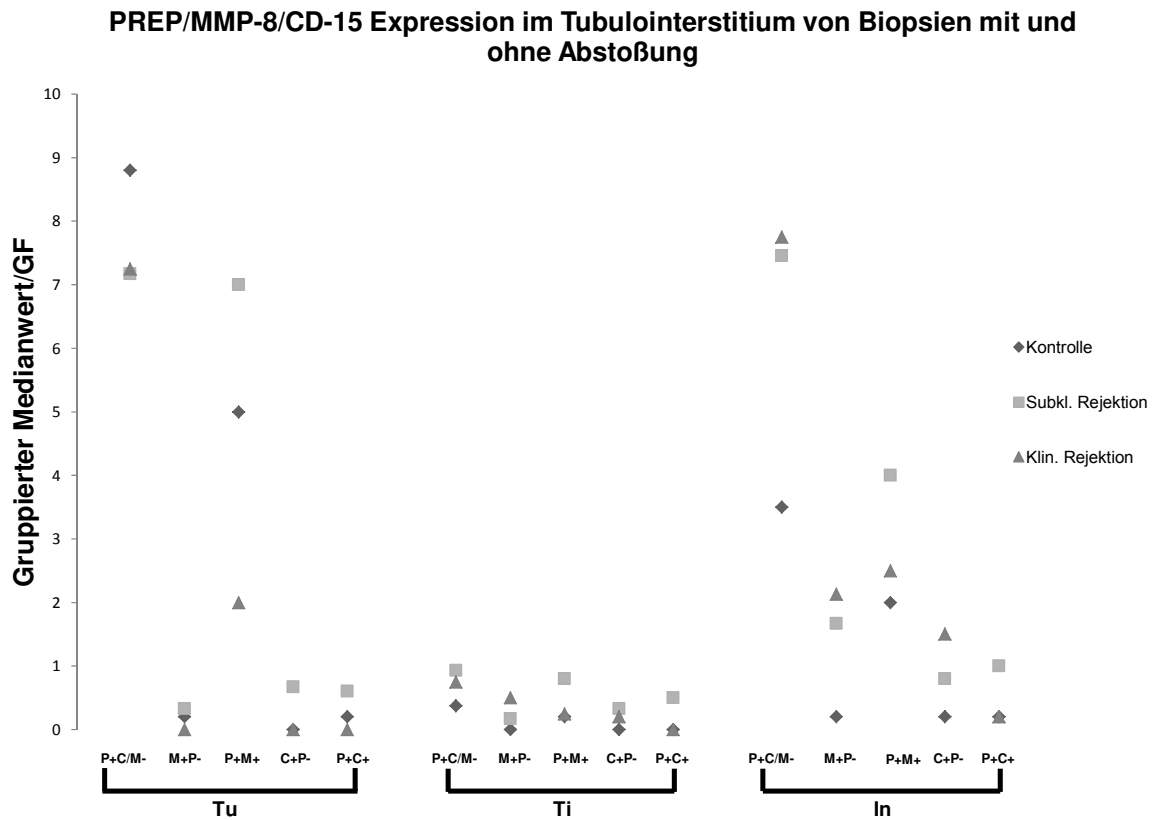


**Abbildung 11a.** Verteilung der einzel- und doppelpositiven Zellen im Tubulointerstitium der Biopsien mit subklinischer und klinischer Abstoßung und der Kontrollen. Gezeigt werden die gruppierten Medianwerte pro Gesichtsfeld. P+: PREP positiv, P-: PREP negativ, M+: MMP-8 positiv, C+: CD15 positiv, C/M-: CD-15 und MMP-8 negativ

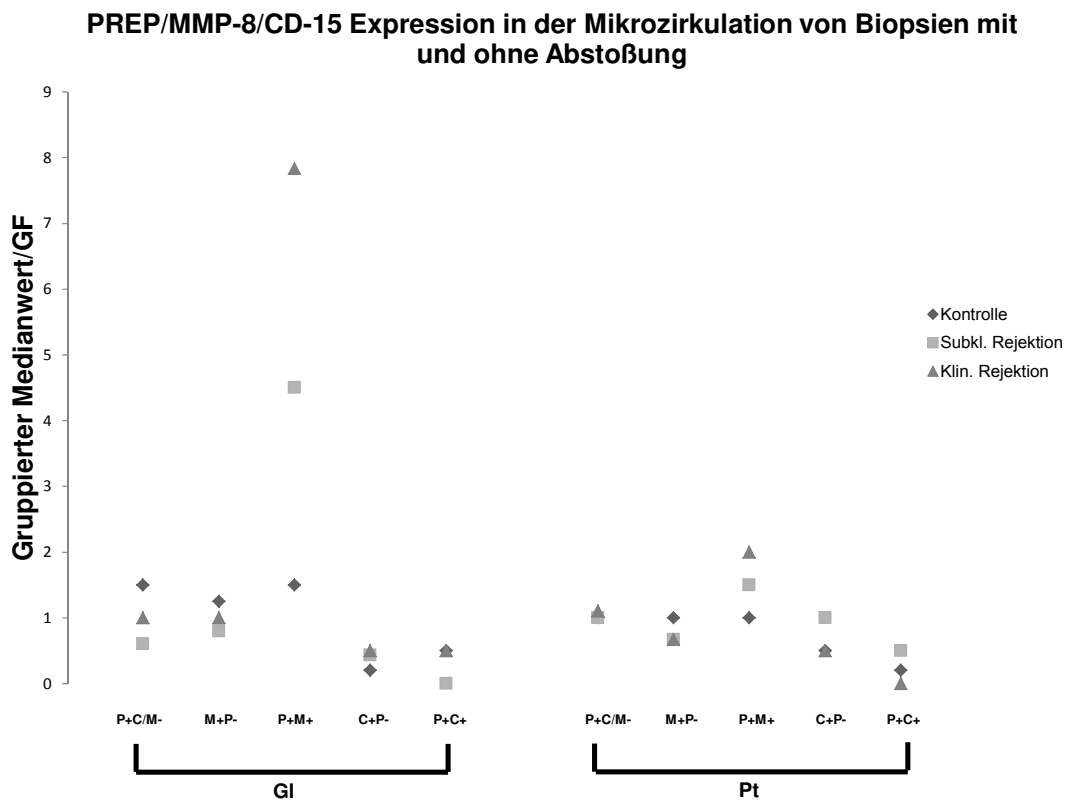


**Abbildung 11b.** Verteilung der einzel- und doppelpositiven Zellen in der Mikrozirkulation in Biopsien mit subklinischer und klinischer Abstoßung und der Kontrollen. Gezeigt werden die gruppierten Medianwerte pro Gesichtsfeld. P+: PREP positiv, P-: PREP negativ, M+: MMP-8 positiv, C+: CD15 positiv, C/M-: CD-15 und MMP-8 negativ

Aus der Zusammenschau aller Befunde können nun folgende Hauptaussagen gemacht werden:

- 1) PREP wird unter normalen Bedingungen überwiegend in den proximalen Tubulusepithelzellen exprimiert. PREP wird bei akuten Abstoßungen in den proximalen Tubulusepithelzellen tendenziell weniger exprimiert. Die zweithöchste PREP Expression wird im interstitiellen Kompartiment bei Kontrollen und Abstoßungen beobachtet. Der Anteil der PREP positiven interstitiellen Zellen nimmt bei den Abstoßungen zu.
- 2) MMP-8 einzelpositive Zellen sind generell kaum nachweisbar, werden aber im Interstitium bei den Abstoßungen statistisch signifikant häufiger gefunden.

- 3) PREP/MMP-8 wird in normalen Tubulusepithelzellen ko-exprimiert und wird bei Abstoßungen tendenziell weniger nachgewiesen. PREP/MMP-8 doppelpositive Zellen sind im interstitiellen, glomerulären und peritubulären Kompartiment bei Rejektion häufiger zu sehen, der Unterschied erreicht jedoch keine statistische Signifikanz.
- 4) PREP wird in fast 50% der Neutrophilen exprimiert, Neutrophile (CD-15 einzelpositiv und CD-15/PREP doppelpositiv zusammen) werden jedoch in Biopsien mit Abstoßungen und in den Kontrollen nur in sehr geringer Zahl nachgewiesen.

#### **4. Diskussion und Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Massenspektrometrie im Urin ein diagnostisches Peptidmodel etabliert, um Patienten mit akuter zellulärer Abstoßung (Banff Kategorien Ia/Ib) zu detektieren. Der molekulare Klassifizierer besteht aus insgesamt 14 einzelnen Peptiden, die in den Rejektionsproben sowohl vermehrt als auch vermindert vorkommen.

Die akute Rejektion ist ein sehr heterogener und komplexer Prozess hinsichtlich der histologischen Läsionen in den verschiedenen morphologischen Kompartimenten der Niere, der immunologischen Mechanismen und der klinischen Präsentation <sup>(31)</sup>. Zum Beispiel sind Marker, die die Aktivierung des Immunsystems reflektieren, in einer relativ frühen Phase zu sehen, während Moleküle, die repräsentativ für Effektorfunktionen zytotoxischer Zellen sind oder bestimmte sekundäre Gewebeveränderungen/Gewebeschädigungen widerspiegeln, eher zu einem späteren Zeitpunkt zu erwarten. Die morphologischen Veränderungen sind abhängig von dem Schweregrad der Abstoßung und können von einem unterschiedlichen lymphoplasmazellulären Entzündungsinfiltrat mit Übergreifen auf das Tubulusepithel bis zu einer transmuralen Entzündungsinfiltration in den Blutgefäßwänden hinausreichen. Es ist daher ersichtlich, dass der Ansatz, mit einem einzigen Marker diese komplexen pathophysiologische Prozesse erfassen zu wollen, zu simplistisch ist <sup>(14)</sup>. Unsere Ergebnisse sind daher biologisch plausibel und stehen in Einklang mit vorangegangenen Studien, in denen diagnostische Peptidmodelle mit unterschiedlicher Expression ihrer einzelnen Peptide beschrieben worden sind <sup>(22,23)</sup>.

Die diagnostische Genauigkeit des etablierten Peptidmodels wurde in einem unabhängigen Probenet von Biopsien mit klinischer und subklinischer Abstoßung und Biopsien ohne Abstoßung untersucht. Das Peptidmodel konnte Patienten mit akuter zellulärer Rejektion mit guter Sensitivität und Spezifität detektieren (AUC=0,91, Sensitivität 93%, Spezifität 78%). Obwohl das Peptid-Panel aus Proben mit nur subklinischer Abstoßung entwickelt wurde,

konnte es Patienten mit subklinischer, aber auch klinischer Abstoßung von Patienten ohne Abstoßung unterscheiden. Dies beruht wahrscheinlich auf der Tatsache, dass subklinische und klinische Abstoßungen Ausdruck der gleichen immunologischen Schädigung sind <sup>(2,5,6,8)</sup> und sich im Wesentlichen zeitlich und anhand des Schweregrades ihrer Ausprägung unterscheiden. Das Peptidmodel wurde ferner nicht an Patienten mit vaskulärer Abstoßung getestet, da bei dieser Abstoßungsreaktion zum Teil andersartige pathogenetische Mechanismen operativ sind <sup>(32)</sup> und aufgrund des fehlenden Kontakts der größeren Gefäße zum renalen Tubulussystem relevante Peptide wahrscheinlich nicht im Urin nachzuweisen sind.

Wichtig war es zu wissen, ob bestimmte lokale und systemische Faktoren oder andere gleichzeitig bestehende Krankheitsentitäten Änderungen in der Zusammensetzung des Urinproteoms hervorrufen können, die die Klassifikation der Proben in Rejektionen und nicht-Rejektionen beeinflussen. Eine große Anzahl von klinischen, laborchemischen und histopathologischen Parametern wurde diesbezüglich an den fehlklassifizierten Proben untersucht. Da akute Rejektionen oft mit einem akuten Tubulusschaden (ATS) einhergehen <sup>(33)</sup>, war es beispielsweise wichtig zu wissen, ob das diagnostische Peptidmodel möglicherweise eher für den akuten Tubulusschaden als für die akute Rejektion repräsentativ ist. Der akute Tubulusschaden hat in der Tat zu keiner signifikanten Fehlklassifizierung der Proben geführt, da nur drei von 14 Patienten der Kontrollgruppe mit ATS (14 von 36 Kontrollen zeigten einen ATS) und fünf von 22 Patienten der Rejektionsgruppen mit ATS (22 von 28 Patienten mit Rejektion zeigten einen ATS) falsch eingeordnet wurden. Ein anderer wichtiger Störfaktor ist der akute Harnwegsinfekt, welcher zur einer Entzündungsreaktion im Harntrakt und teilweise auch des Nierengewebes mit konsekutiver Aktivierung des Immunsystems führen kann <sup>(34,35)</sup>. Bei den 6 Patienten mit Harnwegsinfekt hat das Peptidmodel die Klassifikation der Proben nicht beeinflusst. Die weiteren untersuchten Variablen <sup>(36)</sup> zeigten keinen Unterschied zwischen den richtig und den falsch klassifizierten Patienten. Einschränkend ist jedoch anzumerken, dass der Anteil der falsch klassifizierten Proben -vor allem in der Rejektionsgruppe- sehr gering war, sodass die Identifikation aller möglichen relevanten Störfaktoren nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann.

Die Anwendbarkeit des etablierten Peptidmodels in der klinischen Routine kann letztlich nur mit einer prospektiven Studie an einem ausreichend großen Patientenkollektiv untersucht werden. Das Peptidmuster wird daher aktuell in einer multizentrischen Phase III Studie validiert (registriert bei: [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov); Identifier: NCT01315067). Insgesamt 600 Patienten, die aufgrund einer Funktionsverschlechterung innerhalb des ersten Jahres nach

der Nierentransplantation einer Biopsie bedürfen, werden eingeschlossen. Es soll dabei unter Bedingungen der üblichen klinischen Nachsorge die Sensitivität und die Spezifität des Peptidmusters für die Diagnose der akuten Rejektion in Relation zum Goldstandard -der Nierentransplantatbiopsie- bestimmt werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt bei dieser Studie ist die Definition möglicher Störfaktoren, die mit dem diagnostischen Peptidmuster interferieren. Die Ergebnisse könnten zur Entwicklung eines einfachen, nicht invasiven und zuverlässigen diagnostischen Tests (Rejektionstix) beitragen, der den Einsatz der Nierentransplantatbiopsie selektieren oder sogar teilweise ersetzen könnte.

In einem weiteren Schritt wurden einzelne Peptide des diagnostischen Modells näher untersucht. Vier der insgesamt 14 Peptide bestanden ausschließlich aus Kollagenfragmenten und waren in den Rejektionsproben sowohl hoch- als auch runterreguliert. Mehr als ein Drittel der Kollagenfragmente der Rejektionsproben zeigten ferner das PGP -Motiv im C-Terminus. Die verringerte Konzentration von Kollagenfragmenten könnte auf eine Dysregulation der Abbau- und Umbauvorgänge der extrazellulären Matrix zurückgeführt werden, wobei die reduzierte oder erhöhte Aktivität von Proteasen und Proteaseinhibitoren im Vordergrund steht <sup>(23)</sup>. Auf der anderen Seite legt das vermehrte Vorkommen von Kollagenpeptiden mit dem PGP-Motif im C-Terminus in den Rejektionsproben im Vergleich zu den Kontrollen (Medianwerte 42 vs. 2,5,  $p=0.0002$ ) einen spezifischen proteolytischen Abbau der extrazellulären Matrix nahe. Es gibt Daten, vorwiegend aus dem Bereich der COPD (chronic obstructive pulmonary disease) Forschung, die zeigen, dass die Generierung von PGP-Peptiden ein Prozess ist, der in mehreren Stadien abläuft. Zunächst werden Kollagenfasern von aus Neutrophilen sezernierten Metalloproteasen (MMP-8) denaturiert und in kleinere Fragmenten gespalten, die dann mit Hilfe der Prolylendopeptidase in PGP-Peptide weiterhin degradiert werden <sup>(27,37,38)</sup>.

Die Prolylendopeptidase ist ein zytoplasmatisches Enzym, welches seine proteolytische Aktivität an Oligopeptiden und nicht an einem kompletten Proteinmolekül ausübt <sup>(39,40)</sup> und sowohl in allen Zelltypen des hämatopoetischen Systems als auch im Nierengewebe gefunden wird. Proximale Tubulusepithelzellen weisen die stärkste Expression auf, wohingegen das Enzym in den glomerulären und in den distalen Tubulusepithelzellen schwächer exprimiert wird <sup>(28,41,42)</sup>. Eine basal hohe Expression und Aktivität der PREP in den normalen proximalen Tubulusepithelzellen wurde tierexperimentell und in Zellkulturen nachgewiesen, die dann, interessanterweise, unter Bedingungen der Nierenschädigung zurückgeht <sup>(43-46)</sup>. So haben physiologische Studien im PREP-knock-out Mausmodell gezeigt, dass PREP unter normalen Bedingungen in den Bürstensaum der proximalen Tubulusepithelzellen exprimiert wird und sich beim Katabolismus von Peptiden beteiligt <sup>(43)</sup>.

In Tiermodellen mit akut und chronisch induzierter Fibrose war dagegen sowohl die enzymatische Gesamtaktivität <sup>(45,46)</sup> als auch die tubuläre Expression <sup>(44)</sup> von PREP reduziert. Es ist darüber hinaus bekannt, dass während einer Nierenschädigung die metabolisch sehr aktiven Tubulusepithelzellen erst mit Verlust bzw. Einstellung ihrer zahlreichen energieverbrauchenden Transportsysteme reagieren und dann schwerwiegendere strukturelle Veränderungen entwickeln <sup>(47)</sup>. Was die Nierentransplantation anbelangt, wurde von unterschiedlichen Arbeitsgruppen gezeigt, dass proximale Tubulusepithelzellen während einer zellvermittelten Abstoßungsreaktion molekulare Veränderungen aufweisen, die abhängig vom Zeitpunkt, Schweregrad und Evolution des tubulären Schädigungsprozesses, sich mit Hoch- und/oder Runterregulation in der Expression und Transkription unterschiedlicher Gengruppen äußern <sup>(48-51)</sup>. In dieser Hinsicht werden zuerst molekulare Vorgänge beeinflusst und somit zelluläre Funktionen eingeschränkt, die für das Überleben der Zelle nicht von höchster Priorität sind <sup>(52)</sup>. Unsere Ergebnisse sind in Einklang mit den obigen Beobachtungen. PREP wird in den proximalen tubulären Zellen der Kontrollen ohne Abstoßung exprimiert. Diese basal hohe Expression in normalen Tubulusepithelzellen reduziert sich offensichtlich in der Abstoßung, was als Hinweis auf die mit der Abstoßung einhergehenden Tubulusschädigung gedeutet werden kann. Die positive Korrelation der tubulären PREP-positiven Zellen mit der GFR zum Zeitpunkt der Biopsie ist ein weiterer Hinweis für diesen Zusammenhang. Die Zunahme der Anzahl der PREP-positiven interstitiellen Zellen in den Biopsien mit Abstoßungen entspricht der damit einhergehenden zellvermittelten Immunantwort. Obwohl die Typisierung der infiltrierenden PREP-positiven Zellen nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit gewesen war, vermuten wir, dass sie zu den Monozyten/Makrophagen und/oder den Lymphozyten gehören, da diese Zellen den größten Teil der infiltrierenden Zellpopulationen bei Abstoßungen bilden <sup>(53)</sup> und PREP eindeutig exprimieren können <sup>(28)</sup>.

Matrix-Metalloproteasen spielen bei der akuten zellvermittelten Abstoßungsreaktion eine wichtige pathophysiologische Rolle <sup>(54,55)</sup>. Sie beteiligen sich nicht nur in den Umbauvorgängen (remodeling) der extrazellulären Matrix <sup>(23,56,57)</sup>, sondern scheinen auch eine regulatorische Rolle bei der Migration und Rekrutierung der inflammatorischen Zellen und vor allem der Monozyten und Lymphozyten zu haben <sup>(54,58,59)</sup>. In diesem Zusammenhang hat der Nachweis von MMP-8 positiven Zellen in den interstitiellen Infiltraten der Biopsien mit Abstoßungen eine besondere Bedeutung. Obwohl insgesamt die Ergebnisse die Rolle der MMP-8 in der akuten Rejektion unterstreichen, sind unsere Befunde vorsichtig zu

interpretieren, weil die MMP-8 positiven Zellen in sehr geringer Anzahl auftraten und nur einen sehr kleinen Teil der infiltrierenden Zellpopulationen ausmachten.

PREP/MMP-8-doppelpositive Zellen werden unter normalen Bedingungen in fast allen Kompartimenten (Tu, In, Gl) nachgewiesen. Die Expression von PREP/MMP-8 in den proximalen Tubulusepithelzellen ist bei den Kontrollen stärker als bei den Abstoßungen. PREP/MMP-8 scheint somit im tubulären Kompartiment ein ähnliches Verteilungsmuster und eine ähnliche pathophysiologische Relevanz wie PREP zu zeigen. Interstitiell, glomerulär und peritubulär werden mehr doppelpositive Zellen in den Biopsien mit akuten Abstoßungen im Vergleich zu den Kontrollen gefunden, der Unterschied erreicht aber keine statistische Signifikanz. Die Ergebnisse der Auszählung der doppelpositiven Zellen im interstitiellen Kompartimenten sind in Einklang mit den Ergebnissen der Auszählung der jeweiligen einzelpositiven Zellen. Die Rolle der infiltrierenden interstitiellen PREP/MMP-8 doppelpositiven Zellen in der akuten Rejektion scheint somit vergleichbar mit der der interstitiellen PREP- und MMP-8 einzelpositiven Zellen zu sein. Die erhöhte Anzahl doppelmarkierter Zellen in der Mikrozirkulation der Biopsien mit Abstoßungen könnte aktivierte Zellen des Immunsystems repräsentieren, die kurz davor stehen das Gefäßsystem zu verlassen und ins Interstitium einzuwandern.

Da das Zielantigen CD-15 fast ausschließlich in den Neutrophilen exprimiert wird und Zellinfiltrate aus Neutrophilen in den Abstoßungen normalerweise nicht erwartet werden <sup>(53)</sup>, war die Anzahl der CD-15 positiven Zellen in allen Kompartimenten sehr gering. Abweichend von den Ergebnissen der präliminären Untersuchungen <sup>(36)</sup> zeigten die systematischen Färbungen und die kompartimentspezifische Analyse, dass den Neutrophilen sicher keine Hauptrolle zugeschrieben werden kann. CD-15 wird unter physiologischen Umständen und bei den Rejektionen nur gering exprimiert. Neutrophile bilden nur einen sehr geringen Teil der PREP-exprimierenden Zellen, während PREP in den Neutrophilen nicht uniform exprimiert wird.

Die kleine Anzahl von Biopsien hat wahrscheinlich dazu geführt, dass in der morphologischen Auswertung numerische Unterschiede eine Tendenz aufzeigten, jedoch keine statistische Signifikanz erreichten. Die generierten Daten erlauben uns, die unten stehende Hypothese über die Rolle von PREP und MMP-8 in der akuten interstitiellen Abstoßung aufzustellen (**Abbildung 12**). Die Rolle der PREP in der humoralen und in der vaskulären Rejektion, sowie die weitere Charakterisierung der PREP einzel- bzw. MMP-8 einzel- und PREP/MMP-8 doppelpositiven Zellen muss in nachfolgenden wissenschaftlichen Projekten beschrieben bzw. geklärt werden.

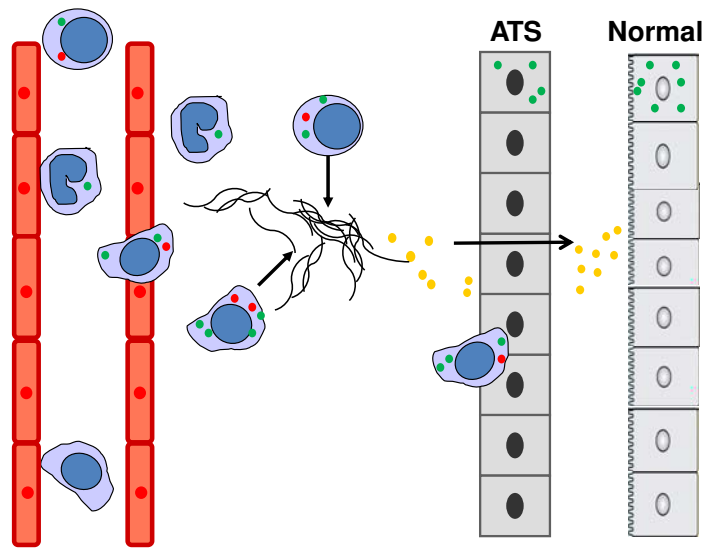


**Abbildung 12:** Mögliches Modell zur Regulation der PGP-Peptide in der akuten tubulointerstitiellen Rejektion. Gezeigt werden ein peritubuläres Kapillargefäß (links), interstitielle Infiltrate (Mitte) und normale sowie geschädigte Tubulusepithelzellen (rechts). PGP-Peptide (gelbe Punkte) entstehen durch Spaltung von Kollagenfasern des Interstitiums unter Mitwirkung von PREP (grüne Punkte) und MMP-8 (rote Punkte), die von infiltrierenden Zellen produziert werden (kleine Pfeile). Die Kollagenfragmente mit dem PGP-Motif werden von Tubulusepithelzellen aufgenommen und dann ins Lumen sezerniert (großes Pfeil). PREP und/oder MMP-8 kann die Migration der aktivierten Zellen vom Kapillarlumen zum Interstitium oder vom Interstitium zum Tubululumen begünstigen. PREP wird in geschädigten Tubulusepithelzellen runterreguliert und scheint sich nicht direkt in der Generierung der PGP Peptide zu beteiligen. **ATS:** akute Tubulusschädigung

In dieser Arbeit wurde die Perspektive der Massenspektrometrie untersucht, um ein Peptidmuster im Urin zu entwickeln, welches Patienten mit akuter tubulointerstitieller Abstoßung mit guter Sensitivität und Spezifität identifizieren kann. Spezifische Peptide in dem definierten Muster finden ihre Entsprechung im unterschiedlichen Vergleich der Expression von Proteasen, die in der Entstehung der Peptide beteiligt sind.

## 5. Zusammenfassung

Die zeitgerechte Diagnose und Therapie von Abstoßungsreaktionen ist ein wichtiges Ziel in der Nachsorge nierentransplantierte Patienten. Die Transplantatnierenbiopsie gilt zwar als Goldstandard für die Diagnose der akuten Rejektion, kann jedoch nicht alle Rejektionsepisoden im Zeitverlauf erfassen und ist mit Risiken vergesellschaftet. Deshalb hat es wiederholt Versuche gegeben, nicht invasive Verfahren für die Rejektionsdiagnose anzuwenden. In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Massenspektrometrie im Urin ein diagnostisches Peptidmodel etabliert, um Patienten mit akuter zellulärer Abstoßung (Banff Kategorien Ia/Ib) zu detektieren. Das Peptidmodel konnte Patienten mit akuter zellulärer Rejektion mit guter Sensitivität und Spezifität identifizieren (AUC=0,91, Sensitivität 93%, Spezifität 78%). Vier von den 14 Peptiden des Models bestanden ausschließlich aus Kollagenfragmenten. Anhand dieser Befunde wurden alle Urinproben nach Kollagenfragmenten untersucht. Es stellte sich dabei heraus, dass in den Rejektionsproben im Vergleich zu den Kontrollen viel häufiger Kollagenfragmente mit dem PGP-Motif im C-Terminus vorkamen. Da diese Kollagenfragmente auf einen spezifischen proteolytischen Abbau der extrazellulären Matrix durch MMP-8 und PREP hindeuten, wurde in einem zweiten Schritt die Rolle beider Peptidasen im Prozess der akuten Abstoßung untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine systematische Analyse definierter Nierenkompartimente in Biopsien mit Abstoßungen und Kontrollen unter Verwendung von Immunfluoreszenzen durchgeführt. Es zeigte sich dabei eine unterschiedliche Expression beider Peptidasen in den Biopsien mit Abstoßungen und in den Kontrollen. PREP wurde in den proximalen Tubulusepithelzellen der Biopsien mit Abstoßungen schwächer exprimiert. In den Abstoßungen zeigten sich zudem häufiger PREP- und MMP-8- einzelpositive Zellen im Interstitium und PREP/MMP-8 doppelpositive Zellen im Interstitium, in den Glomeruli und in den peritubulären Kapillaren. Die Ergebnisse der Urinproteomanalyse korrelieren somit mit pathophysiologischen Prozessen der akuten Rejektion und wurden von den histologischen Befunden untermauert.

## 6. Literaturverzeichnis

- (1) Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am.J.Transplant.* 2004;4(3):378-383.
- (2) El Ters M, Grande JP, Keddiss MT, Rodrigo E, Chopra B, Dean PG, et al. Kidney allograft survival after acute rejection, the value of follow-up biopsies. *Am.J.Transplant.* 2013;13(9):2334-2341.
- (3) Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N.Engl.J.Med.* 2003;349(24):2326-2333.
- (4) Shishido S, Asanuma H, Nakai H, Mori Y, Satoh H, Kamimaki I, et al. The impact of repeated subclinical acute rejection on the progression of chronic allograft nephropathy. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2003;14(4):1046-1052.
- (5) Moreso F, Ibernón M, Goma M, Carrera M, Fulladosa X, Hueso M, 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):747-752.
- (6) Gago M, Cornell LD, Kremers WK, Stegall MD, Cosio FG. Kidney allograft inflammation and fibrosis, causes and consequences. *Am.J.Transplant.* 2012;12(5):1199-1207.
- (7) Moreso F, Carrera M, Goma M, Hueso M, Sellares J, Martorell J, et al. Early subclinical rejection as a risk factor for late chronic humoral rejection. *Transplantation* 2012;93(1):41-46.
- (8) Stegall MD, Park WD, Larson TS, Gloor JM, Cornell LD, Sethi S, et al. The histology of solitary renal allografts at 1 and 5 years after transplantation. *Am.J.Transplant.* 2011;11(4):698-707.
- (9) Chapman JR. Do protocol transplant biopsies improve kidney transplant outcomes? *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 2012;21(6):580-586.
- (10) Seron D, Moreso F. Protocol biopsies in renal transplantation: prognostic value of structural monitoring. *Kidney Int.* 2007;72(6):690-697.
- (11) Mengel M, Sis B, Halloran PF. SWOT analysis of Banff: strengths, weaknesses, opportunities and threats of the international Banff consensus process and classification system for renal allograft pathology. *Am.J.Transplant.* 2007;7(10):2221-2226.
- (12) Reeve J, Sellares J, Mengel M, Sis B, Skene A, Hidalgo L, et al. Molecular diagnosis of T cell-mediated rejection in human kidney transplant biopsies. *Am.J.Transplant.* 2013;13(3):645-655.
- (13) Schwarz A, Gwinner W, Hiss M, Radermacher J, Mengel M, Haller H. Safety and adequacy of renal transplant protocol biopsies. *Am.J.Transplant.* 2005;5(8):1992-1996.
- (14) Gwinner W. Renal transplant rejection markers. *World J.Urol.* 2007;25(5):445-455.

- (15) Clarke W, Silverman BC, Zhang Z, Chan DW, Klein AS, Molmenti EP. Characterization of renal allograft rejection by urinary proteomic analysis. *Ann.Surg.* 2003;237(5):660-4; discussion 664-5.
- (16) Schaub S, Rush D, Wilkins J, Gibson IW, Weiler T, Sangster K, et al. Proteomic-based detection of urine proteins associated with acute renal allograft rejection. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2004;15(1):219-227.
- (17) Schaub S, Wilkins JA, Antonovici M, Krokhin O, Weiler T, Rush D, et al. Proteomic-based identification of cleaved urinary beta2-microglobulin as a potential marker for acute tubular injury in renal allografts. *Am.J.Transplant.* 2005;5(4 Pt 1):729-738.
- (18) O'Riordan E, Orlova TN, Mei JJ, Butt K, Chander PM, Rahman S, et al. Bioinformatic analysis of the urine proteome of acute allograft rejection. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2004;15(12):3240-3248.
- (19) O'Riordan E, Orlova TN, Podust VN, Chander PN, Yanagi S, Nakazato M, et al. Characterization of urinary peptide biomarkers of acute rejection in renal allografts. *Am.J.Transplant.* 2007;7(4):930-940.
- (20) Fliser D, Novak J, Thongboonkerd V, Argiles A, Jankowski V, Girolami MA, et al. Advances in urinary proteome analysis and biomarker discovery. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2007;18(4):1057-1071.
- (21) Wittke S, Haubitz M, Walden M, Rohde F, Schwarz A, Mengel M, et al. Detection of acute tubulointerstitial rejection by proteomic analysis of urinary samples in renal transplant recipients. *Am.J.Transplant.* 2005;5(10):2479-2488.
- (22) Tara K. Sigdel, Amit Kaushal, Marina Gritsenko et al. Shotgun proteomics identifies proteins specific for acute renal transplant rejection. *Proteomics Clin. Appl.* 2010;4:32-47.
- (23) Ling XB, Sigdel TK, Lau K, Ying L, Lau I, Schilling J, et al. Integrative urinary peptidomics in renal transplantation identifies biomarkers for acute rejection. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2010;21(4):646-653.
- (24) Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, 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):518-526.
- (25) Venalainen JI, Garcia-Horsman JA, Forsberg MM, Jalkanen A, Wallen EA, Jarho EM, et al. Binding kinetics and duration of in vivo action of novel prolyl oligopeptidase inhibitors. *Biochem.Pharmacol.* 2006;71(5):683-692.
- (26) Myohanen TT, Venalainen JI, Tupala E, Garcia-Horsman JA, Miettinen R, Mannisto PT. Distribution of immunoreactive prolyl oligopeptidase in human and rat brain. *Neurochem.Res.* 2007;32(8):1365-1374.
- (27) Gaggar A, Jackson PL, Noerager BD, O'Reilly PJ, McQuaid DB, Rowe SM, et al. A novel proteolytic cascade generates an extracellular matrix-derived chemoattractant in chronic neutrophilic inflammation. *J.Immunol.* 2008;180(8):5662-5669.

- (28) Myohanen TT, Pyykko E, Mannisto PT, Carpen O. Distribution of prolyl oligopeptidase in human peripheral tissues and in ovarian and colorectal tumors. *J.Histochem.Cytochem.* 2012;60(9):706-715.
- (29) Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, Lundberg E, Jonasson K, Forsberg M, et al. Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nat.Biotechnol.* 2010;28(12):1248-1250.
- (30) O'Reilly PJ, Hardison MT, Jackson PL, Xu X, Snelgrove RJ, Gaggar A, et al. Neutrophils contain prolyl endopeptidase and generate the chemotactic peptide, PGP, from collagen. *J.Neuroimmunol.* 2009;217(1-2):51-54.
- (31) Womer KL, Kaplan B. Recent developments in kidney transplantation--a critical assessment. *Am.J.Transplant.* 2009;9(6):1265-1271.
- (32) Lefaucheur C, Loupy A, Vernerey D, Duong-Van-Huyen JP, Suberbielle C, Anglicheau D, et al. Antibody-mediated vascular rejection of kidney allografts: a population-based study. *Lancet* 2013;381(9863):313-319.
- (33) Gwinner W, Hinzmann K, Erdbruegger U, Scheffner I, Broecker V, Vaske B, et al. Acute tubular injury in protocol biopsies of renal grafts: prevalence, associated factors and effect on long-term function. *Am.J.Transplant.* 2008;8(8):1684-1693.
- (34) Chassin C, Goujon JM, Darche S, du Merle L, Bens M, Cluzeaud F, et al. Renal collecting duct epithelial cells react to pyelonephritis-associated *Escherichia coli* by activating distinct TLR4-dependent and -independent inflammatory pathways. *J.Immunol.* 2006;177(7):4773-4784.
- (35) Sadeghi M, Daniel V, Naujokat C, Wiesel M, Hergesell O, Opelz G. Strong inflammatory cytokine response in male and strong anti-inflammatory response in female kidney transplant recipients with urinary tract infection. *Transpl.Int.* 2005;18(2):177-185.
- (36) Metzger J, Chatzikyrkou C, Broecker V, Schiffer E, Jaensch L, Iphoefer A, et al. Diagnosis of subclinical and clinical acute T-cell-mediated rejection in renal transplant patients by urinary proteome analysis. *Proteomics Clin.Appl.* 2011;5(5-6):322-333.
- (37) Djekic UV, Gaggar A, Weathington NM. Attacking the multi-tiered proteolytic pathology of COPD: new insights from basic and translational studies. *Pharmacol.Ther.* 2009;121(2):132-146.
- (38) Hardison MT, Galin FS, Calderon CE, Djekic UV, Parker SB, Wille KM, et al. The presence of a matrix-derived neutrophil chemoattractant in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *J.Immunol.* 2009;182(7):4423-4431.
- (39) Rosenblum JS, Kozarich JW. Prolyl peptidases: a serine protease subfamily with high potential for drug discovery. *Curr.Opin.Chem.Biol.* 2003;7(4):496-504.
- (40) Kitchener RL, Grunden AM. Prolidase function in proline metabolism and its medical and biotechnological applications. *J.Appl.Microbiol.* 2012;113(2):233-247.
- (41) Myohanen TT, Venalainen JI, Garcia-Horsman JA, Piltonen M, Mannisto PT. Distribution of prolyl oligopeptidase in the mouse whole-body sections and peripheral tissues. *Histochem.Cell Biol.* 2008;130(5):993-1003.

- (42) Myohanen TT, Garcia-Horsman JA, Tenorio-Laranga J, Mannisto PT. Issues about the physiological functions of prolyl oligopeptidase based on its discordant spatial association with substrates and inconsistencies among mRNA, protein levels, and enzymatic activity. *J.Histochem.Cytochem.* 2009;57(9):831-848.
- (43) Lone AM, Nolte WM, Tinoco AD, Saghatelian A. Peptidomics of the prolyl peptidases. *AAPS J.* 2010;12(4):483-491.
- (44) Macconi D, Tomasoni S, Romagnani P, Trionfini P, Sangalli F, Mazzinghi B, et al. MicroRNA-324-3p promotes renal fibrosis and is a target of ACE inhibition. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2012;23(9):1496-1505.
- (45) Zuo Y, Chun B, Potthoff SA, Kazi N, Brolin TJ, Orhan D, et al. Thymosin beta4 and its degradation product, Ac-SDKP, are novel reparative factors in renal fibrosis. *Kidney Int.* 2013;84(6):1166-1175.
- (46) Rasoul S, Carretero OA, Peng H, Cavasin MA, Zhuo J, Sanchez-Mendoza A, et al. Antifibrotic effect of Ac-SDKP and angiotensin-converting enzyme inhibition in hypertension. *J.Hypertens.* 2004;22(3):593-603.
- (47) Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J.Clin.Invest.* 2011;121(11):4210-4221.
- (48) Scherer A, Gwinner W, Mengel M, Kirsch T, Raulf F, Szustakowski JD, et al. Transcriptome changes in renal allograft protocol biopsies at 3 months precede the onset of interstitial fibrosis/tubular atrophy (IF/TA) at 6 months. *Nephrol.Dial.Transplant.* 2009;24(8):2567-2575.
- (49) Halloran PF, de Freitas DG, Einecke G, Famulski KS, Hidalgo LG, Mengel M, et al. An integrated view of molecular changes, histopathology and outcomes in kidney transplants. *Am.J.Transplant.* 2010;10(10):2223-2230.
- (50) Einecke G, Reeve J, Sis B, Mengel M, Hidalgo L, Famulski KS, et al. A molecular classifier for predicting future graft loss in late kidney transplant biopsies. *J.Clin.Invest.* 2010;120(6):1862-1872.
- (51) Famulski KS, de Freitas DG, Kreepala C, Chang J, Sellares J, Sis B, et al. Molecular phenotypes of acute kidney injury in kidney transplants. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2012;23(5):948-958.
- (52) Einecke G, Kayser D, Vanslambrouck JM, Sis B, Reeve J, Mengel M, et al. Loss of solute carriers in T cell-mediated rejection in mouse and human kidneys: an active epithelial injury-repair response. *Am.J.Transplant.* 2010;10(10):2241-2251.
- (53) Mengel M, Gwinner W, Schwarz A, Bajeski R, Franz I, Brocker V, et al. Infiltrates in protocol biopsies from renal allografts. *Am.J.Transplant.* 2007;7(2):356-365.
- (54) Campbell LG, Ramachandran S, Liu W, Shipley JM, Itohara S, Rogers JG, et al. Different roles for matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in the pathogenesis of cardiac allograft rejection. *Am.J.Transplant.* 2005;5(3):517-528.

(55) Rodder S, Scherer A, Korner M, Eisenberger U, Hertig A, Raulf F, et al. Meta-analyses qualify metzincins and related genes as acute rejection markers in renal transplant patients. *Am.J.Transplant.* 2010;10(2):286-297.

(56) Ronco P, Chatziantoniou C. Matrix metalloproteinases and matrix receptors in progression and reversal of kidney disease: therapeutic perspectives. *Kidney Int.* 2008;74(7):873-878.

(57) Catania JM, Chen G, Parrish AR. Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiologies. *Am.J.Physiol.Renal Physiol.* 2007;292(3):F905-11.

(58) Faveeuw C, Preece G, Ager A. Transendothelial migration of lymphocytes across high endothelial venules into lymph nodes is affected by metalloproteinases. *Blood* 2001;98(3):688-695.

(59) Wu B, Crampton SP, Hughes CC. Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration. *Immunity* 2007;26(2):227-239.

## 7. Anhang Methoden

### A. Liste der primären Antikörper die für die immunhistologischen Färbungen und die Immunfluoreszenzuntersuchungen benutzt wurden.

| Antikörper                                         | Herkunft                               | Hersteller             |
|----------------------------------------------------|----------------------------------------|------------------------|
| Anti-human MMP 8                                   | Polyclonal Rabbit IgG                  | Sigma Life science     |
| Anti-human CD 15                                   | Polyclonal Mouse IgG<br>(unconjugated) | Becton Dickinson GmbH  |
| Anti-human Prolyl<br>Oligopeptidase /PREP Antibody | Polyclonal Chicken IgG                 | University of Helsinki |

### B. POP COLOCALIZATION STAINING OF PARAFFIN-EMBEDDED SECTIONS

#### Materials:

- Goat normal serum (Chemicon)
- Vectashield with DAPI (Vector)
- Primary and secondary antibodies
- Nail polish
- Xylen
- EtOH

#### Solutions:

##### CITRIC ACID BUFFER

4.2 g citric acid (mw 210)

ad 1,5 l water → adjust pH to 6.0 with NaOH → ad 2,0 l water

##### 10 X PBS:

- KCl 2,0 g
- NaCl 80,0 g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,0 g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  11,36 g
- Dilute to 800 ml MilliQ-water
- Adjust pH to 7,4 using NaOH

- Add MilliQ-water to 1 l
- Usable for 1 month in room temperature (as a stock)

1. Heat slides at 58 °C for 30 minutes
2. Deparaffinize:
  - a. Xylen 3\*5 min
  - b. 100% ethanol 3\*3 min
  - c. 96% ethanol 2\*5 min
  - d. 70% ethanol 1\*1 min
  - e. Aqua 2\*3 min
  - f. Pre-operate in microwave oven (800 W), boiling for 3\*5 min in citric acid buffer
  - g. Incubate in last solution for 15 min on ice
  - h. Draw boundaries with hydrophobic pen
3. Rinse 3\*5 min in PBS
4. Incubate slides for 30 minutes in 10% goat NS in PBS (suppresses non-specific binding of IgG)
5. Incubate with **anti-rabbit MMP8 antibody and anti-chicken PREP antibody or anti mouse CD-15 antibody and anti-chicken PREP antibody** overnight at +4 °C in humified chamber. Concentration 1:500 in PBS
6. Rinse 3\*5 min in PBS
7. Incubate with **goat anti-rabbit Alexa red conjugated or anti-mouse red conjugated or anti-chicken green conjugated secondary antibody** for 60 min at room temperature in humified chamber. Concentration 1:500 in NS-PBS
8. COVER FROM LIGHT THIS ON!!
9. Rinse 3\*5 min in PBS
10. Add Vectashield with DAPI
11. Photograph

## RESEARCH ARTICLE

# Diagnosis of subclinical and clinical acute T-cell-mediated rejection in renal transplant patients by urinary proteome analysis

Jochen Metzger<sup>1\*</sup>, Christos Chatzikyrkou<sup>2\*</sup>, Verena Broecker<sup>3</sup>, Eric Schiffer<sup>1</sup>, Lothar Jaensch<sup>4</sup>, Alexander Ipchofer<sup>4</sup>, Michael Mengel<sup>5</sup>, William Mullen<sup>6</sup>, Harald Mischak<sup>1,6</sup>, Hermann Haller<sup>2</sup> and Wilfried Gwinner<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mosaiques Diagnostics GmbH, Hannover, Germany

<sup>2</sup>Nephrology, Medical School, Hannover, Germany

<sup>3</sup>Pathology, Medical School, Hannover, Germany

<sup>4</sup>Division of Cell and Immune Biology, Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Germany

<sup>5</sup>Division of Nephrology/Immunology, Alberta Transplant Applied Genomics Centre, Edmonton, Canada

<sup>6</sup>BHF Glasgow Cardiovascular Research Centre, University of Glasgow, Faculty of Medicine, Glasgow, UK

**Purpose:** Noninvasive diagnosis of acute renal allograft rejection may be advantageous compared with the allograft biopsy.

**Experimental design:** In this study, a multi-marker classification model for rejection was defined on a training set of 39 allograft patients by statistical comparison of capillary electrophoresis mass spectrometry (CE-MS) peptide spectra in urine samples from 16 cases with subclinical acute T-cell-mediated tubulointerstitial rejection and 23 nonrejection controls.

**Results:** Application of the rejection model to a blinded validation set ( $n = 64$ ) resulted in an AUC value of 0.91 (95% CI: 0.82–0.97,  $p = 0.0001$ ). In total, 16 out of 18 subclinical and 10 out of 10 clinical rejections (BANFF grades Ia/Ib), and 28 out of 36 controls without rejection were correctly classified. Acute tubular injury in the biopsies or concomitant urinary tract infection did not interfere with CE-MS-based diagnosis. Sequence information of identified altered collagen  $\alpha(I)$  and  $\alpha(III)$  chain fragments in rejection samples suggested an involvement of matrix metalloproteinase-8 (MMP-8). Biopsy stainings revealed matrix metalloproteinase-8 exclusively in neutrophils located within peritubular capillaries and sparsely, in the tubulointerstitium during rejection.

**Conclusions and clinical relevance:** The established marker set contains peptides related to tubulointerstitial infiltration seen in acute rejection. The set of urinary peptide markers will be used for early diagnosis of acute kidney allograft rejection marker in a multicenter phase III prospective study.

## Keywords:

Acute allograft rejection / Diagnosis / Matrix metalloproteinase / Neutrophils

**Correspondence:** Dr. Jochen Metzger, Mosaiques Diagnostics GmbH, Mellendorfer Street 7-9, 30625 Hannover, Germany

**E-mail:** metzger@mosaiques-diagnostics.com

**Fax:** +49-511-55474431

**Abbreviations:** ATI, acute tubular injury; CI, confidence interval; CMV, cytomegalovirus; Col1A1, collagen type I  $\alpha(I)$ ; MMP, matrix metalloproteinase; ROC, receiver-operating characteristics

## 1 Introduction

Despite all the improvements in immunosuppressive regimens, reliable and timely detection of acute rejection in renal transplant patients remains important to preserve

\*These authors have contributed equally to this study.

**Colour Online:** See the article online to view Figs. 4 and 5 in colour.

long-term allograft function [1]. Post-transplant surveillance for acute rejection is mainly based on regular monitoring of serum creatinine levels, with biopsy upon functional renal impairment. This implies diagnosis of rejection in an advanced stage and earlier stages of immunological injury, where functional impairment is not yet present, remain unrecognized. Protocol biopsies have been introduced to detect acute rejection in an early, subclinical state [2]. However, even with several serial biopsies it is unlikely that all rejection episodes could be captured reliably during a longer period of time.

Thus, attempts have been made to develop noninvasive tests in blood or urine to detect acute rejection. Most of these tests were based on single molecules or a few markers [3]. Mainly due to the lack of sensitivity and specificity, none of the tests has been established in the clinical routine. More recently, MS has been explored [4–11] in an attempt to detect rejection by a larger panel of markers (Table 1). Overall, good performance of the MS test was reported, with AUC values ranging from 0.85 to 0.97. Limitations included small numbers of patients, lacking histological confirmation of the absence of rejection in controls, missing separate validation cohorts, and different protein separation and analysis methods, impeding direct comparison of the peptides among the studies. Thus, the established peptide patterns vary in the number of included peptides as well as in the peptides themselves. Another important issue for the performance of a test is to know the confounders which interfere with diagnosis. To this end, only a few factors have been examined including polyoma virus nephropathy, cytomegaloviremia (CMV), and urinary tract infection (Table 1).

It is obvious that a large multicenter diagnostic trial is necessary once a set of urinary peptides has been defined which can reliably differentiate rejecting from nonrejecting patients. In preparation for such a trial, we undertook this study with a reasonable number of patients to refine our previous work [7], including samples with histologically characterized acute subclinical and clinical rejections and the analysis of potential confounders. Furthermore, sequence information of the identified peptide fragments was used to deduce potential molecular rejection processes and to correlate this histologically in the biopsies with rejection.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Patients

The cross-sectional phase I/II study includes 103 patients (39 for training and 64 for validation) with a kidney or combined pancreas/kidney transplantation from the transplant center of the Medical School Hannover. From all patients, informed consent was obtained to use the urine samples and clinical data. Conductance of the study was

approved by the internal ethics review committee. Clinical and demographic data of the patients included in the training and validation set are summarized in Tables 2 and 3, respectively. End-stage renal disease was related to glomerulonephritis (25.2%), tubulointerstitial disease (6.8%), hypertensive or diabetic nephropathy (13.6%), congenital renal disorders (10.7%), other specified renal diseases (3.9%), and in 39.8% to unknown causes.

For CE-MS analysis, midstream spot urine was collected immediately before performing a protocol biopsy 6 wk ( $n = 34$ ), 3 ( $n = 30$ ), or 6 ( $n = 39$ ) months after transplantation. Samples were analyzed for protein concentration and hematuria/leukocyturia by dipstick and microscopic inspection. In parallel, aliquots were immediately stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until MS processing.

Based on the updated BANFF classification criteria [12, 13], samples were subdivided into those with acute T-cell-mediated tubulointerstitial rejection and without rejection in the concomitant allograft biopsy. Borderline rejections and cases with humoral rejection or significant C4d staining were excluded. In the validation experiments, rejection samples were divided in clinical and subclinical cases. Clinical rejection was defined as an increase in serum creatinine at the time of rejection diagnosis by 20% or more, compared with the previous determinations.

Patient samples were used for different purposes. The training set contained 23 patients without acute rejection and 16 patients with subclinical acute rejection (BANFF grades Ia  $n = 13$ , Ib  $n = 3$ ). The marker set was validated with 18 subclinical rejections (mean increase in serum creatinine at the time of rejection diagnosis of  $-11 \pm 16\%$ ; range of individual increases from  $-33$  to  $13\%$ ) and ten clinical rejections (mean increase in serum creatinine at the time of rejection diagnosis of  $58 \pm 36\%$ ; range of individual increases from  $24$  to  $130\%$ ) graded according to the BANFF classification as Ia ( $n = 23$ ) and Ib ( $n = 5$ ) and 36 nonrejection samples not included in the training set. Validation was performed according to the recommendations for unbiased validation/confirmation of biomarker patterns [14, 15] and in a blinded manner. After unblinding, the validation set was used for the evaluation of confounding factors.

### 2.2 Staining of the biopsies

Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed paraffin-embedded sections of the biopsies. Slides were double stained for CD31 to localize matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) expressing cells in relation to the endothelium of peritubular capillaries. Serial sections were stained for CD68 (macrophages), chloroacetate esterase (granulocytes and mast cells), CD20 (B cells), CD3 (T lymphocytes), CD15 (neutrophils), and CD117 (mast cells) to characterize the MMP-8-expressing cells. The

**Table 1.** Studies using MS for the diagnosis of acute renal allograft rejection

| Reference                | Samples to establish the peptide marker set                                                                       | Biopsy                | Proteomic method | Number of markers for AR diagnosis | Examined confounding factors | Diagnostic performance (AUC) | Independent validation samples                                       | Marker identification (↑ Increased; ↓ decreased in AR) |
|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|------------------|------------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Clarke et al. [4]        | AR ( <i>n</i> = 17)<br>No AR ( <i>n</i> = 15)                                                                     | +<br>–                | SELDI-MS         | 2                                  | None                         | 0.80–0.84                    | No                                                                   | None                                                   |
| Schaub et al. [5, 10]    | AR ( <i>n</i> = 18)<br>No AR ( <i>n</i> = 22)<br>ATI ( <i>n</i> = 5)<br>GN ( <i>n</i> = 5)<br>HC ( <i>n</i> = 28) | +<br>+<br>+<br>+<br>– | SELDI-MS         | 3                                  | CMV                          | Not reported                 | No                                                                   | Cleaved $\beta$ 2-microglobulin ↑                      |
| O'Riordan et al. [6, 11] | AR ( <i>n</i> = 23)<br>No AR ( <i>n</i> = 22)<br>HC ( <i>n</i> = 20)                                              | +<br>–<br>–           | SELDI-MS         | 7                                  | None                         | 0.91                         | No                                                                   | $\beta$ -Defensin ↓<br>$\alpha$ -Anti-chymotrypsin ↑   |
| Wittke et al. [7]        | AR ( <i>n</i> = 19)<br>No AR ( <i>n</i> = 29)<br><br>UTI ( <i>n</i> = 19)                                         | +<br>+<br><br>+       | CE-MS            | 17                                 | UTI<br>CMV<br><br>ATI        | Not reported                 | AR ( <i>n</i> = 9)<br>No AR ( <i>n</i> = 10)<br>UTI ( <i>n</i> = 7)  | None                                                   |
| Sigdel et al. [8]        | AR ( <i>n</i> = 10)<br>No AR ( <i>n</i> = 10)<br><br>NS ( <i>n</i> = 10)<br>HC ( <i>n</i> = 10)                   | +<br>+<br><br>+<br>–  | LC-MS/MS         | 3                                  | None                         | 0.85–0.97                    | AR ( <i>n</i> = 20)<br>No AR ( <i>n</i> = 20)<br>HC ( <i>n</i> = 20) | Uromodulin ↓<br>SERPINF1 ↑<br><br>CD44 ↓               |
| Ling et al. [9]          | AR ( <i>n</i> = 10)<br>No AR ( <i>n</i> = 10)<br>BK ( <i>n</i> = 6)<br>NS ( <i>n</i> = 10)<br>HC ( <i>n</i> = 10) | +<br>+<br>+<br>–<br>– | LC-MALDI-TOF-MS  | 40                                 | BK                           | 0.96                         | AR ( <i>n</i> = 10)<br>No AR ( <i>n</i> = 10)<br>BK ( <i>n</i> = 4)  | Uromodulin ↓<br>Collagen fragments<br>↑↓               |

AR, acute renal allograft rejection; ATI, acute tubular injury; BK, BK virus nephropathy; GN, recurrent/de novo glomerulonephritis; HC, healthy controls with native kidneys; NS, nephrotic syndrome in native kidneys; SERPINF1, pigment epithelium derived factor 1; UTI, urinary tract infection.

following antibodies were used after heat-induced epitope retrieval: MMP-8 (Sigma, Taufkirchen, Germany), CD31, CD68, CD20, CD3 (all from Dako, Hamburg, Germany), CD15 (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany), and CD117 (Zytomed, Berlin, Germany).

### 2.3 Sample preparation for CE-MS analysis

A 0.7-mL urine aliquot was thawed and diluted at 1:2 in 2 M urea, 10 mM  $\text{NH}_4\text{OH}$ , and 0.02% SDS. Different to our previous study [7], 20 kDa molecular weight cutoff Centriscart ultracentrifugation filters (Sartorius, Göttingen, Germany) were used instead of C2 columns to improve the removal of albumin and its derivatives [16]. Ultrafiltration was performed at  $3000 \times g$  until 1.1 mL of filtrate was obtained. The filtrate was desalted with a PD-10 column (GE Healthcare, München, Germany), pre-equilibrated with 0.01%  $\text{NH}_4\text{OH}$  in HPLC-grade water. Samples were lyophilized and stored at 4°C. Before CE-MS analysis, lyophilisates were resuspended in HPLC-grade water to a final protein concentra-

tion of 0.8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , as verified with the bichinchoninic acid assay (Interchim, Montluçon, France).

### 2.4 CE-MS analysis

CE-MS analysis and processing of CE-MS spectra was performed as described in [17, 18]. The default instrumental settings allow an average recovery of sample in the preparation procedure of ~85% and the limit of detection of ~1 fmol. A mass resolution of >8000 enables resolution of monoisotopic mass signals for  $z \leq 6$ . After charge deconvolution, mass accuracy was <25 ppm for monoisotopic resolution and <100 ppm for unresolved peaks ( $z > 6$ ). Analytical precision of the setup was assessed by multiple measurements of the same replicate and of the same urine sample. The 200 most abundant peptides were detected in ~98% of the samples. To ensure high data consistency, only those CE-MS spectra were accepted where a minimum of 950 polypeptides could be detected in a minimal migration time interval of 10 min.

**Table 2.** Demographics and clinical data of the patients from the training set

|                                                       |                             | Number          | %        |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------|----------|
| Recipient gender                                      | Male/female                 | 23/16           | 59/41    |
| Recipient age                                         | Years (mean $\pm$ SD)       | 47.1 $\pm$ 12.5 |          |
| Retransplanted patients                               |                             | 7               | 17.9     |
| Combined pancreas/kidney tx                           |                             | 2               | 5.1      |
| Donor gender                                          | Male/female                 | 22/17           | 56/44    |
| Donor age                                             | Years (mean $\pm$ SD)       | 48.8 $\pm$ 15.3 |          |
| Living kidney donation                                |                             | 4               | 10.3     |
| HLA mismatches                                        |                             |                 |          |
| Locus A                                               | 0/1/2                       | 19/17/3         | 49/43/8  |
| Locus B                                               | 0/1/2                       | 21/12/6         | 54/31/15 |
| Locus DR                                              | 0/1/2                       | 17/15/7         | 44/38/18 |
| Sum of HLA mismatches                                 | Mean $\pm$ SD               | 2.0 $\pm$ 1.8   |          |
| Preformed PRA = 0%                                    |                             | 38              | 97       |
| Delayed graft function                                |                             | 6               | 15.4     |
| Lowest serum creatinine within the first 6 wk post-Tx | $\mu$ mol/L (mean $\pm$ SD) | 147 $\pm$ 43    |          |
| Initial immunosuppressive therapy                     |                             |                 |          |
| Antibody induction                                    | ATG/IL-2                    | 4/30            | 10/77    |
| Cyclosporine A                                        |                             | 29              | 74.4     |
| Tacrolimus                                            |                             | 8               | 20.5     |
| Mycophenolate mofetil                                 |                             | 20              | 51.3     |
| Sirolimus/evrolimus                                   |                             | 6               | 15.4     |
| Prednisolone                                          |                             | 35              | 89.7     |

PRA, panel reactive antibodies; tx, transplantation; HLA, human leukocyte antigen; ATG, anti-thymocyte globuline; and IL-2, interleukin-2.

**Table 3.** Demographics and clinical data of the patients from the validation set

|                                                       |                             | Number          | %        |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------|----------|
| Recipient gender                                      | Male/female                 | 35/29           | 55/45    |
| Recipient age                                         | Years (mean $\pm$ SD)       | 48.2 $\pm$ 14.2 |          |
| Retransplanted patients                               |                             | 7               | 10.9     |
| Combined pancreas/kidney tx                           |                             | 6               | 9.4      |
| Donor gender                                          | Male/female                 | 35/29           | 55/45    |
| Donor age                                             | Years (mean $\pm$ SD)       | 49.4 $\pm$ 14.8 |          |
| Living kidney donation                                |                             | 12              | 18.8     |
| HLA mismatches                                        |                             |                 |          |
| Locus A                                               | 0/1/2                       | 33/21/10        | 52/33/15 |
| Locus B                                               | 0/1/2                       | 23/30/11        | 36/47/17 |
| Locus DR                                              | 0/1/2                       | 25/28/11        | 39/44/17 |
| Sum of HLA mismatches                                 | Mean $\pm$ SD               | 2.2 $\pm$ 1.8   |          |
| Preformed PRA = 0%                                    |                             | 59              | 92       |
| Delayed graft function                                |                             | 14              | 21.9     |
| Lowest serum creatinine within the first 6 wk post-Tx | $\mu$ mol/L (mean $\pm$ SD) | 137 $\pm$ 65    |          |
| Initial immunosuppressive therapy                     |                             |                 |          |
| Antibody induction                                    | ATG/IL-2                    | 2/52            | 3/81     |
| Cyclosporine A                                        |                             | 53              | 82.8     |
| Tacrolimus                                            |                             | 9               | 14.1     |
| Mycophenolate mofetil                                 |                             | 37              | 57.8     |
| Sirolimus/evrolimus                                   |                             | 1               | 1.6      |
| Prednisolone                                          |                             | 60              | 93.8     |

PRA, panel reactive antibodies; tx, transplantation; HLA, human leukocyte antigen; ATG, anti-thymocyte globuline; IL-2, interleukin-2.

In our previous study, selection of discriminating peptide markers was solely based on the frequency of peptides in samples with and without rejection [7]. To

improve marker selection [19], signal amplitudes of the peptides were additionally factored in the multivariate analysis.

## 2.5 CE-MS data processing

Mass spectral ion peaks representing identical molecules at different charge states were deconvoluted into single masses using MosaiquesVisu software [20]. For noise filtering, only signals with  $z > 1$  observed in a minimum of three consecutive spectra with a signal-to-noise ratio of at least 4 were considered for further evaluation. MosaiquesVisu employs a probabilistic clustering algorithm and uses both isotopic distribution (for  $z \leq 6$ ) as well as conjugated masses for charge-state determination of peptides/proteins. The resulting peak list characterizes each polypeptide by its molecular mass and CE migration time. To ensure high mass precision, TOF-MS data are calibrated by linear regression to 80 reference masses exactly determined by CE-FT-ICR-MS. For CE-FT-ICR-MS, an Apex Qe instrument with a 12T magnet and an Apollo II ion source was coupled to the P/ACE 5510 CE unit via an Agilent ESI sprayer as described in [21]. Mean mass deviation of the FT-ICR-calibrated TOF-MS masses improved from  $19 \pm 30$  to  $3 \pm 9$  ppm, referring to the theoretical masses of sequenced peptides. CE migration time and ion signal intensity (amplitude) is affected by different amounts of salt and peptides in the sample which therefore also requires normalization. In both cases, this was achieved by local regression using reference signals of 1770 urinary peptides for CE time calibration and 29 high-abundant peptides (predominantly collagen fragments) with small relative inter-sample ion signal variability for MS signal calibration [22]. The obtained peak lists characterize each polypeptide by its molecular mass (Da), normalized CE migration time (min), and normalized signal intensity. All detected peptides were deposited, matched, and annotated in a Microsoft SQL database allowing further statistical analysis. For clustering, peptides in different samples were considered identical if mass deviation was  $< 50$  ppm for small or 75 ppm for larger peptides. Due to analyte diffusion effects, CE peak widths increase with CE migration time. For data clustering, this effect was considered by linearly increasing cluster widths from 2 to 5% over the time range of 19–45 min in the entire electropherogram. After calibration, deviation of migration time for assignment to a certain cluster was controlled to be below 0.35 min. Peptides were excluded from further evaluation if small signal amplitudes below a signal-to-noise ratio of 4 were present, according to [17, 18].

## 2.6 Statistical analysis of MS data

Sensitivity, specificity, and 95% confidence intervals (CI) was calculated using receiver-operating characteristic (ROC) plots (MedCalc Software 8.1.1.0, Belgium).  $p$ -Values were calculated using the natural logarithm-transformed intensities and the Wilcoxon rank sum test. Multiple testing correction of  $p$ -values was performed by the false discovery rate procedure

from Benjamini and Hochberg [23]. AdaBoost was used as a method to identify peptides that together act as classifier [24].

## 2.7 Classification

For classification of rejection versus nonrejection, the MosaCluster software [25] was used which allows classification of samples in the high-dimensional parameter space by using support vector machine (SVM).

## 2.8 Sequencing of peptides

Peptides were separated by nRP-HPLC (Agilent 1100; flow split by tee to  $\sim 60$  nL/min) and introduced into an Electron Transfer Dissociation-capable Finnigan LTQ quadrupole linear ion trap via  $n$ ESI [21]. The resulting MS/MS data were submitted to MASCOT (Matrix Science, London, UK) for a search against human entries in the MDSB Protein Database (parent ion mass deviation,  $\leq 50$  ppm; fragment ion mass deviation,  $\leq 500$  ppm). Only search results with a MASCOT peptide score of  $> 20$  were included. An additional search was employed against the NCBI human non-redundant database using OMSSA.

## 2.9 Statistical analysis of patient data

Continuous data were examined for normal distribution. Depending on these results, group comparisons were performed with  $t$ -test and one-way ANOVA or with the Wilcoxon's  $u$ -test and the Kruskal–Wallis test. Categorical data were analyzed with the chi-square or by the Fisher's exact test. A  $p$ -value of  $< 0.05$  was considered as being statistical significant. Correlations were analyzed by the Spearman rank correlation test.

## 3 Results

### 3.1 Development of the urinary peptide pattern for acute rejection

To identify peptides for acute allograft rejection, we used a randomly selected training set of patients with subclinical acute T-cell-mediated tubulointerstitial rejection ( $n = 16$ ) and compared these with a control group without rejection ( $n = 23$ ; Table 2). From a pool of 5010 urinary peptides that remained in the CE-MS peptide list after noise filtering, 387 peptides were identified with a  $p$ -value of  $< 0.05$ . Multivariate statistical analysis identified only one peptide (ID-3796) with a Benjamini Hochberg-adjusted  $p$ -value of  $< 0.05$ . With this single peptide, a sensitivity of 95% was obtained, but specificity was only 61%. Therefore, the 387 peptides were subjected to AdaBoost [24], which resulted in

the definition of 27 urinary peptides with moderate discriminatory capacity in multivariate analysis. Of these, 13 were selected by take-one-out optimization [26] when combined with ID-3796 to establish the multi-marker set (Table 4). ROC analysis of the established model demonstrated high accuracy in cross-validation of the training set (AUC = 0.89; data not shown).

### 3.2 Validation of urinary peptide pattern for acute rejection

The established model was validated in 36 patients without rejection and 28 patients with acute T-cell-mediated tubulointerstitial rejection, including 18 subclinical and 10 clinical rejection episodes ( $n = 64$ , Table 3). As shown in Fig. 1, this resulted in a ROC curve with an AUC of 0.91 (95% CI: 0.82–0.97,  $p = 0.0001$ ).

Table 5 summarizes the differential excretion profiles of the peptides included in the allograft rejection model in the subclinical and clinical rejection as well as in the nonrejection group of the validation set. Differences in the amplitude were evident for several peptides, as for instance peptide ID-151296 which was more than doubled in subclinical rejection and more than five-fold increased in clinical rejection. Other markers like peptide ID-114633 showed an increase in frequency only in clinical rejection; yet, signal amplitudes of the marker were already higher in the subclinical rejection group compared with the nonrejection group. On the other hand, several peptides (7 out of 14) were decreased in

rejection patients, particularly in clinical rejection cases. An exception is peptide ID-3796, which only exhibit high frequencies in subclinical cases. These differences in peptide patterns are shown in Fig. 2.

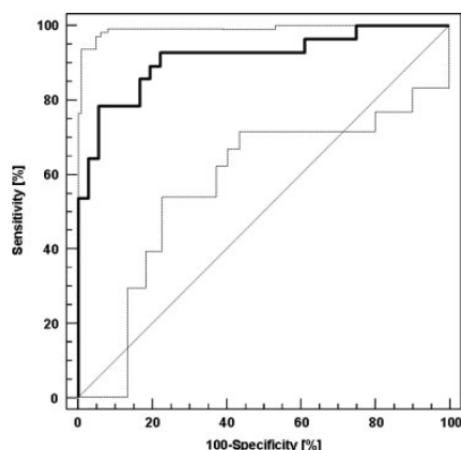


**Figure 1.** ROC curve for classification of the validation set with the allograft rejection-specific peptide marker model. On the basis of the ROC curve, an AUC of 0.91 and a 95% CI from 0.82 to 0.97 was calculated with a  $p$ -value being 0.0001. Using a cutoff of  $-1.08$  as classification threshold, sensitivity and specificity are 93 and 78%, respectively.

**Table 4.** List of urinary peptides indicative for acute allograft rejection

| Peptide ID | Molecular weight (Da) | Benjamini Hochberg-adjusted $p$ -value | Unadjusted $p$ -value | Sequence                                            | Parent                     | Regulation |
|------------|-----------------------|----------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------|------------|
| 3796       | 884.29                | 1.99E-4                                | 5.41E-8               | SpGRDGS <sub>p</sub> GAKGDRGET                      | Collagen $\alpha$ -1 (I)   | ↑          |
| 53589      | 1663.63               | 4.09E-1                                | 1.11E-2               |                                                     |                            | ↓          |
| 54242      | 1674.76               | 4.45E-1                                | 2.63E-2               |                                                     |                            | ↓          |
| 56806      | 1723.52               | 3.64E-1                                | 7.72E-3               |                                                     |                            | ↓          |
| 85262      | 2280.97               | 4.21E-1                                | 1.32E-2               | TGPIGP <sub>p</sub> GPAG <sub>p</sub> GDKGESGPAGPTG | Collagen $\alpha$ -1 (I)   | ↑          |
| 85324      | 2282.02               | 3.61E-1                                | 4.68E-3               |                                                     |                            | ↑          |
| 86025      | 2298.00               | 4.71E-1                                | 4.85E-2               |                                                     |                            | ↓          |
| 94308      | 2471.16               | 4.64E-1                                | 3.62E-2               |                                                     |                            | ↓          |
| 95746      | 2507.13               | 3.78E-1                                | 8.35E-3               | ApGQNGEPGGkGERGAPGEkGEGGPpG                         | Collagen $\alpha$ -1 (III) | ↓          |
| 113037     | 2878.29               | 3.21E-1                                | 6.96E-4               | RGpPGPPGkNGDDGEAGKPRPGERGPpGp                       | Collagen $\alpha$ -1 (I)   | ↓          |
| 113765     | 2898.31               | 3.78E-1                                | 8.49E-3               |                                                     |                            | ↓          |
| 114633     | 2923.38               | 4.25E-1                                | 1.90E-2               |                                                     |                            | ↑          |
| 149843     | 4046.84               | 3.61E-1                                | 6.53E-3               |                                                     |                            | ↑          |
| 151296     | 4098.97               | 4.64E-1                                | 3.66E-2               |                                                     |                            | ↑          |

Comparison was based on the distribution frequencies and amplitude levels between the 23 nonrejection controls and 16 subclinical rejections of the training set. Molecular weight of peptides is expressed in daltons. The direction of regulation is indicated in the last row by up or downpointing arrows. Lower case p and k indicates hydroxyproline and hydroxylysine, respectively.

**Table 5.** Distribution frequencies and signal amplitudes of the peptide markers

| Peptide ID | No rejection          |           | Subclinical rejection |           | Clinical rejection    |           |
|------------|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------|
|            | Mean counts $\pm$ SEM | Frequency | Mean counts $\pm$ SEM | Frequency | Mean counts $\pm$ SEM | Frequency |
| 3796       | 38 $\pm$ 143          | 0.25      | 265 $\pm$ 292         | 0.72      | 178 $\pm$ 279         | 0.4       |
| 53589      | 51 $\pm$ 139          | 0.25      | 59 $\pm$ 137          | 0.22      | 0 $\pm$ 0             | 0.0       |
| 54242      | 108 $\pm$ 258         | 0.31      | 5 $\pm$ 21            | 0.06      | 14 $\pm$ 43           | 0.1       |
| 56806      | 29 $\pm$ 108          | 0.11      | 5 $\pm$ 19            | 0.06      | 3 $\pm$ 9             | 0.1       |
| 85262      | 326 $\pm$ 1208        | 0.17      | 586 $\pm$ 816         | 0.50      | 1150 $\pm$ 1542       | 0.6       |
| 85324      | 40 $\pm$ 194          | 0.14      | 22 $\pm$ 44           | 0.22      | 86 $\pm$ 130          | 0.5       |
| 86025      | 49 $\pm$ 96           | 0.31      | 9 $\pm$ 24            | 0.17      | 103 $\pm$ 254         | 0.2       |
| 94308      | 176 $\pm$ 376         | 0.56      | 104 $\pm$ 174         | 0.50      | 9 $\pm$ 21            | 0.2       |
| 95746      | 63 $\pm$ 206          | 0.28      | 2 $\pm$ 7             | 0.06      | 4 $\pm$ 12            | 0.1       |
| 113037     | 117 $\pm$ 292         | 0.25      | 47 $\pm$ 112          | 0.17      | 4 $\pm$ 15            | 0.1       |
| 113765     | 74 $\pm$ 129          | 0.42      | 6 $\pm$ 27            | 0.06      | 5 $\pm$ 19            | 0.1       |
| 114633     | 377 $\pm$ 781         | 0.28      | 794 $\pm$ 1508        | 0.33      | 7950 $\pm$ 11003      | 0.7       |
| 149843     | 9 $\pm$ 51            | 0.06      | 119 $\pm$ 343         | 0.33      | 474 $\pm$ 827         | 0.5       |
| 151296     | 2161 $\pm$ 3145       | 0.53      | 4711 $\pm$ 6092       | 0.72      | 11960 $\pm$ 9157      | 0.8       |

Values are given for controls without rejection ( $n = 36$ ), subclinical ( $n = 18$ ), and clinical ( $n = 10$ ) rejections of the validation set. Most single molecule markers have a low frequency of distribution, suggesting intrinsic heterogeneity of the allograft rejection underlying mechanisms.

Acute tubulointerstitial rejection is often associated with acute tubular injury (ATI) [27]. In our validation group, 22 of the 28 biopsies with rejection had simultaneously ATI present, compared with 14 of the 36 biopsies without rejection. Therefore, an important clinical question was whether the pattern reflects tubular injury. There was no evidence that ATI per se leads to incorrect classification of patients without rejection (3 false-positive classifications in the 14 cases with ATI versus 5 false positives in the 22 patients without ATI). No other findings which were concomitantly present in the biopsies were found to be related to incorrect classification of the biopsies (data not shown).

Further variables were examined to identify potential confounders (for a complete list, see Supporting Information Table 1). Urinary tract infection was present in four patients of the rejection group and in two patients of the nonrejecting controls; none of these cases was misclassified. There were only two patients with CMV antigenemia (one with acute rejection) and both were correctly classified.

### 3.3 Peptide marker identification and relation to pathology

We could identify the sequences of four peptides. Three peptides were fragments of collagen type I  $\alpha$ (I) (Col1A1) and 1 of collagen type I  $\alpha$ (III). Due to this high prevalence of Col1A1-derived peptides, we expanded our analysis to all 288 by CE-MS identified Col1A1 fragments. Using the predefined cutoff for small signal amplitudes (Section 2), 182 different Col1A1 fragments were retrieved in the rejection or control group. Thirty-nine percent of the fragments that were increased in rejection samples revealed a PGP motif at the C-terminus compared with 13% of the

downregulated fragments ( $p = 0.0003$ ). This pattern was present in both subclinical and clinical rejections but with generally higher peptide amplitudes in clinical cases (42.0 versus 2.5; expressed as median-fold over the controls,  $p = 0.0002$ ). The change of mean signal amplitudes of the different urinary Col1A1 fragments compared with nonrejection controls is shown in Fig. 3 for the subclinical (upper panel) and clinical (lower panel) rejection group.

Since c-terminal PGP motif-containing collagen fragments are indicative for MMP-8-mediated extracellular matrix degradation [28, 29], biopsies were stained for MMP-8 (Fig. 4A–C). Biopsies without rejection had very low numbers of MMP-8-positive cells (0.0–1.1/high power field; median, 0.2), whereas biopsies with rejection had increased numbers (0.5–28.3/high power field; median, 4.1). Morphologically, cells were identified as polymorphonuclear cells which are predominantly localized in peritubular and glomerular capillaries and occasionally, in the interstitial infiltrates. By histochemistry, cells were positive for the granulocyte and mast cell marker chloroacetate esterase (data not shown). Immunohistochemistry showed positivity of these cells for the neutrophilic marker CD15 but not for the mast cell marker CD117 (Fig. 5A and B). Also, the MMP-8 pattern did not correlate with the staining for the macrophage marker PGM-1, and the B- and T-cell markers CD20 and CD3 (data not shown).

## 4 Discussion

In this study, a urine peptide marker set was established to detect acute T-cell-mediated tubulointerstitial rejection. Only one (ID-3796) of the 387 peptides that was different between samples with and without rejection had a signifi-

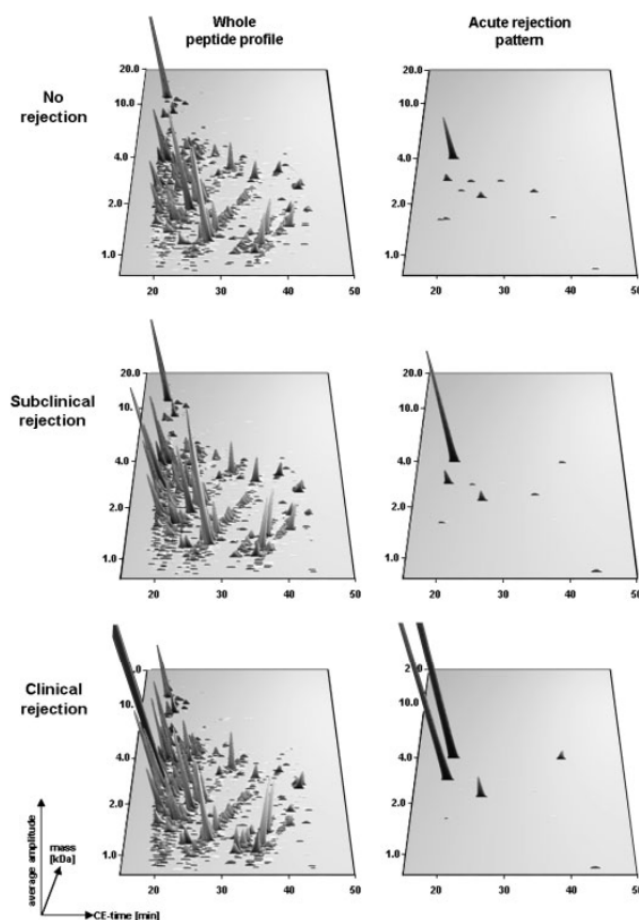


**Figure 2.** CE-MS spectra of whole urinary peptides (left column) and the group of peptides included in the rejection-specific marker set (right column), respectively, for nonrejecting controls ( $n = 36$ ; upper panel), subclinical rejections ( $n = 18$ ; middle panel), and clinical rejections ( $n = 10$ ; lower panel) of the validation set. Normalized log molecular weight in kDa is plotted against normalized CE migration time in minutes. The mean signal intensity is presented as peak height. Differential peptide marker excretion is more prominent in clinical rejection compared with subclinical cases. Log molecular mass range, 0.8–20.0 kDa; CE migration time range, 15–50 min; maximum intensity, 0.6 for total and 0.05 for rejection-specific polypeptides.

cant Benjamini Hochberg-adjusted  $p$ -value. So far, we have not been able to get sequence information, presumably because of the small size (<900 Da, seven to eight amino acids) and polar nature of the molecule. The ID-3796 peptide showed high sensitivity for the rejection diagnosis but low specificity. Specificity became higher after including 13 additional peptides in the marker set, leading to an AUC of 0.89 in the training cohort. Each of these 13 peptides was representative only for some of the rejection samples. This was not an unexpected result. Acute rejection is a heterogeneous process with regard to the involved renal structures (tubular epithelium, tubulointerstitium, and blood vessels) and types of infiltrating cells. Also, early and advanced stages of rejection and different grades of functional impairment may contribute to the heterogeneity [3, 30]. In

this situation, a panel of markers could better reflect distinct stages of the rejection process.

Similar to other studies [6, 8, 9], the marker set contained peptides with higher or lower abundance in terms of frequency and amplitude. Applying these criteria to the validation set, samples with and without rejection could be satisfactorily discriminated (AUC = 0.91). Subclinical and clinical rejections were detected although the training set contained only subclinical rejections. Although distinct differences in the fine composition of the peptides were present in subclinical and clinical rejections, the overall ability of the marker set to depict both forms suggests that they share pathophysiological similarities. One objection could be that the clinical rejection samples in our validation set were derived from protocol biopsies and thus

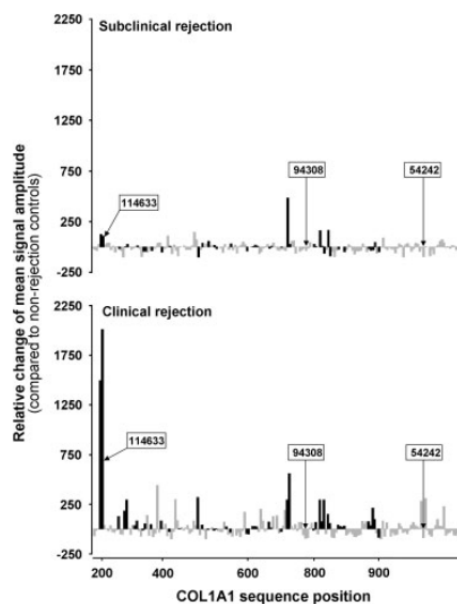


**Figure 3.** Col1A1 peptide distribution in patients with subclinical and clinical rejection (validation group). Peptides with a PGP sequence motif at the c-terminus are shown as black bars and those without the PGP motif as grey bars. Peptides are ordered on the x-axis according to their appearance in the Col1A1 coding sequence. The relative change of mean amplitude on the y-axis was calculated according to  $([Amp_{avg}Rej^+ - Amp_{avg}Rej^-] / Amp_{avg}Rej^-) \times 100$ . Peptides included in the marker set for rejection are marked by their peptide ID.

questioning the validity of the marker set in the setting of biopsies “for cause.” However, impairment of graft function in our protocol biopsy samples was significant, with increases in serum creatinine at the time of rejection diagnosis from 24 to 130% over the patient's baseline values. Such impairment would have triggered a biopsy “for cause” anyway if patients had not received the protocol biopsy at this point.

An important issue is to know the factors that could interfere with the test's sensitivity and specificity. Previous studies suggested confounding effects by ATI, polyoma virus nephropathy, urinary tract infection and even, by extra-renal factors like CMV infection [3]. An important question was if concomitant ATI affects the classification. Acute rejection is often accompanied by ATI [27] and one concern was that the peptide set rather represents markers for ATI than for the rejection itself. This would affect primarily the specificity, identifying patients without rejection but with ATI as rejecting cases, but possibly also the sensitivity to detect acute rejections which are not accompanied by tubular injury. In the validation group, 79% of the patients with rejection and 39% of the nonrejecting cases had ATI but we found no evidence that the presence or absence of ATI impeded correct classification. Similarly, other concomitantly present biopsy findings like interstitial fibrosis, tubular atrophy, tubulointerstitial microcalcifications or isometrical vacuolization of tubular epithelial cells (as an indicator of calcineurin inhibitor toxicity) did not affect the classification results.

Another frequent finding in renal transplant patients is urinary tract infection which might elicit an inflammatory cytokine response with activation of the host immune system, thereby mimicking features of acute rejection [31, 32]. Our results on the six patients so far do not indicate that urinary tract infection impairs the classification. Nevertheless, simple dipstick testing for infection or urinary sediment analysis might be advisable. CMV infections were

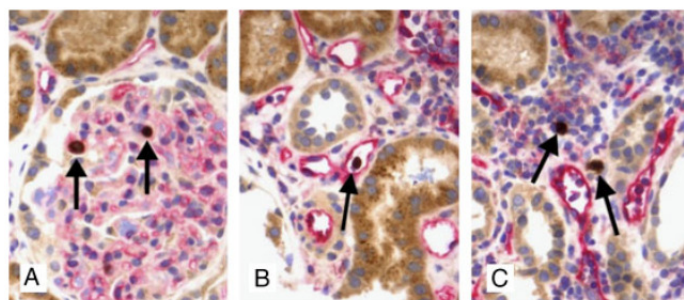


**Figure 4.** Identification of MMP-8 expression in biopsies from patients with and without tubulointerstitial rejection ( $n=6$  each for subclinical and for clinical rejection, five controls without rejection). Double staining for CD31 (endothelial cells, red) and MMP-8 (brown) (A–C, original magnification A and B  $\times 400$ , C  $\times 200$ ). In biopsies with rejection, MMP-8-positive cells can be found in glomerular capillaries (A), peritubular capillaries (B), and in the interstitium in the areas of interstitial infiltrates (C). In the latter, they represent the minority of infiltrating inflammatory cells. Samples without rejection showed virtually no MMP-8-positive infiltrating cells (data not shown).

### Clinical Relevance

Acute rejection is an important factor that determines long-term function and survival of the renal allograft. Timely detection and sufficient anti-rejection therapy of acute rejection episodes is required to conserve the allograft function. Protocol biopsies have been used to detect acute rejection in an early, subclinical stage, where functional impairment is not as yet present. Using CE-MS, we established a

set of urinary peptides with the aim of reliably detecting acute rejection of renal allografts at an early stage during the first year of post-transplant care. Based on this study, a multicenter phase III study will be executed to evaluate if the proteomic test can be used in the regular post-transplant surveillance for acute rejection in place or as decision guidance of a biopsy.

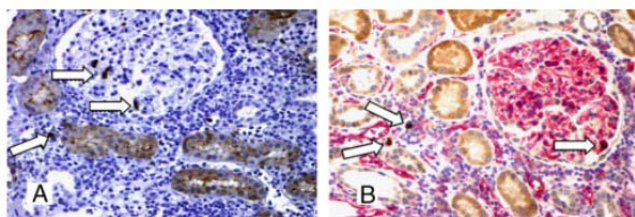


**Figure 5.** Immunohistochemistry for CD15 (A) of sections adjacent to the MMP-8-stained sections (B). The MMP-8-positive cells correlate with the staining for CD15 (original magnification,  $\times 200$ ).

too rare to reach firm conclusions although none of these cases was misclassified. All other examined factors and conditions were not different between correctly classified and misclassified patients although the small number of misclassified patients (particularly rejection cases) may preclude identification of all relevant factors.

In the previous studies, differing peptide marker sets were established, presumably attributable to differences in sample processing and analysis (Table 1). Different to our previous work [7], ultracentrifugation filters were used to improve the removal of albumin derivatives [16] and selection of peptide markers was based on the multivariate comparison of peptide frequencies and amplitude differences [19]. As a result, the marker set of the present study is not comparable to our previous study. In three previous studies, fragments of uromodulin [8, 9] and  $\beta 2$ -microglobulin [5, 10] were identified in rejection samples. We found no association of these molecules with rejection, however,  $\beta 2$ -microglobulin fragments correlated with ATI in samples with and without rejection in our cohort. (Supporting Information Fig. 1 and Supporting Information Table 2). In this line, our group recently described  $\beta 2$ -microglobulin fragments as markers for acute kidney injury in nontransplanted patients [33].

Similar to the recent studies [8, 9], collagen fragment excretion was altered in samples with rejection. By sequence analysis, three fragments were identified as Col1A1 derived and another from collagen type I  $\alpha$ (III). In general, collagen fragments are the main constituents of the urinary peptidome [34], and it was previously suggested that their changes indicate altered proteolytic turnover [35]. We discovered

a preponderance of c-terminal PGP motifs on upregulated Col1A1 fragments which indicates MMP-8-mediated extracellular matrix degradation [28]. Expression of MMPs at peritubular capillaries could facilitate trans-endothelial migration of infiltrating cells into the interstitium and into the tubules [29, 36]. So far, MMP-2 and MMP-9 have been identified in the context of acute renal allograft rejection [9, 37–39]. Immunohistochemistry revealed neutrophils close to the endothelium as the MMP-8-positive cells. The pathophysiological significance of these findings is unclear as these cells and MMP-8 have not been implicated in acute T-cell-mediated rejection [40, 41]. Nevertheless, the fact that MMP-8 effects – deduced from the established peptide pattern for rejection – could be subsequently verified by positive staining for MMP-8 in rejection biopsies but not in the controls strengthens the validity of our marker set.

A few limitations need to be addressed. Acute humoral rejections were not included in the study because, in all likelihood, the different pathomechanisms of this clinical entity would have required to establish a separate peptide marker set. Also, we were not able to examine the samples after successful rejection treatment, as these were not available in a systematic fashion.

To prove that this test is efficacious in the routine setting of the post-transplant patient care, a prospective, multicenter, blinded phase III trial will be performed during a 3-year period starting 2011 in 12 German transplant centers enrolling 600 patients with biopsies within the first year of transplantation. Meticulous collection of clinical data including potential confounders and rigorous histological

standards (BANFF classification, repeat central biopsy reading) in the trial will maximize the interpretation of the obtained MS results.

This work was supported in part by grant 0315272A (ProOrganTX) from the BMBF to H.M. and J.M. and the European Community's Seventh Framework Programme, grant agreement HEALTH-F2-2009-241544 (SysKID) to H.M.

The authors have declared the following conflict of interest: H.M. is founder and co-owner of Mosaïques Diagnostics, who developed the CE-MS technology and the MosaïquesVisu and MosaCluster software. J.M. and E.S. are employees of Mosaïques Diagnostics.

## 5 References

- [1] Meier-Kriesche, H. U., Schold, J. D., Srinivas, T. R., Kaplan, B., Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am. J. Transplant.* 2004, 4, 378–383.
- [2] Rush, D. N., Nickerson, P., Jeffery, J. R., McKenna, R. M. et al., Protocol biopsies in renal transplantation: research tool or clinically useful? *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 1998, 7, 691–694.
- [3] Gwinner, W., Renal transplant rejection markers. *World J. Urol.* 2007, 25, 445–455.
- [4] Clarke, W., Silverman, B. C., Zhang, Z., Chan, D. W. et al., Characterization of renal allograft rejection by urinary proteomic analysis. *Ann. Surg.* 2003, 237, 660–664.
- [5] Schaub, S., Rush, D., Wilkins, J., Gibson, I. W. et al., Proteomic-based detection of urine proteins associated with acute renal allograft rejection. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004, 15, 219–227.
- [6] O'Riordan, E., Orlova, T. N., Mei, J. J., Butt, K. et al., Bioinformatic analysis of the urine proteome of acute allograft rejection. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004, 15, 3240–3248.
- [7] Wittke, S., Haubitz, M., Walden, M., Rohde, F. et al., Detection of acute tubulointerstitial rejection by proteomic analysis of urinary samples in renal transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 2005, 5, 2479–2488.
- [8] Sigdel, T. K., Kaushal, A., Gritsenko, M., Norbeck, A. D. et al., Shotgun proteomics identifies proteins specific for acute renal transplant rejection. *Proteomics Clin. Appl.* 2010, 4, 32–47.
- [9] Ling, X. B., Sigdel, T. K., Lau, K., Ying, L. et al., Integrative urinary peptidomics in renal transplantation identifies biomarkers for acute rejection. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010, 21, 646–653.
- [10] Schaub, S., Wilkins, J. A., Antonovici, M., Krokhn, O. et al., Proteomic-based identification of cleaved urinary beta2-microglobulin as a potential marker for acute tubular injury in renal allografts. *Am. J. Transplant.* 2005, 5, 729–738.
- [11] O'Riordan, E., Orlova, T. N., Podust, V. N., Chander, P. N. et al., Characterization of urinary peptide biomarkers of acute rejection in renal allografts. *Am. J. Transplant.* 2007, 7, 930–940.
- [12] Racusen, L. C., Solez, K., Colvin, R. B., Bonsib, S. M. et al., The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int.* 1999, 55, 713–723.
- [13] Sis, B., Mengel, M., Haas, M., Colvin, R. B. et al., Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am. J. Transplant.* 2010, 10, 464–471.
- [14] Knepper, M. A., Common sense approaches to urinary biomarker study design. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009, 20, 1175–1178.
- [15] Mischak, H., Apweiler, R., Banks, R. E., Conaway, M. et al., Clinical proteomics: a need to define the field and to begin to set adequate standards. *Proteomics Clin. Appl.* 2007, 1, 148–156.
- [16] Theodorescu, D., Fliser, D., Wittke, S., Mischak, H. et al., Pilot study of capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry as a tool to define potential prostate cancer biomarkers in urine. *Electrophoresis* 2005, 26, 2797–2808.
- [17] Theodorescu, D., Wittke, S., Ross, M. M., Walden, M. et al., Discovery and validation of new protein biomarkers for urothelial cancer: a prospective analysis. *Lancet Oncol.* 2006, 7, 230–240.
- [18] Kolch, W., Neususs, C., Pelzing, M., Mischak, H., Capillary electrophoresis-mass spectrometry as a powerful tool in clinical diagnosis and biomarker discovery. *Mass Spectrom. Rev.* 2005, 24, 959–977.
- [19] Dakna, M., He, Z., Yu, W. C., Mischak, H., Kolch, W., Technical, bioinformatic and statistical aspects of liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) based clinical proteomics: a critical assessment. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2009, 877, 1250–1258.
- [20] Neuhoﬀ, N., Kaiser, T., Wittke, S., Krebs, R. et al., Mass spectrometry for the detection of differentially expressed proteins: a comparison of surface-enhanced laser desorption/ionization and capillary electrophoresis/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2004, 18, 149–156.
- [21] Good, D. M., Wirtala, M., McAlister, G. C., Coon, J. J., Performance characteristics of electron transfer dissociation mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* 2007, 6, 1942–1951.
- [22] Jantos-Siwy, J., Schiffer, E., Brand, K., Schumann, G. et al., Quantitative urinary proteome analysis for biomarker evaluation in chronic kidney disease. *J. Proteome Res.* 2009, 8, 268–281.
- [23] Benjamini, Y., Hochberg, Y., Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. B (Methodological)* 1995, 57, 289–300.
- [24] Freund, Y., Schapire, R. E., A decision-theoretic generalization of on-line learning and an application to boosting. *J. Comput. Syst. Sci.* 1997, 55, 119–139.
- [25] Wittke, S., Fliser, D., Haubitz, M., Bartel, S. et al., Determination of peptides and proteins in human urine with capillary electrophoresis-mass spectrometry, a suitable tool for

- the establishment of new diagnostic markers. *J. Chromatogr. A* 2003, **1013**, 173–181.
- [26] Rossing, K., Mischak, H., Dakna, M., Zuerbig, P. et al., Urinary proteomics in diabetes and CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2008, **19**, 1283–1290.
- [27] Gwinner, W., Hinzmann, K., Erdbruegger, U., Scheffner, I. et al., Acute tubular injury in protocol biopsies of renal grafts: prevalence, associated factors and effect on long-term function. *Am. J. Transplant.* 2008, **8**, 1684–1693.
- [28] Gaggar, A., Jackson, P. L., Noerager, B. D., O'Reilly, P. J. et al., A novel proteolytic cascade generates an extracellular matrix-derived chemoattractant in chronic neutrophilic inflammation. *J. Immunol.* 2008, **180**, 5662–5669.
- [29] Khatwa, U. A., Kleibrink, B. E., Shapiro, S. D., Subramaniam, M., MMP-8 promotes polymorphonuclear cell migration through collagen barriers in obliterative bronchiolitis. *J. Leukoc. Biol.* 2010, **87**, 69–77.
- [30] Mengel, M., Gwinner, W., Schwarz, A., Bajeski, R. et al., Infiltrates in protocol biopsies from renal allografts. *Am. J. Transplant.* 2007, **7**, 356–365.
- [31] Chassin, C., Goujon, J. M., Darche, S., du Merle, L. et al., Renal collecting duct epithelial cells react to pyelonephritis-associated *Escherichia coli* by activating distinct TLR4-dependent and -independent inflammatory pathways. *J. Immunol.* 2006, **177**, 4773–4784.
- [32] Sadeghi, M., Daniel, V., Naujokat, C., Wiesel, M. et al., Strong inflammatory cytokine response in male and strong anti-inflammatory response in female kidney transplant recipients with urinary tract infection. *Transpl. Int.* 2005, **18**, 177–185.
- [33] Metzger, J., Kirsch, T., Schiffer, E., Ulger, P. et al., Diagnostic marker pattern of sequenced urinary peptides for early and accurate detection of acute kidney injury. *Kidney Int.* 2010, **78**, 1252–1262.
- [34] Mischak, H., Kolch, W., Aivaliotis, M., Bouyssié, D. et al., Comprehensive human urine standards for comparability and standardization in clinical proteome analysis. *Proteomics Clin. Appl.* 2010, **4**, 464–478.
- [35] Rossing, K., Mischak, H., Rossing, P., Schanstra, J. P. et al., The urinary proteome in diabetes and diabetes-associated complications: new ways to assess disease progression and evaluate therapy. *Proteomics Clin. Appl.* 2008, **2**, 997–1007.
- [36] Faveeuw, C., Preece, G., Ager, A., Transendothelial migration of lymphocytes across high endothelial venules into lymph nodes is affected by metalloproteinases. *Blood* 2001, **98**, 688–695.
- [37] Laplante, A., Liu, D., Demeule, M., Annabi, B. et al., Modulation of matrix gelatinases and metalloproteinase-activating process in acute kidney rejection. *Transpl. Int.* 2003, **16**, 262–269.
- [38] Ermolli, M., Schumacher, M., Lods, N., Hammond, M., Marti, H. P., Differential expression of MMP-2/MMP-9 and potential benefit of an MMP inhibitor in experimental acute kidney allograft rejection. *Transpl. Immunol.* 2003, **11**, 137–145.
- [39] Rödder, S., Scherer, A., Körner, M., Eisenberger, U. et al., Meta-analyses qualify metzincins and related genes as acute rejection markers in renal transplant patients. *Am. J. Transplant.* 2010, **10**, 286–297.
- [40] Magil, A. B., Monocytes/macrophages in renal allograft rejection. *Transplant. Rev. (Orlando)* 2009, **23**, 199–208.
- [41] Nickenleit, V., Andreoni, K., Inflammatory cells in renal allografts. *Front. Biosci.* 2008, **13**, 6202–6213.

# PROTEOMICS

Supporting Information  
for Proteomics – Clinical Applications  
DOI 10.1002/prca.201000153

Jochen Metzger, Christos Chatzikyrkou, Verena Broecker,  
Eric Schiffer, Lothar Jaensch, Alexander Iphoefer, Michael Mengel,  
William Mullen, Harald Mischak, Hermann Haller  
and Wilfried Gwinner

Diagnosis of subclinical and clinical acute  
T-cell-mediated rejection in renal transplant patients  
by urinary proteome analysis

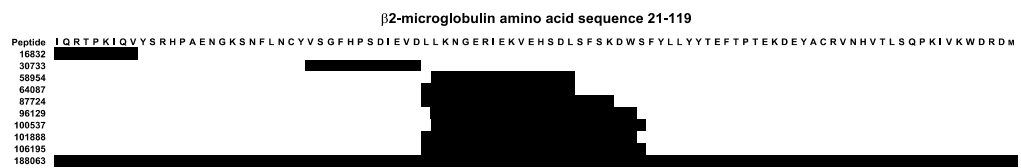
**Supplementary Table 1 : Analysis of potential confounders for the mass spectrometry diagnosis of acute allograft rejection**

| <b>Basic data</b>                         | <b>Allograft-related factors a the time of sampling</b> |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Recipient gender                          | Serum creatinine                                        |
| Recipient age at transplantation          | Volume of the graft                                     |
| Time on dialysis prior to transplantation | Resistance index                                        |
| Cause of endstage renal failure           | Renal graft artery stenosis                             |
| Donor's gender                            | Hydronephrosis of the allograft                         |
| Donor's age                               |                                                         |
| Donor type (deceased, living)             | <b>Concomitant findings in the biopsy</b>               |
| Additional pancreas transplantation       | Acute tubular injury                                    |
| Donor's serum creatinine                  | Isometric vacuolization of tubular epithelia            |
| Cold ischemia time                        | Tubulointerstitial calcification                        |
| Delayed graft function                    | Interstitial fibrosis and tubular atrophy               |
|                                           | Polyoma nephropathy                                     |
| <b>Immunological status</b>               |                                                         |
| HLA-mismatches at locus A, B and DR       | <b>Medications</b> (at the time of sampling)            |
| Preformed antibodies at transplantation   | Immunosuppressive maintenance therapy                   |
| Previous transplantations                 | Angiotensin converting enzyme inhibitors                |
| Blood transfusions before transplantation | Angiotensin receptor blockers                           |
| Pregnancies before transplantation        | Beta-blockers                                           |
| Induction therapy ( IL-2R abs or ATG)     | Calcium channel blockers                                |
| Initial immunosuppressive combination     | Peripheral alpha/beta-Blockers                          |
|                                           | Centrally acting antihypertensives                      |
| <b>Pre- or co-existing morbidities</b>    | Diuretics                                               |
| Arterial hypertension                     | Direct vasodilators                                     |
| Coronary artery disease                   | Aspirin                                                 |
| Heart failure                             | Ticlopidine                                             |
| Peripheral artery disease                 | Clopidogrel                                             |
| Diabetes mellitus                         | Heparin                                                 |
| Cigarette smoking                         | Insulin                                                 |
| Hypercholesterolemia                      | Alpha-glucosidase antagonists                           |
| Hyperparathyroidism                       | Sulfonylurea/glitazones/biguanides                      |
| CMV antigenemia                           | Allopurinol                                             |
| Hepatitis B                               | Benzbromarone                                           |
| Hepatitis C                               | Vitamin D analogs                                       |
| Urinary tract infections                  | Bisphosphonates                                         |
| Other bacterial infections                | Cotrimoxazole prophylaxis                               |
|                                           | Other antibacterial therapies                           |
|                                           | Ganciclovir/valganciclovir                              |

**Supplementary Table 2: Correlation of  $\beta$ 2-microglobulin derived urinary peptides to the absence/presence of acute tubular injury (ATI/noATI) in patients with and without rejection (Rej/noRej). AUC's for the differentiation between samples with and without ATI are higher than for the diagnosis of acute rejection.**

| Peptide-ID | noRej/ATI vs noRej/noATI     |                                      |      | Rej/ATI vs noRej/ATI         |                                      |      | Rej/ATI vs noRej/noATI       |                                      |      |
|------------|------------------------------|--------------------------------------|------|------------------------------|--------------------------------------|------|------------------------------|--------------------------------------|------|
|            | unadjusted Wilcoxon <i>P</i> | Benjamini Hochberg-adjusted <i>P</i> | AUC  | unadjusted Wilcoxon <i>P</i> | Benjamini Hochberg-adjusted <i>P</i> | AUC  | unadjusted Wilcoxon <i>P</i> | Benjamini Hochberg-adjusted <i>P</i> | AUC  |
| 16832      | 8,14E-03                     | 0,22                                 | 0,70 | 8,32E-01                     | 0,92                                 | 0,52 | 4,19E-03                     | 0,10                                 | 0,77 |
| 30733      | 8,94E-03                     | 0,24                                 | 0,67 | 2,99E-01                     | 0,57                                 | 0,59 | 3,60E-03                     | 0,10                                 | 0,77 |
| 58954      | 9,73E-01                     | 0,99                                 | 0,50 | 4,82E-01                     | 0,73                                 | 0,56 | 6,54E-02                     | 0,25                                 | 0,66 |
| 64087      | 5,07E-04                     | 0,14                                 | 0,74 | 8,71E-01                     | 0,95                                 | 0,52 | 1,47E-02                     | 0,15                                 | 0,70 |
| 87724      | 2,61E-02                     | 0,32                                 | 0,64 | 3,92E-01                     | 0,71                                 | 0,57 | 1,29E-02                     | 0,15                                 | 0,72 |
| 96129      | 1,30E-02                     | 0,26                                 | 0,67 | 4,26E-01                     | 0,68                                 | 0,57 | 1,14E-02                     | 0,14                                 | 0,68 |
| 100537     | 2,87E-03                     | 0,17                                 | 0,72 | 2,35E-01                     | 0,50                                 | 0,61 | 2,15E-04                     | 0,04                                 | 0,87 |
| 101888     | 5,97E-02                     | 0,43                                 | 0,62 | 4,90E-02                     | 0,25                                 | 0,67 | 2,32E-04                     | 0,03                                 | 0,84 |
| 106195     | 8,77E-03                     | 0,22                                 | 0,71 | 7,25E-02                     | 0,26                                 | 0,67 | 1,24E-04                     | 0,04                                 | 0,90 |
| 188063     | 2,83E-01                     | 0,63                                 | 0,59 | 1,11E-01                     | 0,36                                 | 0,64 | 1,86E-01                     | 0,43                                 | 0,64 |

**Supplementary Figure 1: Sequence alignment of CE-MS-detected urinary  $\beta$ 2-microglobulin peptides to the amino acid sequence of mature  $\beta$ 2-microglobulin.**



## **9. Danksagung**

Diese Arbeit wurde in der Klinik für Nieren- und Hochdruckerkrankungen der Medizinischen Hochschule Hannover unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Wilfried Gwinner angefertigt.

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. H. Haller für die Möglichkeit, in seiner Abteilung arbeiten und diese Dissertation anfertigen zu können. Herrn Prof. Dr. med. W. Gwinner danke ich für die Themenauswahl, die kontinuierliche Betreuung während der gesamten Arbeit, seine engagierte Unterstützung und die wertvollen Anregungen.

Herrn Dr. T. Myöhänen von der Universität Helsinki danke ich ganz herzlich für die Bereitstellung des gegen PREP gerichteten Antikörpers und des Färbeprotokolls.

Bei Herrn Prof. Dr. med. M. Schiffer und seinen Mitarbeitern, insbesondere Frau Dr. rer. nat. I. Schäfer und Frau S. Zachura, möchte ich mich für ihre hilfreiche Unterstützung in der Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. F. Güler für die konstruktive Kritik, ihr stetes Interesse an meiner Arbeit und den geduldigen Unterricht in der Auswertung der Immunfluoreszenzen.

Besonders möchte ich meinen Eltern danken, die mich vorbehaltlos unterstützt und diese Arbeit überhaupt ermöglicht haben.

## **11. Erklärung nach §2 Abs. 2 Nr.6 und 7 PromO**

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte  
Dissertation mit dem Titel

„Diagnose der subklinischen und klinischen akuten T-Zell vermittelten Rejektion bei  
Nierentransplantatempfängern mittels Proteomanalyse des Urins“

in der Klinik für Nieren- und Hochdruckerkrankungen der Medizinischen Hochschule  
Hannover unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. W. Gwinner ohne sonstige Hilfe  
durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten  
Hilfsmittel benutzt habe.

Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsverfahren ist mir nicht kommerziell vermittelt  
worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt  
Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir  
obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise  
erledigt.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur  
Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch  
nicht erworben habe.

Ergebnisse der Dissertation wurden in „Proteomics Clinical Applications“ veröffentlicht.

Hannover, den 26.10.2014

(Unterschrift)