Aus Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin
der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. J. Dötsch

Zur Charakterisierung diagnostischer Möglichkeiten nach Nierentransplantation im Kindesalter: Eine Pilotstudie zur Untersuchung von *small urinary extracellular vesicles* (suEVs) mittels Proteomanalyse

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Melda Kural
aus Köln

promoviert am 07. September 2026

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

Druckjahr 2026

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. M. Liebau
2. Gutachterin: Professorin Dr. rer. nat. M. Odenthal

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Herr Prof. Dr. Max C. Liebau
Herr Prof. Dr. Roman-Ulrich Müller
Frau Dr. rer. nat. Katrin Bohl
Proteomics Facility des CECAD Cologne

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin oder eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Sammlung der pädiatrischen Urinproben wurde in der kindernephrologischen Ambulanz der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Uniklinik Köln durchgeführt. Die Probensammlung und klinische Datenerhebung erfolgte durch mich unter Aufsicht von Herrn Prof. Dr. Max C. Liebau.

Das in dieser Arbeit angegebene (Ultra-)Zentrifugationsprotokoll zur Isolation der extrazellulären Vesikel ist nach entsprechender Anleitung durch Herrn Prof. Dr. Max C. Liebau und Herrn Prof. Dr. Roman-Ulrich Müller von mir selbst ausgeführt worden. Das grundlegende Protokoll zur Probenaufarbeitung im Labor wurde mir seitens der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Roman-Ulrich Müller aus unserem Labor zur Verfügung gestellt. Bei der Anpassung des Isolationsprotokolls an die Anforderungen unserer Pilotstudie habe ich Unterstützung von Herrn Prof. Dr. Max C. Liebau erhalten.

Die massenspektrometrischen Messungen der pädiatrischen Proben wurden ohne meine Mitarbeit durch die Proteomics Facility des Kölner Exzellenzclusters CECAD erhoben.

Die Sammlung, Bearbeitung und Messung der Urinproben der Kontrollproband*innen aus der Klinik II für Innere Medizin der Uniklinik Köln wurde durch die Mitarbeiter*innen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Roman-Ulrich Müller ohne meine Mitarbeit durchgeführt. Die Daten über die massenspektrometrischen Messungen sowie klinische Charakteristika wurden mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die bioinformatische Datenanalyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Katrin Bohl. Die Interpretation und Auswertung der Ergebnisse erfolgte gemeinsam durch Herrn Prof. Dr. Max C. Liebau und mich.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 07.12.2025

Unterschrift:

Danksagung

Zuallererst gilt mein größter Dank meiner Schwester Merve und meinen Eltern, die mich auf meinem Weg durch das Medizinstudium und durch meine Forschungsarbeit stets mit Geduld und liebevoller Begleitung unterstützt haben. Ebenso möchte ich meinen Großeltern und meinem Onkel danken.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Max C. Liebau für die nun bereits langjährige Unterstützung. Seine fachliche und forscherische Kompetenz hat einen entscheidenden Beitrag zu meiner klinischen und wissenschaftlichen Entwicklung geleistet und meine Begeisterung für die klinische und experimentelle Forschung geweckt.

Zudem möchte ich mich bei Prof. Dr. Roman-Ulrich Müller für die Unterstützung bei der Planung des Projektes bedanken. Ich danke Frau Dr. Katrin Bohl, die maßgeblich zu der bioinformatischen Analyse meiner Daten beigetragen hat.

Außerdem bedanke ich mich bei dem ärztlichen und pflegerischen Personal der kindernephrologischen Ambulanz, die mich bei der Auswahl der Probanden und der Probensammlung unterstützt haben. Insbesondere gilt mein Dank hier PD Dr. Stefan Kohl, Prof. Dr. med. habil. Kathrin Burgmaier und Frau Sophie Haumann.

Ebenfalls möchte ich allen Mitarbeitenden des Nephrolabs Köln und insbesondere der Leitung Herrn Prof. Dr. Bernhard Schermer danken.

Abschließend möchte ich mich bei den Probandinnen und Probanden unserer Studie sowie ihren Angehörigen bedanken, welche durch ihre Teilnahme die Durchführung unserer Forschungsarbeit ermöglicht haben.

Für Mama.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 10

1 ZUSAMMENFASSUNG 13

2 EINLEITUNG 15

2.1 Chronische Nierenerkrankung im Kindesalter 16
2.1.1 Ätiologie der chronischen Nierenerkrankung im Kindesalter 17
2.1.2 Stadieneinteilung der chronischen Nierenerkrankung nach KDIGO 2012 17

2.2 Nierenersatztherapien im Kindesalter 18

2.3 Nierentransplantationen im Kindesalter 20
2.3.1 Lebendnierenspende vs. Verstorbenenspende 20
2.3.2 Immunologische Voraussetzungen für eine Nierentransplantation 21
2.3.3 Nachsorge und Immunsuppression nach einer Nierentransplantation 21
2.3.4 Outcome nach einer Nierentransplantation 22
2.3.5 Ursachen für eine verschlechterte Nierentransplantatfunktion und für ein Transplantatversagen 22

2.4 Proteomics 24

2.5 Extrazelluläre Vesikel 24
2.5.1 MISEV2018-Guidelines der International Society of Extracellular Vesicles 25
2.5.2 Small urinary extracellular Vesicles (suEVs) 26

2.6 Ziel der Arbeit 27

3 MATERIAL UND METHODEN 28

3.1 Zusammenfassung des Studienablaufs 28

3.2 Auswahl der pädiatrischen Patient*innen 29
3.2.1 Vereinfachte Gruppierung der kindlichen Grunderkrankungen 30
3.2.2 Pseudonymisierung der pädiatrischen Proben 30

3.3 Auswahl der erwachsenen Kontrollproband*innen 30
3.3.1 Pseudonymisierung der adulten Kontrollproben 30
3.3.2 Subgruppeneinteilung der Kontrollproband*innen 31
3.3.3 Vereinfachte Gruppierung der adulten Grunderkrankungen 31

3.4 Ausschlusskriterien für bereits gemessene Proben 31

3.5 Nierentransplantatfunktion anhand der laborchemischen Parameter 31
3.5.1 eGFR nach CKD-EPI 31
3.5.2 eGFR nach FAS 32

3.6 Arbeitsprogramm im Labor 32
3.6.1 Urinsammlung und Vorbehandlung des Urins 33
3.6.2 Trennung der small urinary extracellular vesicles (suEVs) 33
3.6.3 Proteomanalysen 34

3.7 Bioinformatische Analyse und Interpretation der Daten 35
3.7.1 Differentielle Proteomanalysen 36

4 ERGEBNISSE 40

4.1 Klinische Merkmale der untersuchten Kohorte 40
4.1.1 Klinische Charakteristika der pädiatrischen Proband*innen (KNTx) 40
4.1.2 Klinische Charakteristika der adulten Kontrollproband*innen (NTx) 41

4.2 Divergente Proteinexpressionsprofile in Urinproben nierentransplantierter Kinder gegenüber nierentransplantierten Erwachsenen 43
4.2.1 Vergleich der Urinproteinprofile nierentransplantierter Kinder mit denen nierentransplantierter Erwachsener 43
4.2.2 Differentielle Proteinexpressionsmuster in Urinproben nierentransplantierter Kinder versus nierentransplantierter Erwachsener 43

4.3 Funktionelle und prozessbezogene Zusammenhänge von Proteinen mit unterschiedlichen Expressionsmustern in Urinproben nierentransplantierter Kinder versus nierentransplantierter Erwachsener 44

4.4 Vergleich der Proteinexpressionsprofile von KNTx versus NTx mittels hierarchischer Clusteranalyse 44

4.5 PCA aller pädiatrischen versus adulten Urinproben (KNTx vs. NTx) 47
4.5.1 Pearson-Korrelationsanalyse der eGFR mit den ersten beiden Hauptkomponenten PC1 und PC2 48

4.6 Analyse der differentiell exprimierten Proteine in den pädiatrischen versus adulten Urinproben (KNTx vs. NTx) 50
4.6.1 Enrichment-Analysen auf Basis von KEGG und GO für KNTx vs. NTx 51
4.6.2 GO-Enrichment aller vermindert bzw. vermehrt exprimierten Proteine in KNTx versus NTx 54

4.7 Sub-PCAs der Kinder- versus Erwachsenenproben 56

4.8 Analyse der differentiell exprimierten Proteine in KNTx vs. NTx <1 Monat post-OP 57

4.8.1 Enrichment-Analysen auf Basis von KEGG und GO für KNTx vs. NTx <1 Monat post-OP 59

4.9 Analyse der differentiell exprimierten Proteine in KNTx vs. NTx >1 Jahr post-OP 60

4.10 Korrelationsanalysen aller gemessenen Proteine der pädiatrischen Urinproben (KNTx) mit dem Abstand zur Tx, dem Alter und der eGFR 61

4.10.1 Korrelationsanalysen der Proteinintensitäten von KNTx vs. Abstand zur Transplantation 62

4.10.2 Korrelationsanalysen der Proteinintensitäten von KNTx vs. Alter der Proband*innen 64

4.10.3 Korrelationsanalysen der Proteinintensitäten von KNTx vs. eGFR 68

4.11 Untersuchung von Protein-Matches im Vergleich differentiell exprimierter Proteine (KNTx vs. NTx) und Korrelationen der Proteinexpression pädiatrischer Urinproben mit klinischen Variablen 71

4.11.1 Identifikation von Protein-Matches zwischen dem Gesamtgruppenvergleich (KNTx vs. NTx) und altersabhängigen Korrelationen in der pädiatrischen Kohorte (KNT vs. Alter) 71

4.11.2 Identifikation von Protein-Matches zwischen dem Gesamtgruppenvergleich (KNTx vs. NTx) und eGFR-abhängigen Korrelationen in der pädiatrischen Kohorte (KNTx vs. eGFR) 72

4.12 Untersuchung von Protein-Matches zwischen den signifikant unterschiedlich exprimierten Proteinen der Gesamtgruppenanalyse (KNTx vs. NTx) und der Subgruppenanalyse (KNTx vs. NTx <1 Monat) 73

5 DISKUSSION 75

5.1 Stellenwert von urinary extracellular vesicles in der Forschung 75

5.1.1 PCK2 als potenzieller Biomarker im adulten Patientenkollektiv 75

5.2 Identifizierte Proteine 77

5.2.1 Es zeigen sich Unterschiede in der Proteinexpressionen pädiatrischer und adulter Urinproben 77

5.2.2 Assoziation der Proteinexpression mit der eGFR 77

5.3 Unterschiede der Proteinexpressionsmuster zwischen KNTx und NTx 78
5.3.1 Im Rahmen der Subgruppenanalyse zeigen sich große Unterschiede bezogen auf die Proteinexpressionsmuster 79

5.4 Enrichment-Analysen zeigen vielfältige biologische Funktionen in den signifikant angereicherten Gene-Sets auf 79
5.4.1 GO-Enrichment 79
5.4.2 KEGG-Enrichment 84
5.4.3 Enrichment-Analysen von KNTx vs. NTx <1 Monat post-OP 85

5.5 Korrelationsanalysen der Proteinintensitäten von KNTx 87
5.5.1 KNTx vs. Abstand zur Transplantation 87
5.5.2 KNTx vs. Alter 89
5.5.3 KNTx vs. eGFR 92

5.6 Protein-Matches zeigen mögliche Relevanz der identifizierten Proteine auf 95
5.6.1 COPA als Protein-Match im Vergleich zwischen signifikant unterschiedlich exprimierten Proteinen (KNTx vs. NTx) und den signifikanten Korrelationen mit dem Alter 95
5.6.2 ST6GAL1 als Protein-Match im Vergleich zwischen differentiell exprimierten Proteinen (KNTx vs. NTx) und den signifikanten Korrelationen mit der eGFR 96
5.6.3 Im Gesamt- vs. Subgruppenvergleich (KNTx vs. NTx <1 Monat) zeigen sich Protein-Matches bezogen auf Zellstruktur, Proteinbiosynthese, Zytoskelett und oxidativen Stress 96

5.7 Limitationen unserer Arbeit 99

5.8 Zusammenfassung und Ausblick 101

6 LITERATURVERZEICHNIS 102

7 ANHANG 109

7.1 Abbildungsverzeichnis 109

7.2 Tabellenverzeichnis 110

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
adj.P.Val	adjustierter p-Wert
ADPKD	Autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung
AGC	Automatic gain control, automatische Verstärkungsregelung
AQP	Aquaporin
ARPKD	Autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung
ATP	Adenosintriphosphat
BgRatio	Background ratio
BP	biological process, biologischer Prozess
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
CAKUT	Congenital anomalies of the kindneys and the urinary tract
CC	cellular component, zelluläre Komponente
CD-Zellen	Cluster of differentiation-Zellen
CKD	Chronic kidney disease, chronische Nierenerkrankung
CKD-EPI	Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
cm	Zentimeter
COPA	Coatomer subunit alpha
DD	Verstorbenenspende, deceased donor
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure, deoxyribonucleic acid
eGFR	estimated glomerular filtration rate
EVs	Extracellular vesicles
FA	fatty acids, Fettsäuren
FAS-Formel	Full Age Spectrum-Formel
FC	Fold Change, Faltungsraten
FDR	false discovery rate
FLNA	Filamin-A
FSGS	Fokal-segmentale Glomerulosklerose
G	G-Zahl, Beschleunigungsgröße der Zentrifuge
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
ggf.	gegebenenfalls
GO	Gene Ontology
GSEA	Gen-Set-Anreicherungsanalyse, Gene Set Enrichment Analysis
GSS	Glutathione synthetase

GTK1	Glutathione S-Transferase Kappa 1
HLA	Humane Leukozytenantigene
HNMT	Histamin-N-Methyltransferase
i.d.R.	in der Regel
ID	Identifikation
IgA	Immunglobulin A
IQR	Interquartilsabstand
ISEV	International Society for Extracellular Vesicles
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
kg	Kilogramm
KNTx	Kinderklinik-Nierentransplantation
LC	Liquid Chromatography
LD	Lebendspende, Living Donor
logFC	logarithmischer Fold-Change
M	Molar
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
m^2	Quadratmeter
MF	molecular function, molekulare Funktionen
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMF	Mycophenolat-Mofetil
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure, messenger ribonucleic acid
MS	Massenspektrometrie, mass spectrometry
MS1	Erste Stufe der Massenspektrometrie
MS2	Zweite Stufe der Massenspektrometrie
mTOR	Mammalian target of rapamycin
n	Anzahl
NTx	Nierentransplantation
p-Wert	probability value, Signifikanzwert
PC1	principal component 1, erste Hauptkomponente
PC2	principal component 2, zweite Hauptkomponente
PCA	Principal Component Analysis
PCK2	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2
RCC	Nierenzellkarzinom, renal cell carcinoma

RKD	Rare Kidney Disease, Seltene Nierenerkrankungen
RNA	Ribonukleinsäure, ribonucleic acid
SAM	significance analysis of microarray
SD	standard deviation, Standardabweichung
SEPT	Septin
ST6GAL1	Beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase
suEVs	small urinary extracellular vesicles
Tx	Transplantation
TYMP	Thymidine phosphorylase
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter

1 Zusammenfassung

Extrazelluläre Vesikel spielen nach aktuellem Kenntnisstand eine wichtige Rolle in der Zellkommunikation und beinhalten zellspezifische Bestandteile in Form von Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren. Diagnostisch können sie somit eine wertvolle Quelle für neue und gezielte Biomarker in der Nierenfunktionsdiagnostik sein. Die Untersuchung von *small urinary extracellular vesicles* (suEVs) und dem darin enthaltenen Proteom wurde bisher weitestgehend auf wissenschaftlicher Basis und hierbei vor allem bei erwachsenen Proband*innen untersucht. Es gibt bislang nur wenige Daten über das Proteom aus extrazellulären Vesikeln nierentransplantierter Kinder und Jugendlicher.

In Rahmen dieser Pilotstudie wurde untersucht, ob sich im Proteom von suEVs aus pädiatrischen Urinproben signifikant veränderte Proteinexpressionen identifizieren lassen, die in Zukunft eine Rolle als nicht-invasive Biomarker in der Nierenfunktionsdiagnostik transplantierter pädiatrischer Patient*innen einnehmen könnten. Langfristig soll unsere Arbeit eine Grundlage für die Entwicklung neuer diagnostischer Verfahren schaffen, die den Einsatz invasiver Methoden wie Nierenbiopsien möglicherweise ersetzen könnten.

Eingeschlossen in unsere Studie wurden für diese Fragestellung 14 nierentransplantierte, pädiatrische Proband*innen. Als Kontrollen dienten uns Daten von 8 nierentransplantierten Erwachsenen. Wir wendeten ein (Ultra-)Zentrifugationsprotokoll zur Isolation von suEVs aus pädiatrischen Urinproben an, um diese im Anschluss massenspektrometrisch zu messen. Im Zuge unserer Analysen konnten wir nach Filterung unserer massenspektrometrisch erhobenen Daten 2291 Proteine identifizieren; davon wurden 1869 Proteine in mindestens 50% aller pädiatrischen Proben nachgewiesen. Um die Daten über das Proteom der suEVs angemessen interpretieren sowie Unterschiede in der Proteinexpression zwischen den Proband*innen und Kontrollen identifizieren zu können, wurden diese anschließend bioinformatisch analysiert und ausgewertet.

Zwischen pädiatrischen (KNTx) und adulten Nierentransplantatempfängern (NTx) konnten deutliche Unterschiede in der Proteinexpression festgestellt werden. Darüber hinaus zeigten sich in den pädiatrischen Proben verschiedene Proteine, deren Expression signifikant mit dem Alter, dem zeitlichen Abstand zur Transplantation sowie der geschätzten glomerulären Filtrationsrate (eGFR) korrelierte. Zur funktionellen Interpretation der Proteomdaten erfolgten außerdem *Gene Set Enrichment Analysen* (GSEA) mittels *Gene Ontology* (GO) und der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG).

Um besser beurteilen zu können, ob die in der differentiellen Analyse zwischen KNTx vs. NTx identifizierten signifikant exprimierten Proteine auch eine klinische Relevanz haben könnten, wurden diese mit den Proteinen verglichen, die in den Korrelationsanalysen signifikant mit den klinischen Variablen der Proband*innen aus der KNTx-Gruppe assoziiert waren. Bezogen auf das Alter sowie die eGFR konnte jeweils ein übereinstimmendes Protein

identifiziert werden: *Coatomer subunit alpha* als Teil des Coatomer-Komplexes, der an der Bildung von vesikulären Transportvesikeln beteiligt ist, sowie *Beta-galactoside alpha-2,6sialyltransferase*, ein Enzym mit zentraler Rolle bei der Proteinglykolysierung. Darüber hinaus zeigten sich auch Protein-Matches in der Gesamtanalyse (KNTx vs. NTx) im Vergleich zur Subgruppenanalyse (KNTx vs. NTx <1 Monat), wobei acht Proteine in beiden Analysen eine signifikante, gleichgerichtete Expression aufweisen.

Die identifizierten Proteine könnten wertvolle Hinweise auf biologische Prozesse liefern, die mit renalen Veränderungen nach einer Nierentransplantation assoziiert sind. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten können zudem als Grundlage für weiterführende Forschungsprojekte zu *small urinary extracellular vesicles* im Urin nierentransplantierter Kinder dienen.

2 Einleitung

Eine chronische Nierenerkrankung im Kindesalter liegt im Unterschied zum Erwachsenenalter eher selten vor. Der Behandlung einer chronischen Nierenerkrankung kommt aber aufgrund der möglicherweise schwerwiegenden Einflüsse auf die gesundheitliche, physische und geistige Entwicklung der betroffenen Kinder eine große Bedeutung zu. Im Unterschied zu den häufigsten Ursachen für chronische Nierenerkrankungen im Erwachsenenalter, welche zumeist assoziiert sind mit kardiovaskulären Volkskrankheiten wie Diabetes mellitus oder Bluthochdruck, ist eine chronische Nierenerkrankung im Kindesalter meist kongenital oder genetisch bedingt.[1] Nierenerkrankungen im Kindesalter präsentieren sich häufig im Rahmen von seltenen Erkrankungen und mit unspezifischen Symptomen,[2] wodurch es zu einer verzögerten Diagnosestellung kommen kann, was aufgrund der möglichen Komplikationen der Nierenerkrankung zu einer verschlechterten Prognose bzw. Mortalität führen kann.[3] Hier spielen insbesondere auch kardiovaskuläre Begleiterkrankungen und Auswirkungen auf das kindliche Wachstum, welche mit chronischen Nierenerkrankungen im Kindesalter assoziiert sind, eine Rolle. Therapieansätze einer chronischen Nierenerkrankung im Kindesalter sind meist symptomatisch. Als Nierenersatzverfahren kommen die Hämo- oder Peritonealdialyse oder die Nierentransplantation als Lebend- oder Verstorbenenspende zum Einsatz. Insgesamt muss hierbei beachtet werden, dass mittels Dialyseverfahren zwar eine zeitliche Überbrückung erreicht werden kann, diese aber in ihrer Funktion niemals als gleichwertig zu der normalen Nierenfunktion angesehen werden kann. Zudem ist das kardiovaskuläre Mortalitätsrisiko bei Patient*innen, die eine Dialysetherapie erhalten, deutlich erhöht.[3] Darüber hinaus stellt die Dialysetherapie einen schwerwiegenden Einschnitt in das Leben der betroffenen Patient*innen dar, welcher mit zum Teil großen Veränderungen und Herausforderungen im Alltag einhergehen kann. Dies kann insbesondere bei pädiatrischen Patient*innen ein Problem darstellen und mit Einschränkungen zum Beispiel im Schulalltag und Sozialleben einhergehen. Aus diesen vielfältigen Gründen wird insbesondere bei pädiatrischen Patient*innen mit chronischer Nierenerkrankung eine zeitnahe Behandlung mit einer Nierentransplantation angestrebt, sofern dies auch hinsichtlich Alter, Körpergewicht und weiteren Faktoren möglich und sinnvoll erscheint. Die Transplantation ist nicht nur mit einer besseren Lebensqualität so wie Lebenserwartung assoziiert, sondern führt zudem zu einer deutlich verbesserten geistigen und körperlichen Entwicklung für die Kinder.[4] Daher wird teilweise eine sogenannte präemptive Nierentransplantation noch vor der Einleitung einer Dialysepflichtigkeit angestrebt. Dies ist vor allem durch die vermehrte Etablierung der Lebendspende, welche vornehmlich durch nahe Verwandte der Patient*innen erfolgt, möglich geworden.[5]

Somit zeigt sich, dass die Nierentransplantation in der Behandlung von kindernephrologischen Patient*innen eine wichtige Rolle für die Langzeitprognose, die

Entwicklung auf geistiger und körperlicher Ebene, die Lebensqualität und das Gesamtüberleben spielt. Dies bedeutet, dass ein sicherer Umgang mit nierentransplantierten Patient*innen im klinischen Alltag von großer Wichtigkeit zeugt.

Hierbei stellt die Möglichkeit einer Abstoßungsreaktion als eine der wichtigsten Komplikationen nach erfolgter Nierentransplantation einen häufigen Grund zur ärztlichen Konsultation auch noch Jahre nach erfolgter Transplantation dar. Neben der Gesamtbeurteilung verschiedener klinischer und laborchemischer Befunde, um die Wahrscheinlichkeit auf das Vorliegen einer Transplantatabstoßung abschätzen zu können, stellt die bioptische Sicherung und die anschließende histologische Begutachtung zum aktuellen Zeitpunkt die einzige Untersuchung dar, um eine Abstoßung sicher nachzuweisen bzw. auszuschließen.[6,7] Die Durchführung der Nierenbiopsie selbst geht aufgrund ihrer Invasivität mit Risiken und möglichen Komplikationen einher,[8] zudem muss bei pädiatrischen Patient*innen mit einer erschwerten und aufwändigeren Durchführbarkeit gerechnet werden.

Zusammengefasst stellt die Nierenbiopsie somit eine aufwändige und invasive Prozedur dar, welche jedoch bei bestehendem Verdacht auf eine Transplantatabstoßung unabdingbar ist. Es stellt sich somit die Frage, ob nicht weitere, nicht-invasive Möglichkeiten bestehen, um eine Transplantatabstoßung sicher auszuschließen, oder zumindest, um die Wahrscheinlichkeit einer solchen etwas näher zu bestimmen. Hierfür scheint die Erforschung von Urinexosomen, oder in dieser Arbeit synonym verwendet auch *small urinary extracellular vesicles* (suEV), einer Form von extrazellulären Vesikeln, als diagnostisches Mittel bei nierentransplantierten Patient*innen interessant. Extrazelluläre Vesikel spielen nach aktuellem Kenntnisstand eine wichtige Rolle in der Kommunikation zwischen Zellen und beinhalten verschiedene zellspezifische Bestandteile in Form von Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren, die Hinweise bezüglich biologischer Prozesse und der Pathophysiologie von Nierenzellen geben können. Diagnostisch können sie somit eine wertvolle Quelle für neue und gezieltere Biomarker in der Nierenfunktionsdiagnostik sein.[9,10]

2.1 Chronische Nierenerkrankung im Kindesalter

Das Nierenversagen im Kindesalter ist mit nur rund 100-200 betroffenen Kindern in Deutschland pro Jahr eine seltene klinische Herausforderung.[2] Eine frühe Diagnosestellung, der Umgang mit der Erkrankung sowie das weitere therapeutische Prozedere sind bei einer chronischen Nierenerkrankung von großer Wichtigkeit, da sie einen großen Einfluss auf die weitere kindliche Entwicklung auf körperlicher und geistiger Ebene[4] sowie auf die kardiovaskuläre Mortalität[3] bzw. auf das Gesamtüberleben haben.

Durch die vielfältigen Funktionen der Niere für den menschlichen Metabolismus können die Auswirkungen der renalen Minderfunktion jedoch gravierende Folgen für den

kindlichen Körper haben. Zu den dringend zu vermeidenden Sekundärmorbiditäten gehören an dieser Stelle vor allem die renale Osteopathie sowie der renale Kleinwuchs. Weiterhin kann es zur Entwicklung einer renalen Anämie oder auch einer metabolischen Azidose kommen, die ebenfalls langfristig zu einer Wachstumsverzögerung der Kinder beitragen können.[2]

Die kardiovaskuläre Mortalität niereninsuffizienter Kinder zeigt sich im Langzeitverlauf insgesamt deutlich erhöht. Durch eine eventuelle prolongierte Dialysetherapie der betroffenen Kinder im Falle einer terminalen Nierenerkrankung steigt das Risiko für kardiale und vaskuläre Ereignisse im Kindesalter zusätzlich erheblich an.[3]

2.1.1 Ätiologie der chronischen Nierenerkrankung im Kindesalter

Die Ursachen einer chronischen Nierenerkrankung im Kindesalter unterscheiden sich maßgeblich von denen der Erwachsenen. Während eine chronische Nierenerkrankung Erwachsener in Industriestaaten in den meisten Fällen durch Diabetes Mellitus, arterielle Hypertonie und die autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) versursacht wird, liegen den kindlichen Nierenerkrankungen zumeist kongenitale und genetische Ursachen zugrunde.[1]

Die wichtigsten Ursachen für eine kindliche chronische bzw. terminale Nierenerkrankung sind hierbei vorangehend Erkrankungen des CAKUT-Formenkreises (engl. *congenital anomalies of the kindneys and the urinary tract*), dem vor allem renale Aplasien, Hypoplasien und Dysplasien, sowie obstruktive Uropathien und Refluxnephropathien zugehörig sind. Weiterhin sind erworbene glomeruläre Erkrankungen wie die primäre fokal-segmentale Glomerulosklerose (FSGS) und die Lupus-Nephritis,[1] sowie genetische Nierenerkrankungen wie die autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD) von großer Relevanz. Eine neuere Gruppe von Patient*innen mit einer terminalen Nierenerkrankung und der Indikation zur Nierentransplantation bilden darüber hinaus Kinder, die bereits in der Vergangenheit eine oder mehrere Nierentransplantation erhalten haben und nun eine Re-Transplantation benötigen.[11]

Die klinischen Verläufe unterscheiden sich teilweise abhängig von der Ursache der Nierenerkrankung, es zeigen sich allerdings auch Gemeinsamkeiten als Folge einer eingeschränkten glomerulären Filtrationsrate.

2.1.2 Stadieneinteilung der chronischen Nierenerkrankung nach KDIGO 2012

Die chronische Nierenerkrankung kann gemäß der KDIGO 2012-Kriterien (*Kidney Disease: Improving Global Outcomes*) in fünf Stadien eingeteilt werden, wobei das Nierenversagen (G5) hierbei den Endpunkt darstellt. Eine Tabelle zur genauen Einteilung der *chronic kidney disease* (CKD)-Stadien nach den KDIGO 2012-Kriterien ist in Abbildung 1 dargestellt.[12]

Ein Stadium der Nierenfunktionseinschränkung mit der Notwendigkeit eines permanenten Nierenersatzverfahrens erreicht man in der Regel im Stadium G5, in dem die Kapazitäten der Niere zur Filtration und Rückresorption weitestgehend ausgeschöpft sind. Erhebliche Probleme können zu diesem Zeitpunkt eine Akkumulation des Kaliums mit einem stark erhöhten Risiko für Herz-Rhythmus-Störungen, sowie der massive Anstieg des Harnstoffs, der unter anderem zu einer urämischen Enzephalopathie mit Erbrechen und Somnolenz, sowie einer urämischen Perikarditis führen kann, bereiten.[13,14]

Prognosis of CKD by GFR and albuminuria category

Prognosis of CKD by GFR and Albuminuria Categories: KDIGO 2012				Persistent albuminuria categories Description and range		
				A1	A2	A3
				Normal to mildly increased	Moderately increased	Severely increased
				<30 mg/g <3 mg/mmol	30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	>300 mg/g >30 mg/mmol
GFR categories (ml/min/ 1.73 m²) Description and range	G1	Normal or high	≥90			
	G2	Mildly decreased	60-89			
	G3a	Mildly to moderately decreased	45-59			
	G3b	Moderately to severely decreased	30-44			
	G4	Severely decreased	15-29			
	G5	Kidney failure	<15			

Green: low risk (if no other markers of kidney disease, no CKD); Yellow: moderately increased risk; Orange: high risk; Red, very high risk.

Abbildung 1: CKD-Stadien nach den KDIGO 2012-Kriterien[12]

Eine schriftliche Erlaubnis zur Verwendung der Abbildung wurde von KDIGO eingeholt. Die Verwendung erfolgt für rein wissenschaftliche Zwecke im Rahmen dieser Dissertation.

2.2 Nierenersatztherapien im Kindesalter

Die Indikation zur Einleitung einer Dialysetherapie ist nicht punktgenau definiert, laut aktuellem Dialysestandard der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie (DGfN) wird eine Dialyseeinleitung bei einer GFR von unter 15 ml/min/1,73 m² und Symptomen einer Urämie befürwortet. Auch wird eine Dialyseeinleitung empfohlen, wenn Komplikationen vorliegen, welche nicht bzw. nicht mehr medikamentös kontrollierbar sind, wie z.B. die Hyperkaliämie, die Hypervolämie, die Hypertension so wie die Azidose.[15] Zur adäquaten Vorbereitung sollte allerdings bereits ab einer GFR von weniger als 30 ml/min/1,73 m² eine Aufklärung der Patient*innen bzw. ihrer Eltern über die Möglichkeiten von Nierenersatztherapien erfolgen.[16]

Die gängigen Nierenersatzverfahren bei einer Dialysepflichtigkeit sind hierbei die Hämodialyse und die Peritonealdialyse. Zudem besteht die Möglichkeit einer Nierentransplantation.[15]

Die Hämodialyse wird in der Regel in speziellen Dialysezentren durchgeführt und folgt meist einem Schema, bei dem bei Erwachsenen i.d.R. drei Mal pro Woche für jeweils ca. fünf Stunden mithilfe einer externen Hämodialysemaschine[17] über einen arteriovenösen Shunt am Arm oder einen zentralen Dialysekatheter (Shaldonkatheter oder Demerskatheter) dialysiert wird.[15] Unter anderem aufgrund der guten Planbarkeit wird dieses Verfahren im Kindes- und Jugendalter vor allem bei älteren Kindern und Jugendlichen bevorzugt.

Im Rahmen der Peritonealdialyse hingegen wird eine sterile Lösung als Dialysierflüssigkeit in die Bauchhöhle[18] mithilfe eines abdominellen Dialysekatheters, des Tenckhoff-Katheters, zugeführt.[19] Die Peritonealdialyse ist insgesamt ein zeitlich flexibleres Nierenersatzverfahren. Aufgrund des kardiovaskulär schonenderen Verfahrens und der Flexibilität für die Eltern wird die Peritonealdialyse vor allem bei Säuglingen und Kleinkindern angewendet.

Einen maßgeblich limitierenden Faktor für die langfristige Dialysetherapie im Kindesalter stellt eine erhöhte Mortalität der Patient*innen durch kardiovaskuläre Ereignisse dar, die insgesamt um 30-fach höher ist als die von gleichaltrigen Kindern ohne eine terminale Nierenerkrankung bzw. ohne eine Dialysepflichtigkeit.[20] Darüber hinaus bedeutet ein chronisches Nierenersatzverfahren einen Einschnitt im kindlichen Leben, da es eine uneingeschränkte Teilnahme am Alltag der Patient*innen erschwert und mit psychischen Belastungen einhergehen kann.[21]

Obwohl die Peritonealdialyse und die Hämodialyse eine gute überbrückende Therapieoption darstellen, ist dennoch zu beachten, dass sie in keinem Falle mit der Funktion einer gesunden Niere gleichzustellen sind. Als favorisierte Nierenersatztherapie im Kindesalter gilt daher die frühzeitige Nierentransplantation, die mit der besten Lebenserwartung und -qualität einhergeht, sowie mit einer deutlich verbesserten geistigen und körperlichen Entwicklung für die Kinder verbunden ist.[4,21] Vorzugsweise wird die Nierentransplantation im Kindesalter deshalb bei Möglichkeit bereits vor Erreichen einer terminalen Nierenerkrankung durchgeführt, um möglichen Komplikationen der langfristigen Nierenersatztherapie entgegenzuwirken.[5]

Die Hauptvoraussetzung für die Durchführung einer Nierentransplantation selbst ist bei den Kindern in der Regel ein Mindestgewicht von 8-10 Kilogramm;[5] aus diesem Grund ist die Dialyse das einzige Nierenersatzverfahren im Neugeborenen- und Säuglingsalter und Nierenerkrankungen, die in dieser Patient*innengruppe auftreten, sind insgesamt mit einer stark erhöhten Mortalität vergesellschaftet.[11]

2.3 Nierentransplantationen im Kindesalter

Aktuell werden in den Kinder-Transplantationszentren in Deutschland pro Jahr rund 100-120 Nierentransplantationen bei Kindern- und Jugendlichen mit Nierenerkrankungen durchgeführt, was ungefähr 5% der jährlichen Nierentransplantationen in ganz Deutschland entspricht. Dabei handelt es sich bei ungefähr einem Drittel der Nierentransplantationen um Nieren-Lebendspenden durch nahe Angehörige der Kinder, in den meisten Fällen der Eltern, und bei rund 16% der Transplantationen erfolgt die Nierentransplantation präemptiv, das heißt die Transplantation des Organs wird noch vor dem Einsatz eines Dialyseverfahrens als Nierenersatztherapie durchgeführt.[5]

2.3.1 Lebendnierenspende vs. Verstorbenenspende

Bezüglich der Nierentransplantation besteht generell die Möglichkeit einer Lebend- so wie einer Verstorbenenspende.

Lebendspenden (*living donor*, LD) werden durch nahe, volljährige Angehörige oder Lebenspartner durchgeführt. Bei den kindernephrologischen Patient*innen erfolgt die Lebendspende in den meisten Fällen durch die Eltern oder die Großeltern. Lebendspenden bieten für die Patient*innen vor allem den Vorteil, dass Transplantationen planbarer werden. Einerseits kann somit die Durchführbarkeit einer präemptiven Nierentransplantation vereinfacht werden, was mit einem besseren Überleben für die Kinder vergesellschaftet ist, andererseits kann somit auch die kalte Ischämiezeit des Nierentransplantats kürzer gehalten werden und es liegen häufig aufgrund des Verwandschaftsverhältnisses günstige Kombinationen der Gewebemerkmale vor.[11] Nachteile der Lebendspende können für die Spender*innen durch die durchzuführende Operation und mögliche Komplikationen entstehen, wobei aber die perioperative Mortalität mit 0,03% sehr gering ist. Auch das Gesamtrisiko, irgendeine Komplikation nach der Operation zu erleiden, ist mit 9% niedrig. Insgesamt besteht für Spender*innen nach erfolgter Entnahme der Niere ein geringes Risiko, selbst im Verlauf seines Lebens eine dialysepflichtige Nierenerkrankung zu entwickeln.[22]

Bei der Verstorbenenspende (*deceased donor*, DD) wird die Niere eines Menschen, welcher als irreversibel hirntot deklariert wurde, bei entsprechend vorliegender Einverständniserklärung entnommen und anschließend transplantiert. Die Vermittlung der Organe im Rahmen der Verstorbenenspende erfolgt in Deutschland über Eurotransplant. Die Organe werden anhand eines Punktesystems vermittelt, welches die Übereinstimmung der Gewebemerkmale zwischen Spender*innenorgan und Empfänger*innen, die Wartezeit auf ein Organ, und die mutmaßliche Transportdauer bis zu den Empfänger*innen berücksichtigt.[22]

Insgesamt kann man bei einer Lebendnierenspende von einem verbesserten 5-Jahres-Transplantatüberleben um ca. 10% ausgehen, nicht unerheblich beeinflusst durch eine bessere immunologische Kompatibilität der humanen Leukozytenantigene (HLA-

Kompatibilität) von Spender*innen und Empfänger*innen,[5] und der Eventualität einer geringeren Dosis von immunsupprimierenden Medikamenten, was wiederum mit weniger Medikamenten-assoziierten Nebenwirkungen[11] für die Kinder verbunden ist.

2.3.2 Immunologische Voraussetzungen für eine Nierentransplantation

Da es bei einer Nierentransplantation zu einer Übertragung von Gewebe eines Menschen zu einem anderen kommt, wird das transplantierte Organ durch das Immunsystem des Empfängers als fremd wahrgenommen.[23] Ausschlaggebend für diese immunologische Reaktion ist vor allem der *major histocompatibility complex* (MHC), eine genetische Gruppe, die sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 befindet und für Moleküle codiert, die sich auf den humanen Körperzellen befinden. Diese sogenannten HLA-Antigene zeichnen die immunologischen Gewebeeigenschaften menschlicher Zellen aus und werden in zwei Hauptklassen eingeteilt: HLA-Klasse I Antigene, die sich auf allen kernhaltigen Zellen und Thrombozyten, aber nicht auf Erythrozyten befinden[24] und in HLA-A, HLA-B und HLA-C eingeteilt werden und HLA-Klasse II Antigene, die sich primär auf antigenpräsentierenden Zellen befinden, beispielsweise B-Lymphozyten, Makrophagen oder dendritischen Zellen. HLA-Klasse II Moleküle werden ebenfalls unterteilt in HLA-DP, HLA-DQ und HLA-DR. Alle diese Antigene spielen eine entscheidende Rolle bei der Erkennung von Fremdgewebe durch das Immunsystem sowie einer Abstoßungsreaktion.[23]

2.3.3 Nachsorge und Immunsuppression nach einer Nierentransplantation

Im Anschluss an eine Nierentransplantation ist eine intensive Nachsorge in erfahrenen Zentren vonnöten, die zum einen die regelmäßige Durchführung routinemäßiger Untersuchungen sicherstellt, und andererseits die frühestmögliche Detektion etwaiger Komplikationen gewährleistet.

Die Patient*innen werden nach einer Transplantation dauerhaft immunsuppressiv behandelt, um eine Abstoßungsreaktion des Körpers auf das transplantierte Organ zu vermeiden. Hierbei sind das Therapiekonzept und die Dosierung stark abhängig vom Risikoprofil der Kinder, u.a. von der HLA-Kompatibilität, und von weiteren klinischen Begleitumständen.[5]

In der Regel erfolgt die Immunsuppression an verschiedenen Angriffspunkten des Immunsystems; nennenswerte Medikamente sind hier vor allem Glucocorticoide (Prednisolon und Methylprednisolon), Calcineurininhibitoren (Tacrolimus und Ciclosporin A), Mycofenolatmofetil, Azathioprin und mTOR-Inhibitoren (*mammalian target of rapamycin*-Inhibitoren), zu denen Sirolimus und Everolimus gehören. Die Kombinationstherapie verschiedener Präparate ermöglicht eine niedrigere Dosierung der einzelnen Medikamente und somit eine insgesamt geringere Ausprägung der unerwünschten Arzneimittelwirkungen.[5]

2.3.4 Outcome nach einer Nierentransplantation

In den vergangenen Jahren konnte das Outcome nach kindlichen Nierentransplantationen insbesondere durch vermehrte Erfahrungen im Bereich der Immunsuppression und Infektionsbehandlung, sowie durch eine verbesserte Nachbetreuung kardiovaskulärer Folgeerkrankungen verbessert werden.[5]

Unabhängig von der Form der Nierenspende kann man mittlerweile von einem 5-Jahres-Überleben von mehr als 90% ausgehen; das 5-Jahres-Transplantatüberleben von Lebendnierenspenden hingegen liegt mit 96% etwas über dem der Verstorbenenspenden mit einem Transplantatüberleben von rund 90% nach 5 Jahren bei pädiatrischen Patient*innen.[25] Insgesamt zeigen sich nach Nierentransplantationen aktuell auch seltener Komplikationen wie die akute zelluläre Abstoßung, sowie die Entwicklung transplantationsassoziierter maligner Erkrankungen.[11]

Das Überleben der Patient*innen zeigt sich somit deutlich besser als bei einer langfristigen Dialysetherapie. Infektionen stellen aktuell mit einem Anteil von 40% die weitaus häufigste Todesursache nach Transplantation dar, gefolgt von kardiopulmonalen Komplikationen mit 13%.[5]

2.3.5 Ursachen für eine verschlechterte Nierentransplantatfunktion und für ein Transplantatversagen

Die Ursachen für die Verschlechterung eines Nierentransplantats sind vielfältig und können akuter oder chronischer Genese sein. Während akute Transplantatabstoßungen in den meisten Fällen immunologischer Genese sind,[7] können Ursachen für ein chronisches Transplantatversagen immunologischen oder nicht-immunologischen Ursprungs sein. In vielen Fällen handelt es sich um eine multifaktorielle Genese der Transplantatschädigung, die aus einem Zusammenspiel immunologischer und nicht-immunologischer Mechanismen entsteht, und die Hauptursache für den Langzeitverlust von Nierentransplantaten ist.[26]

Zur diagnostischen Klassifikation und Systematisierung der Abstoßungsreaktionen eines Nierentransplantats wird seit 1991 die Banff-Klassifikation eingesetzt. Zur Anwendung der Banff-Klassifikation muss eine Nierenbiospie durchgeführt werden, die im Nachhinein nephropathologisch begutachtet wird.[27] Je nach Genese der Abstoßungsreaktion kann folglich ein therapeutisches Konzept ausgearbeitet werden, das unter anderem die Anpassung der immunsuppressiven Therapie und ggf. die Verwendung von monoklonalen Antikörpern beinhaltet.[5,6]

2.3.5.1 Akute Transplantatabstoßungen

Akute Transplantatabstoßungen treten bei den aktuellen Therapie- und Nachsorgekonzepten im Verlauf des ersten Jahres bei ca. 15-20% aller Patient*innen auf und

verlaufen in den meisten Fällen eher milde. Meist machen sich akute Abstoßungsreaktionen durch eine unscheinbare Klinik bemerkbar. In den meisten Fällen zeigt sich ein erhöhtes Kreatinin, das sich insbesondere durch die engen laborchemischen Kontrollen im Verlauf an die Organtransplantation bemerkbar macht. Bei fehlenden Hinweisen auf eine andere Genese der Kreatininerhöhung, wie beispielsweise ein Harnwegsinfekt oder eine Harntransportstörung, sollte zeitnah eine diagnostische Biopsie der Spenderniere angestrebt werden.[5] Ursachen für akute Abstoßungen können eine akute Antikörper-vermittelte Rejektion oder eine akute T-Zell-vermittelte Rejektion sein.[6]

In den vergangenen Jahrzehnten wurden große Fortschritte in der Immunsuppression nach erfolgter Transplantation erreicht, was zu einer deutlichen Verbesserung des kurzfristigen Transplantatüberlebens und einer Reduktion akuter Abstoßungsreaktionen führte. Dies erbrachte eine erhebliche Verbesserung des 1-Jahres-Transplantatüberlebens bei Organen von verstorbenen Spendern von 50% auf 94%, bei Lebendspenden sogar auf 97%.[26]

2.3.5.2 Chronische Transplantatschädigung

Einen weitaus wichtigeren Stellenwert nimmt die chronische Transplantatschädigung ein.[26] Das Risiko einer Transplantatschädigung ist dabei i.d.R. von mehreren Faktoren abhängig, unter anderem den immunologischen Voraussetzungen und der Kompatibilität von Spender und Empfänger, der Art und Dosis der Immunsuppression, sowie der Compliance der Patient*innen bei der Medikamenteneinnahme.[5] Generell kann die chronische Transplantatschädigung entweder immunologischer oder nicht-immunologischer Genese sein. Bei nichtimmunologischen Schädigungsmechanismen spielen v.a. die arterielle Hypertonie oder die glomeruläre Hyperfiltration eine Rolle. Bei den immunologischen Mechanismen der Transplantatschädigung kann wiederum zwischen Antikörper- und T-Zell-vermittelten Rejektionen unterschieden werden. Für die weitere Abklärung bei bestehendem Verdacht auf eine chronische Abstoßung ist die histologische Untersuchung des Transplantats essentiell, wobei die histopathologische Charakterisierung gemäß der Banff-Klassifikation erfolgt.[5,6]

Die Entwicklung eines chronischen, fortschreitenden Transplantatversagens ist in vielen Fällen der limitierende Faktor für die Lebensdauer eines Nierentransplantats [22] und kann eine erneute Dialyse bzw. eine erneute Nierentransplantation erforderlich machen.[28]

Zusammenfassend hat die chronische Transplantatschädigung aufgrund von der multifaktoriellen Genese und dem komplexen Zusammenspiel verschiedener Schädigungsmechanismen erhebliche Auswirkungen auf die Prognose und Lebensqualität der Patient*innen. Diagnostisch zeigt sich die fortschreitende Vernarbung des Nierenparenchyms häufig durch ansteigende Nierenretentionsparameter sowie eine zunehmende Proteinurie.

Eine frühzeitige Erkennung zeigt sich oft schwierig und erfordert ein engmaschiges Monitoring der Nierenfunktion. Protokollbiopsien im Rahmen von klinischen Studien zeigten bereits drei Monate nach der Nierentransplantation bei rund 50% der untersuchten Transplantate frühe Anzeichen von interstitieller Fibrose und Tubulusatrophie (IF/TA) auf.[26]
Dies unterstreicht auch die Notwendigkeit, Strategien zur frühzeitigen Erkennung und Prävention dieser Schädigungsprozesse zu entwickeln, um das Langzeitüberleben von Nierentransplantaten zu verbessern.

2.4 Proteomics

Proteomics bezeichnet eine Methode zur Untersuchung und Erforschung des Proteoms, also aller exprimierten Proteine eines Organismus bzw. einer Zelle oder einer Flüssigkeit. Insbesondere in den letzten Jahren spielen Proteomicsmethoden eine immer größer werdende Rolle in der medizinischen Forschung und auch Diagnostik.[29]

Clinical Proteomics bezeichnet hierbei den Bereich im Rahmen von *Proteomics*, der sich auf die mögliche Anwendung im klinischen Alltag fokussiert. Ziel ist es unter anderem, mittels Proteinidentifikation, -quantifikation und -charakterisierung einen Einblick in die Pathogenese, sowie die potenziellen Assoziationen von Veränderungen des Proteoms mit Verläufen im Rahmen verschiedenster Erkrankungen zu erhalten. Hierbei ist ein primäres Vorhaben auch, mögliche Proteine zu identifizieren, die als Biomarker dienen können und dazu beitragen können, Krankheiten oder pathologische Zustände überhaupt zu diagnostizieren oder den Verlauf einer Erkrankung zu monitoren. Hierbei haben sich aufgrund von der hohen Sensitivität und Spezifität vor allem die Massenspektrometrie-basierten (MS-basierten) Proteomanalysen durchgesetzt. Genauer gesagt ist die am weitesten verbreitete Technologie die *Liquid chromatography* (LC) gekoppelt mit Tandem-MS (LC-MS/MS) zur vollständigen Identifikation und Quantifikation von Proteinen aus biologischen Proben.[30]

Die Einsatzmöglichkeiten sind insgesamt sehr breit und es können alle Arten von biologischen Proben analysiert werden, sodass MS-basierte Proteomanalysen im Rahmen von onkologischen Erkrankungen, Diabetes mellitus, erworbenen Immundefekten, Medikamentenanalysen oder im Rahmen von Nierenerkrankungen Anwendung finden.[29]

2.5 Extrazelluläre Vesikel

Extrazelluläre Vesikel sind lipidgebundene Vesikel, die von Zellen in den Extrazellulärraum sezerniert werden. Sie sind in den vergangenen Jahren immer mehr in das Interesse der Wissenschaft gerückt und insbesondere ihr Stellenwert als Träger von potenziellen Biomarkern im Extrazellularraum ist aktuell ein großer Bestandteil der

medizinischen Forschung. Vereinfacht unterscheidet man bei den extrazellulären Vesikeln zwischen Exosomen, Mikrovesikeln und apoptotischen Körpern, die sich hinsichtlich ihrer Größe, ihrer Freisetzung sowie ihres Inhalts und der biologischen Funktionen differenzieren. Inhalte der Vesikel sind vor allem verschiedene Lipide, Nukleinsäuren und Proteine, und hierbei insbesondere Proteine, die im Zusammenhang mit dem Lipidmetabolismus und der Plasmamebran stehen.[31]

Exosomen entstehen durch eine Fusion von intrazellulären, multivesikulären Körpern mit der Zellmembran, und werden hierbei in den Extrazellulärraum freigegeben. Sie haben einen Durchmesser von 30-150 Nanometern.[31]

Mikrovesikel entstehen durch ein direktes Ausschnüren der Zellmembran. Sie sind in ihrem Durchmesser zwischen 100 Nanometern und 1 Mikrometer groß. Sie beinhalten i.d.R. Proteine, welche mit der Plasmamembran oder mit dem Zytoplasma assoziiert sind.[31]

Apoptotische Körper entstehen während der Apoptose einer Zelle durch die Teilung der Zellmembran und werden hierbei in den Extrazellulärraum abgegeben. Sie sind in ihrem Durchmesser zwischen 50-5000 Nanometern groß und somit durchschnittlich größer als Exosomen und Mikrovesikel. Sie beinhalten z.B. Zellorganellen und Chromatin.[31]

Die unterschiedlichen Formen der lipidgebundenen Vesikel können prinzipiell von allen Körperzellen sezerniert werden und lange galt der Irrglaube, dass sie primär eine Funktion in den zellulären Entsorgungsmechanismen des Körpers haben. Nach aktuellem Kenntnisstand haben extrazelluläre Vesikel jedoch insbesondere einen Einfluss auf die Zell-Zell-Kommunikation. Darüber hinaus wird ihnen eine Funktion in der Tumor-Progression, Zellerhaltung und der Förderung der Immunantwort zugeschrieben, indem sie als antigenpräsentierende Vesikel fungieren. Der Einsatz von extrazellulären Vesikeln als diagnostisches Mittel bietet vor allem den Vorteil, dass eine große Fülle an Informationen über die biochemischen Vorgänge verschiedener Organsystemen mithilfe eines vergleichsweisen geringen invasiven Aufwands durch die Untersuchung von Serum, Urin oder Liquor erlangt werden kann.[31]

2.5.1 MISEV2018-Guidelines der International Society of Extracellular Vesicles

Aufgrund der immer größer werdenden Fülle an Informationen über extrazelluläre Vesikel, sowie der Zunahme der wissenschaftlichen Publikationen zu der Thematik in den letzten Jahren, hat die *International Society for Extracellular Vesicles* (ISEV) in ihrem aktualisierten Positionspaper „*Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018)*“[32] eine alternative Nomenklatur für die Differenzierung extrazellulärer Vesikel vorgeschlagen. Dieser lag insbesondere auch eine weitestgehend defizitäre Unterscheidung von Exosomen, Mikrovesikel und apoptotischen Körper in Bezug auf die Größe, die Dichte und der enthaltenen Menge an Proteinen und Nukleinsäuren zugrunde.

Im Rahmen des Positionspapiers hat man einerseits die Bezeichnung „extrazellulläre Vesikel“ als Überbegriff für Partikel, die aus Zellen freigesetzt werden, dabei eine Lipiddoppelschicht als Begrenzung haben und nicht die Fähigkeit zur Replikation haben, also ohne einen Zellkern bzw. einen Nucleus sind, unterstützt. Die Zuordnung von extrazellulären Vesikeln zu einem bestimmten Biosyntheseweg sei laut der ISEV jedoch nur schwer möglich.

Aus diesem Grund schlägt die ISEV eine operationale Nomenklatur vor, die sich beispielsweise nach äußerlichen Charakteristika, der biochemischen Zusammensetzung oder Beschreibungen über die Verhältnisse oder den Zellursprung richtet und wie folgt aussieht:

a) Äußerliche Charakteristika:
- **Größe**: “*small EVs*” (sEVs) für EVs mit einer Größe von < 100nm bzw. < 200nm und “*medium/large EVs*” (m/lEVs) mit einer Größe von > 200nm[32]
- **Dichte**: niedrig, mittel, hoch; dabei sollte der Umfang der Dichte am besten genau definiert sein[32]

b) **Biochemische Zusammensetzung:** z.B. CD63+/CD81+-EVs[32]

c) Beschreibung der Verhältnisse oder des Zellursprungs: z.B. Podozyten-EVs, hypoxische EVs, apoptotische Körper[32]

Sollte eine Vermeidung der Begriffe Exosomen oder Mikrovesikel dennoch nicht möglich sein und Verwendung finden, so sollen die Begrifflichkeiten aufgrund der historisch vielfältigen und widersprüchlichen Verwendung genauestens definiert werden.[32]

2.5.2 Small urinary extracellular Vesicles (suEVs)

Bei *small urinary extracellular vesicles* handelt es sich um kleine Vesikel, die von den glomerulären und tubulären Epithelzellen des Nephrons aktiv sezerniert werden und eine wichtige Rolle in der Regulation zahlreicher biologischer Mechanismen zu spielen scheinen. Veränderungen der Zusammensetzung von suEVs hinsichtlich ihres Protein- und RNA-Gehaltes können insbesondere Hinweise auf eine akute Pathologie der Niere liefern und auch physiologisch sezernierte suEVs weisen spezifische Profile auf, die eine Auskunft über den Zustand des Organs geben.[9,33]

Die Ausschüttung der Urinexosomen oder suEVs unterliegt hierbei den physiologischen Bedingungen der Zellen und wird insbesondere während des Zellwachstums und der Zellaktivierung oder nach Zellschäden beschleunigt.[32] Die Proteine der suEVs können daher unter anderem als potenzielle Biomarker für die Niere fungieren und sogleich bereits frühzeitig auf Funktionsveränderungen des Organs hinweisen. Hinzu kommt, dass die Isolation der extrazellulären Vesikel aus dem Urin vollständig non-invasiv möglich ist und lediglich mithilfe einer Urinprobe durchgeführt werden kann.[10]

2.6 Ziel der Arbeit

Indem wir uns einen Überblick über das Proteom von suEVs verschaffen, hoffen wir mithilfe dieser neuen Daten ein breiteres Bild über die Biologie von Nierentransplantaten bei Kindern zu erhalten und frühzeitig Kenntnisse über mögliche Funktionseinschränkungen durch Einblicke in intrazelluläre Signalprozesse zu gewinnen.

Ziel unserer Pilotstudie ist es daher, zu untersuchen, inwiefern Proteomanalysen aus suEVs nierentransplantierter Kinder als diagnostisches Mittel einsetzbar sind und ob sich im Rahmen dieser Analysen signifikante Veränderungen in den Proteommustern bzw. der Proteinexpression identifizieren lassen, die als potentielle Biomarker für den Zustand von Nierentransplantaten dienen können. Damit möchten wir einen Beitrag zur Erforschung von neuen, nicht-invasiven Methoden zur Diagnostik von Nierenfunktionsveränderungen und Abstoßungsreaktionen leisten, die in Zukunft möglicherweise die Nierenbiopsie als invasives diagnostisches Verfahren ablösen können.

3 Material und Methoden

Das Pilotprojekt wurde im Rahmen der „Studie zur Aufklärung seltener Nierenerkrankungen (RKD) und der ihnen zugrunde liegenden Pathomechanismen“ durchgeführt. Die Studie ist dem Deutschen Register Klinischer Studien mit der ID: DRKS00008910 registriert. Dem Ethikantrag (Zeichen 15-215) zu dieser klinisch-experimentellen Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln zugestimmt.

Die angewandten Methoden in dieser Arbeit, einschließlich des Arbeitsprogramms im Labor, der massenspektrometrischen Untersuchungen sowie der bioinformatischen Analysen, basieren größtenteils auf den Arbeiten von Braun et al., welche 2019 in bioRxiv[34] und 2020 im *Journal of Extracellular Vesicles*[33] publiziert wurden. Die Vorgehensweise wurde jedoch verändert, z.B. im Hinblick auf das Urinvolumen sowie die Zeitpunkte der Urinsammlung und Weiterverarbeitung, um sie an die Anforderungen dieser Pilotstudie anzupassen.

3.1 Zusammenfassung des Studienablaufs

In dieser Studie haben wir im Rahmen einer prospektiven, monozentrischen, klinisch-experimentellen Querschnittsstudie als Pilotprojekt erste Daten über die Proteomdiagnostik von *small urinary extracellular vesicles* (suEVs) aus dem Urin nierentransplantierter Patient*innen im Kindesalter gesammelt. Aufgrund der geringen Anzahl von Nierentransplantationen im Kindesalter und des insgesamt sehr kleinen Patient*innenklientels, wurde die Studie primär als Querschnittsstudie angelegt.

Von allen Proband*innen wurde eine einmalige Urinprobe zu einem undefinierten Zeitpunkt nach der Nierentransplantation abgenommen, die im Nachhinein im Labor ultrazentrifugatorisch aufgearbeitet, anschließend in der Proteomics Facillity des CECAD Köln massenspektrometrisch gemessen und hinsichtlich ihres Proteoms in den suEVs analysiert wurde. Die identifizierten Proteinintensitäten konnten im Verlauf statistisch transformiert, ausgewertet und unter anderem mit der eGFR korreliert werden.

Als Vergleichsgruppe für die pädiatrischen nierentransplantierten Patient*innen wurden zudem die Daten von adulten Transplantationspatient*innen verwendet, die nach dem gleichen (Ultra-)zentrifugationsprotokoll bearbeitet und in der gleichen Probenserie massenspektrometrisch gemessen wurden.

Diese Daten dienten dazu, mittels differentieller Proteomanalysen Übereinstimmungen bzw. Unterschiede in der Proteinexpression pädiatrischer und adulter Patient*innen aufzuzeigen sowie signifikant exprimierte Proteine zu identifizieren.

Die identifizierten Proteine wurden im Anschluss biologisch interpretiert. Um eine Zuordnung der Proteine zu biologischen Signalwegen und Prozessen zu ermöglichen, wurden unter anderem die Datenbanken der *Gene Ontology* (GO) und der *Kyoto Encyclopedia of*

Genes and Genomes (KEGG) hinzugezogen.

3.2 Auswahl der pädiatrischen Patient*innen

Für die Beantwortung der Fragestellung wurden 14 Patient*innen der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Köln eingeschlossen. Die Rekrutierung der pädiatrischen Patient*innen erfolgte in Zusammenarbeit mit der kindernephrologischen Ambulanz, bei der die Patient*innen zu dem Zeitpunkt der Patient*innenrekrutierung in regelmäßiger ambulanter Anbindung standen. Die Urinproben der Patient*innen konnten bei vorliegender entsprechender Einverständniserklärung während der normalen Routinekontrolltermine gesammelt werden, sodass gleichzeitig auch eine vollständige laborchemische Diagnostik einschließlich des aktuellen Kreatininwerts und der daraus resultierenden eGFR durchgeführt wurde. Weiterhin lagen klinische Daten über das Geschlecht, die Größe, und das Gewicht zum Tag der Probenentnahme, die Art des Nierentransplantats (*deceased donor* = DD vs. *living donor* = LD) sowie der Medikationsplan inklusive des Immunsuppressionsschemas und der antihypertensiven Medikation vor.

Die Sammlung der Urinproben erfolgte in den Jahren 2018 und 2019; für die Weiterverarbeitung im Rahmen der Studie wurden die Daten der Patient*innen pseudonymisiert. Die Zeitpunkte und Art der Probensammlung sind aufgrund der für die Proband*innen zum Teil sehr große Füllmenge und aufgrund der anatomischen Begebenheiten sehr heterogen. Es handelte sich entweder um Morgenurin, oder frühen Abendurin. Bei den meisten der Proben handelte es sich um Mittelstrahlurin, der in Standard-Urinprobengefäßen gesammelt wurde. Einige Proben wurden mithilfe der clean-catch Methode aufgefangen, oder über ein Urostoma entnommen und in einem frischen Urinbeutel gesammelt.

Als Hauptkriterien für den Einschluss in die Studie galten eine regelmäßige Anbindung in der nephrologischen Ambulanz, eine bereits erfolgte Nierentransplantation in Vergangenheit, sowie eine ausreichende Menge des Urinvolumens bei der Probenabgabe.

Hierbei konnte die Nierentransplantation präemptiv oder nach bereits begonnener Dialysetherapie erfolgt sein. Die Grunderkrankung, die zur Transplantation der Kinder führte, und die Art des Nierentransplantats, ob Lebendspende oder Verstorbenenspende, waren für den Einschluss in die Studie unerheblich, wurden in der Auswertung der Daten jedoch berücksichtigt.

Für die Isolierung der extrazellulären Vesikel wurde bei den aktuellen Isolationsverfahren eine Menge von ca. 50 – 100 ml verwendet; das Urinvolumen selbst war mitunter abhängig vom Blasenvolumen und vom Alter der Patient*innen.

3.2.1 Vereinfachte Gruppierung der kindlichen Grunderkrankungen

Aufgrund der meist sehr heterogenen Genese des pädiatrischen Nierenversagens wurde zur vereinfachten Darstellung in dieser Arbeit eine Gruppierung der Erkrankungen in zwei Kategorien vorgenommen. Abhängig vom Ursprung der Nierenerkrankung erfolgte eine Unterteilung in CAKUT (alle Erkrankungen, die dem CAKUT-Formenkreis angehören) und andere (dazu gehören Erkrankungen glomerulärer oder zystischer Genese, u.a. nephrotisches Syndrom, ARPKD und Nephronophthise).

3.2.2 Pseudonymisierung der pädiatrischen Proben

Im Rahmen der Probensammlung und -verarbeitung wurden die pädiatrischen Proben pseudonymisiert. Die Proben wurden chronologisch benannt und von allen Patient*innen wurden einmalig Proben zu einem undefinierten Zeitpunkt nach Transplantation gesammelt. Nach Pseudonymisierung der Patient*innendaten lagen die Proben KNTx1 – KNTx16 (Kinderklinik-Nierentransplantation-Zahl) vor.

3.3 Auswahl der erwachsenen Kontrollproband*innen

Als Kontrollproband*innen wurden uns freundlicherweise Daten über das Proteom von acht erwachsenen, nierentransplantierten Patient*innen aus dem klinischen Studienzentrum der Klinik II für Innere Medizin des Universitätsklinikums Köln zur Verfügung gestellt. Die Voraussetzung für die Verwendung der Daten dieser Proband*innen als Kontrollen in dieser Studie waren neben einer entsprechenden Einverständniserklärung eine bereits erfolgte Nierentransplantation vor mindestens zehn Tagen, sowie die Durchführung der massenspektrometrischen Messung in der gleichen Probenserie. Zusätzlich lagen klinische Daten über das Alter und das Geschlecht, die Form der Nierenspende (ob DD oder LD), sowie den Kreatininwert und der eGFR vor.

Die Probenbearbeitung erfolgte gemäß des gleichen (Ultra-)zentrifugationsprotokolls und die massenspektrometrische Messung wurde im gleichen Proben-Batch mit den Messungen der kindlichen Proben durchgeführt, sodass eine gute Vergleichbarkeit des gemessenen Proteoms vorlag. Die vorliegenden Daten konnten in der Analyse als Vergleichspunkt hinsichtlich des Alters und des Abstands zur Transplantation angewendet werden.

3.3.1 Pseudonymisierung der adulten Kontrollproben

Ebenso erfolgte eine Pseudonymisierung der adulten Kontrollproben im Zuge der Datensammlung. Auch hier wurden die Proben entsprechend des Zeitpunkts der Probenabnahme chronologisch benannt. Nach Pseudonymisierung der Patient*innendaten

lag insgesamt jeweils eine Probe pro Patient*in (Proben NTx1 – NTx14) vor.

3.3.2 Subgruppeneinteilung der Kontrollproband*innen

Weiterhin wurden die Kontrollen zusätzlich in zwei Subgruppen eingeteilt. Als Ergänzung zu der Gesamtgruppe von 8 erwachsenen Patient*innen erfolgte eine Einteilung der Patient*innen hinsichtlich des Abstands zwischen dem Zeitpunkt der Probenabgabe und der Nierentransplantation. Dadurch ergaben sich eine Subgruppe von Patient*innen (n = 5), die ihre Transplantatniere weniger als einen Monat vor der Probensammlung erhalten hat (*NTx <1 month post OP*), sowie eine Subgruppe bestehend aus Patient*innen (n = 3), bei denen die Nierentransplantation vor mindestens einem Jahr durchgeführt wurde (*NTx >1 year post OP*). Diese konnten dann jeweils mit den kindlichen Probenanalysen verglichen werden.

3.3.3 Vereinfachte Gruppierung der adulten Grunderkrankungen

Auch bei den erwachsenen Proband*innen erfolgte für eine übersichtliche Darstellung der Grunderkrankungen eine Gruppierung in zwei Kategorien. Je nach Genese der terminalen Nierenerkrankung wird in dieser Arbeit zwischen glomerulär (beinhaltet FSGS, Immunglobulin A-Nephropathie bzw. IgA-Nephropathie und membranöse Gomerulonephritis) und anderen (neurogen, interstitiell oder zystischer Genese) unterschieden.

3.4 Ausschlusskriterien für bereits gemessene Proben

Im Zuge der Datenauswertung mussten sowohl pädiatrische Proben, als auch adulte Kontrollproben ausgeschlossen werden. Gründe für einen Ausschluss waren i.d.R. zu geringe Urinmengen, da diese im Rahmen des Ultrazentrifugationsprotokolls im Labor aufgrund einer eigeschränkten Vergleichbarkeit mit den übrigen Proben nicht weiterverarbeitet werden konnten. Einmalig wurde die Messung aufgrund von einer Makrohämaturie wiederholt, um eine bessere Vergleichbarkeit mit den anderen Proben zu erhalten. Zuletzt wurden auch Proben als *Outlier* bzw. als Ausreißer aufgrund einer zu geringen Proteinanzahl im Rahmen der bioinformatischen Auswertung von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

3.5 Nierentransplantatfunktion anhand der laborchemischen Parameter

3.5.1 eGFR nach CKD-EPI

Zur Schätzung der GFR Erwachsener Patient*innen wurde in der Laboratoriumsmedizin der Universitätsklinik Köln die Formel nach CKD-EPI 2009 (*Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*) verwendet, die neben dem Plasmakreatininwert auch das Alter und das Geschlecht des Patient*innen berücksichtigt. Da der ethnische

Hintergrund der Patient*innen bei dieser Formel nur eingeschränkt Beachtung findet, sollte im Falle von Patient*innen mit schwarzem Hautkolorit zusätzlich ein Korrekturfaktor zur Multiplikation angewendet werden. Weiterhin ist die Formel nur bedingt bei Patient*innen über 70 Jahren validiert, was in der Beurteilung der eGFR berücksichtig werden sollte. Die Schätzformel nach CKD-EPI 2009 lautet wie folgt:[35]

Männer:

Kreatinin ≤ 0,9 mg/dl: Kreatinin-Clearance = $141 \times (\text{P-Kreatinin}/0{,}9)^{-0{,}411} \times 0{,}993^{\text{Alter}}$

Kreatinin > 0,9 mg/dl: Kreatinin-Clearance = $141 \times (\text{P-Kreatinin}/0{,}9)^{-1{,}209} \times 0{,}993^{\text{Alter}}$

Frauen:

Kreatinin ≤ 0,7 mg/dl: Kreatinin-Clearance = $144 \times (\text{P-Kreatinin}/0{,}7)^{-0{,}329} \times 0{,}993^{\text{Alter}}$

Kreatinin > 0,7 mg/dl: Kreatinin-Clearance = $141 \times (\text{P-Kreatinin}/0{,}7)^{-1{,}209} \times 0{,}993^{\text{Alter}}$

3.5.2 eGFR nach FAS

Für die Bestimmung der GFR im Kindesalter wird im Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Köln unter anderem die eGFR nach FAS (*full age spectrum*) verwendet, da unter anderem die Kreatinin-basierten Formel, wie sie bei Erwachsenen angewendet werden (z.B. eGFR nach CKD-EPI), nicht adäquat bei pädiatrischen Patient*innen sind.
Diese Formel basiert auf einem altersstandardisierten Serumkreatininwert (Scr/Q), bei dem Q den medianen Serumkreatininwert für die gesunde Referenzpopulation bezogen auf das Alter und das Geschlecht, widerspiegelt. Zur Berechnung der eGFR werden demnach das Geschlecht, das Alter, sowie der Serumkreatininwert benötgt. Die FAS-Formel trägt insbesondere zu einer höheren Validität bei der geschätzten glomerulären Filtration im Kindesalter bei.[36]

3.6 Arbeitsprogramm im Labor

Wie bereits oben beschrieben, basieren die angewandten Methoden größtenteils auf den Arbeiten von Braun et al., welche 2019 in bioRxiv[34] und 2020 im *Journal of Extracellular Vesicles*[33] publiziert wurden.

Zur Isolation der Urinexosomen wurde ein differentielles (Ultra-)Zentrifugationsprotokoll angewendet, welches eine Isolation der suEVs aus dem Urin ermöglichen soll. Der Begriff differentiell bezieht sich hierbei auf die unterschiedlichen Zentrifugationsgeschwindigkeiten im Rahmen des Arbeitsprogrammes im Labor und ermöglicht eine Isolation verschiedener Partikelfraktionen. Zuallererst wird mittels eines sequenziellen Ansatzes mit geringer Zentrifugationskraft (17.000 g) gearbeitet, um

Zellüberstande und Zelltrümmer zu entfernen und im Anschluss mittels höherer Zentrifugationskraft (200.000 g) die suEVs von den Überständen zu trennen.[37] Durch den differentiellen Ansatz kann ein initial größeres Probenvolumen verwendet werden, um eine Isolation von insgesamt mehr suEVs zur anschließenden Proteomanalyse zu gewährleisten.

3.6.1 Urinsammlung und Vorbehandlung des Urins

Für die Verarbeitung der Proben wurde eine Menge von mindestens 50 ml Urin benötigt, der idealerweise innerhalb von maximal drei Stunden nach der Probenabgabe bearbeitet werden sollte. War eine sofortige Weiterverarbeitung im Labor nicht möglich, so musste die Urinprobe in Eiswasser kaltgestellt werden. Proben, die nicht im Zeitraum von drei Stunden weiterverarbeitet werden konnten, wurden verworfen, da es ansonsten zu einer eingeschränkten Probenqualität kommen kann.

Innerhalb der ersten drei Stunden nach der Probensammlung wurden die Proteaseinhibitoren und Konservierungsstoffe der Konzentrationen 6,6mM Natriumazid (NaN3), 2,0mM Ethylenglycolbis(aminoethylether)-N,N,N′,N′-tetraessigsäure (EGTA) und 1,0mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) den Urinproben hinzugefügt. Im Anschluss daran erfolgte im Rahmen einer Hochgeschwindigkeits-Zentrifugation durch den Einsatz einer Beckman Avanti Zentrifuge mit TLA 16,250 Rotor und festem Winkel sowie Zentrifugations-Gefäße mit 50ml Fassungsvermögen (Greiner Bio-One, Deutschland) die Trennung von Zellen bzw. Zelltrümmern sowie und mittelgroßen bis großen extrazellulären Vesikeln. Die Proben wurden bei 17.000g und 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Der überstehende Urin wurde anschließend in frische 50-ml-Zentrifugationsgefäße abgefüllt, und die Proben wurden bis zur weiteren Bearbeitung in einem Gefrierschrank bei -80 °C aufbewahrt.[33]

3.6.2 Trennung der *small urinary extracellular vesicles* (suEVs)

Um die suEVs vom Urin trennen zu können, wurden die eingefrorenen Proben schonend aufgetaut. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 17.000g und 4°C für 20 Minuten. Somit konnten Proteinablagerungen, die durch das Einfrieren und Auftauen der Proben entstanden sind, entfernt werden. Die überstehende Flüssigkeit wurde im Nachhinein in Ultrazentrifugations-Gefäße aus Polykarbonat (Beckman Coulter, USA) abgefüllt. Nachfolgend erfolgte eine Ultrazentrifugation bei 200.000g und 4°C für 60 Minuten mit einer Beckman Coulter Optima Ultrazentrifuge und einem 70Ti Rotor mit festem Winkel, um die suEVs zu trennen. Die überstehende Flüssigkeit konnte verworfen werden und die suEV-Pellets wurden resuspendiert und in einem 4°C 20mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Puffer (TRIS-Puffer) pH 8,6 konzentriert. Daraufhin wurde die Ultrazentrifugation wiederholt. Nachdem der Überstand nach diesem Schritt verworfen wurde, konnte das gewonnenen suEV-Pellets aus dem Vollurin in 40µl 8M Urea-Puffer und

Protease Inhibitor Mix (Sigma-Aldrich, USA) resuspendiert und bei -80°C für die weiteren Messungen gelagert werden.[33]

3.6.3 Proteomanalysen

Nach Aufbereitung des Urins und Isolation der suEV-Pellets konnte das darin enthaltene Proteom unvoreingenommen massenspektrometrisch analysiert und quantifiziert werden. Hierzu wurde eine Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung bzw. eine *Liquid Chromatography Mass Spectometry* (LC-MS) verwendet, bei der Substanzgemische mittels Flüssigkeitschromatographie getrennt und anschließend massenspektrometrisch detektiert und quantifiziert werden können.[38]

Anschließend konnten die gemessenen Protein-Intensitäten mittels linearer Regressionsmodelle mit der eGFR nach FAS bei den pädiatrischen Proband*innen bzw. nach CKD-EPI 2009 bei den adulten Proband*innen, sowie dem Abstand zwischen Nierentransplantation und Probenentnahme, sowie dem Alter der Patient*innen korreliert werden.

3.6.3.1 Unbiased proteomic analysis

Die Massenspektrometrie für die *unbiased proteomic analysis* bzw. die unvoreingenommene Proteomanalyse wurde analog zu den in Braun et al. (2019) beschriebenen Methoden durchgeführt.[34]

Die Messung der Proben erfolgte durch die *Core Facility* des Kölner Exzellenzclusters CECAD. Für die Messung kam ein Q Exactive Plus Orbitrap Tandem-Massenspektrometer (Thermo Scientific) zum Einsatz. Die Trennung der Peptide erfolgte mittels nano-Flüssigkeitschromatographie auf einer 50cm Säule, die hierfür mit 1.7 µm C18 (*Octadecylsilyl)* Partikeln (Dr Maisch GmbH) befüllt und in einem Säulenofen eingesetzt wurde. Damit die Peptide fraktioniert werden konnten, wurde ein binäres Puffersystem mit Puffer A, bestehend aus 0,1% Ameisensäure, sowie Puffer B, bestehend aus 80% Acetonitril und 0.1% Ameisensäure, verwendet. Die Trennung erfolgte über 150min-Gradienten gemäß nachfolgendem Programm: 7-38% B, anschließend 5 Minuten bei 80% B, gefolgt von einer Re-Equilibrierung bei 5% B. Die Ionisierung der Peptide erfolgte mittels Elektronenspray-Ionisation (ESI) in einen Q Exactive Plus Tandem Massenspektrometer. Für die Messungen der ersten Stufe der Massenspektrometrie (MS1-Scans) kamen eine Injektionszeit von 20 ms, eine Auflösung von 70.000, ein Massebereich von 200–1200 m/z sowie ein AGC-Zielwert (*automatic gain control* bzw. automatische Verstärkungsregelung) von 1E6 zum Einsatz. Die Messungen der zweiten Stufe der Massenspektrometrie (MS2-Scans) wurden im Top-10-Modus generiert, um die Peptide mittels *Higher-energy collisional dissociation* (HCD), also

höherenergetischer kollisionsinduzierter Dissoziation, weiter fragmentieren zu können. Hierfür wurden eine Auflösung von 35.000 bei 200 m/z, ein AGC-Zielwert von 5E5 und eine maximale Injektionszeit von 120 ms eingestellt.[34]

Die von den Messungen erzeugten Rohdaten (.raw) wurden mit der Software MaxQuant (Version 1.5.0.1) ausgewertet. Die Datenbanksuche nach der Target-Decoy-Strategie erfolgte auf Basis der humanen Uniprot-Referenzdatenbank aus dem Jahre 2017. Hierfür wurden die Standardeinstellungen, sowie zusätzliche die Einstellungen "MQLFQ" (*MaxQuant label-free quantification*) und „*Match between runs*" verwendet. Für Proteine, Peptide und *peptide-spectrum matches* (PSM) wurde jeweils eine *false discovery rate* (FDR) von 0,01 festgelegt. Für die bioinformatische bzw. statistische Analyse und Bündelung der mittels Massenspektrometrie gewonnenen Proteomdaten wurde die Software Perseus (v 1.4.0.1. und v. 1.5.2.4) verwendet. Zur Anpassung an multiples Testen kam die SAM-Methode (*significance analysis of microarray*) zur Anwendung, der Cutoff-Wert hierfür lag bei s0 = 01 und FDR <0,001.[33,34]

3.7 Bioinformatische Analyse und Interpretation der Daten

Um das Proteom der suEVs adäquat interpretieren zu können und Unterschiede in der Proteinexpression zwischen verschiedenen Gruppen bzw. Proben identifizieren zu können, wurden die massenspektrometrisch gemessenen Proteomdaten statistisch analysiert und gebündelt. Hierfür wurde die biomedizinische Software Perseus (v 1.4.0.1. und v. 1.5.2.4), verwendet.

Die Proteomanalysen wurden mit der Human UniProt-Datenbank verglichen, um die Proteine bzw. Proteinintensitäten zu identifizieren und entsprechend zuzuordnen. Die UniProt-Datenbank beinhaltet unter anderem Informationen über zelluläre Lokalisation, funktionelle Informationen und Interaktionspartner, und erleichtert somit den Vergleich der verschiedenen Proteinexpressionen der ermittelten Daten.[38] Den einzelnen Proteinen dieser Arbeit wurde eine Uniprot-ID aus der Datenbank zugeordnet, um eine eindeutige Identifikation gewährleisten zu können.

Zur vereinfachten Interpretation der massenspektrometrisch identifizierten Proteomdaten unserer Proben wurde bei den Proteinen, die in mindestens 50% aller pädiatrischen Proben detektiert wurden, eine logarithmische Transformation durchgeführt. Diese Transformation stabilisiert die Varianz und erleichtert dadurch sowohl die Darstellung der Proteinintensitäten als auch den Vergleich der Variationen zwischen den Proben.[40]

Im Anschluss erfolgte eine differentielle Analyse der exprimierten Proteine aus unseren pädiatrischen Urinproben im Bezug zu den adulten Kontrollproben.

3.7.1 Differentielle Proteomanalysen

Die differentielle Proteomanalyse dient unter anderem zum Vergleich der Proteine verschiedener Gruppen, in diesem Falle Proben von pädiatrischen Patient*innen und adulten Kontrollproband*innen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine differentielle Analyse der Proteomdaten unserer pädiatrischen Proben sowie der erwachsenen Kontrollproband*innen durchgeführt, um potenzielle Proteine zu identifizieren, die signifikant unterschiedlich zwischen den Gruppen exprimiert wurden. Diese Analysen sind mitunter entscheidend, um Einblicke in die verschiedenen biologischen bzw. pathophysiologischen Prozesse zu erhalten und potenzielle Biomarker im Rahmen dieser Arbeit zu identifizieren.[41]

Zur Identifizierung signifikant unterschiedlich exprimierter Proteine bzw. Proteinexpressionen zwischen den Gruppen wurden verschiedene statistische Verfahren angewendet.

Der *Fold Change* (Faltungsraten) im Rahmen der Analysen gibt das Verhältnis der unterschiedlichen Mittelwerte zwischen den pädiatrischen Proben und den adulten Kontrollproben an. Hierbei repräsentiert der *Fold Change* die relative Veränderung der Proteinkonzentration,[42] wobei ein *Fold Change* von 1 keine Veränderung anzeigt, ein Wert >1 auf eine vermehrte Expression hindeutet und ein Wert <1 auf eine verminderte Expression deutet.

Weiterhin wurde ein Mittelwert der Protein-Intensitäten ermittelt, um diese hinsichtlich der unterschiedlichen Proteinenexpressionen der Proband*innen und der Kontrollen zu vergleichen. Mittels t-Statistik konnte unterschieden werden, wie stark die Mittelwerte zwischen den beiden Gruppen sich in Relation zu der Variabilität innerhalb der jeweiligen Gruppen unterschieden. Je höher die t-Statistik, desto signifikanter ist der Unterschied.

Um signifikante Proteine im Rahmen der differentiellen Analysen zu identifizieren, wurde als Signifikanzniveau für die statistischen Analysen ein Wert von 5% festgelegt. Das bedeutet, dass Werte $p < 0{,}05$ als statistisch signifikant gelten. Zur Minimierung des Risikos falsch positiver Entdeckungen bei multipler Testung wurde zudem ein adjustierter bzw. korrigierter p-Wert angewendet.

Abschließend wurde eine B-Statistik durchgeführt, die angibt, wie hoch die Wahrscheinlichkeit für ein tatsächlich differentiell exprimiertes Protein ist. Diese wird in Zusammenhang mit dem adjustierten p-Wert angewendet.

Die Ergebnisse der differentiellen Analysen wurden zur besseren Datenauswertung und Interpretation visuell mithilfe von *Volcano-Plots* und *Heatmaps* dargestellt.

3.7.1.1 Heatmaps

Heatmaps im Rahmen von Proteomanalysen werden verwendet, um komplexe Daten zu visualisieren und mögliche Muster in den unterschiedlichen Proteinexpressionen zwischen

verschiedenen Proben zu erkennen. Insbesondere dienen sie dazu, Unterschiede oder Ähnlichkeiten zwischen den einzelnen Proben, sowie den Proben im Vergleich zu den Kontrollen aufzuzeigen. Mittels Clusteranalyse lassen sich anhand von *Heatmaps* Proteine gruppieren, um potenzielle Gruppen mit ähnlichen Expressionsmustern zu identifizieren. Proben mit ähnlichen Proteinexpressionsmustern können bei der Interpretation von *Heatmaps* geclustert werden.[43] Hierbei repräsentiert die Farbskala innerhalb der *Heatmap* die Intensitäten der Proteinexpression, wobei blau eine niedrige Intensität und rot eine hohe Intensität bedeutet. Bei der Erstellung unserer *Heatmaps* wurden die Intensitätswerte der Proteinexpression als Rohdaten dargestellt, um eventuelle absolute Unterschiede in der Proteinexpression verschiedener Proben darzustellen. Darüber hinaus erfolgte die Darstellung von transformierten Z-Scores der Proteinintensitäten, um die relativen Werte der Proteinexpression besser vergleichen zu können. Mittels Z-Score kann die Proteinexpression bezogen auf Mittelwert und Standardabweichung (SD) interpretiert werden.[44]

3.7.1.2 Volcano-Plot

Volcano-Plots sind eine der Möglichkeiten zur grafischen Darstellung einer differentiellen Proteinexpressionsanalyse, und tragen dazu bei, signifikant unterschiedlich exprimierte Proteine zwischen zwei Gruppen, also unseren pädiatrischen Proben und den adulten Kontrollen, zu identifizieren.[45] Dabei handelt es sich um ein Art Scatterplot bzw. ein Streudiagramm, das auf der x-Achse die logarithmischen Faltungsraten (*Fold Changes,* $\log_2$FC) zwischen den zwei Gruppen und auf der y-Achse die negativ dekadischen, logarithmischen p-Werte (-log10*p*) für die einzelnen Proteinexpressionen darstellt. Die einzelnen Punkte innerhalb des Volcano-Plots repräsentieren jeweils ein Protein.[46]

Punkte, die weit rechts oder links liegen, weisen einen hohen *Fold Change* auf und gelichzeitig zeichnen sich Punkte, die weiter oben innerhalb des Plots liegen, durch einen niedrigeren p-Wert aus. Demnach repräsentieren ebendiese Punkte im Volcano-Plot Proteine, die besonders relevant sind, da sie signifikant unterschiedlich exprimiert werden. Befinden sich die Punkte nahe der x-Achse, weisen also einen hohen p-Wert auf und liegt der *Fold Change* nahe bei 0, gelten die beobachteten Veränderungen als statistisch nicht signifikant.

3.7.1.3 Principle Component Analysis

Im Rahmen von Proteomanalysen werden Hauptkomponentenanalysen oder *Principal Component Analysis* (PCA) eingesetzt, um die Vielzahl der gemessenen Daten sinnvoll zu visualisieren und die komplexen Daten besser interpretieren zu können. Hierbei dient die PCA der Reduktion der Dimensionalität eines Datensatzes. Das Prinzip der PCA besteht darin, die Variabilität innerhalb eines Datensatzes so zu transformieren, dass diese auf zwei linear unabhängige Variablen, die Hauptkomponenten (*principal components*), reduziert wird.

Dadurch wird die Darstellung des Datensatzes vereinfacht und das Erkennen von Mustern oder Trends kann erleichtert werden. Die Richtung der Achsen in der PCA wird durch die Hauptkomponenten festgelegt. Die erste Hauptkomponente (PC1) gibt die Richtung der

Größten Varianz im Datensatz an und beschreibt somit die Dimension mit der höchsten Datenstreuung. Die zweite Hauptkomponente (PC2) zeigt die zweitgrößte Varianz an und steht senkrecht zu PC1. Somit entsprechen die Hauptkomponenten innerhalb der PCA den Eigenvektoren mit den größten Eigenwerten.[45,47] Zur besseren Darstellung der einzelnen Proben in Bezug auf klinische Variablen erfolgte in dieser Arbeit zudem eine Einfärbung für die eGFR der Proband*innen bzw. Kontrollproband*innen.

3.7.1.4 Gene Set Enrichment Analysis

Die Gen-Set-Anreicherungsanalyse (*Gene Set Enrichment Analysis*, GSEA) ist eine wichtige bioinformatische Methode der Gen-Set-basierten Datenanalyse. Sie ermöglicht die Ableitung von Ergebnissen aus Genexpressionsdaten auf der Ebene von Gen-Sets. Durch den Fokus auf Gen-Sets, also Gruppen von Genen, die gemeinsame biologische Funktionen, chromosomale Lokalisierungen oder Regulationsmechanismen teilen, ist diese Methode äußerst effektiv, um biologische Zusammenhänge im Rahmen der Datenanalyse besser interpretieren zu können. Die Definition von Gen-Sets erfolgt anhand vorheriger biologischer Erkenntnisse, wie beispielsweise veröffentlichter biochemischer Signalwegdaten oder anderer koexpressiver experimenteller Daten.[48] Der Sinn der GSEA besteht darin, übergeordnete Trends in den umfangreichen Listen von Genen oder Proteinen zu identifizieren, die durch bioinformatische Analysen generiert werden.[49]

Gene Ontology (GO) und die *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) sind hierbei zwei der möglichen Ressourcen, die zur funktionellen Interpretation von Proteinen oder Genen dienen können. Bei der GSEA können sowohl GO-Terms als auch KEGG-*Enrichments* verwendet werden, um den biologischen Kontext und eventuelle funktionelle Aspekte von Gen- bzw. Proteinexpressionsdaten zu interpretieren.

3.7.1.4.1 GO-Enrichment

Bei der *Gene Ontology* (GO)-Datenbank handelt es sich um eine standardisierte Nomenklatur, die im Jahr 2000 von der GO-Organisation entwickelt wurde. Sie umfasst hierbei drei hauptsächliche Kategorien: zelluläre Komponenten (*cellular component*, CC), molekulare Funktionen (*molecular function*, MF) und biologische Prozesse (*biological process*, BP). Die GO-Datenbank gilt als eine der am weitesten verbreiteten Ressourcen für die funktionelle Annotation von Genen und ermöglicht daher eine sehr detaillierte Beschreibung von Genprodukten, einschließlich Proteinen.[50] Das Vokabular der GO besteht aus >38.000 präzisen Begriffen, die als GO-Terme bzw. -*Terms* bezeichnet werden und die molekularen

Aktionen von Genprodukten, die biologischen Prozesse dieser, sowie die zellulären Lokalisationen, in denen sie sich befinden, beschreiben.[51]

3.7.1.4.2 KEGG-Enrichment

Die *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, oder KEGG, ist eine umfassende Datenbank, die sich auf die systematische Analyse von Genfunktionen und genomischen Informationen spezialisiert hat. In ihr integriert sind genomische, biochemische und phylogenetische Daten, die zum umfassenden Verständnis von Funktionen und verschiedenen Eigenschaften biologischer Systeme beitragen sollen. Forscher nutzen diese Datenbank, um die Gesamtheit der Gen- und Expressionsinformationen zu analysieren. Die KEGG-*Enrichments* im Rahmen von *Enrichment*-Analysen basieren auf den KEGG-Signalwege, welche umfassende Informationen über molekulare Interaktionen, Reaktionen und Beziehungen beinhalten und einen Aufschluss darüber geben, wie Gene und Proteine in den verschiedensten zellulären Prozessen miteinander interagieren.[50]

4 Ergebnisse

4.1 Klinische Merkmale der untersuchten Kohorte

In dieser Pilotstudie konnten Urinproben von 14 pädiatrischen nierentransplantierten Proband*innen gesammelt werden, die uns im Rahmen unserer Analysen einen ersten Einblick über das Proteom aus suEVs im Kindesalter verschaffen konnten.

Als Kontrollproben im Zuge dieser Arbeit dienten Daten über das Proteom von suEVs aus dem Urin acht nierentransplantierter Erwachsener, die uns freundlicherweise durch die Klinik II für Innere Medizin zur Verfügung gestellt wurden.

4.1.1 Klinische Charakteristika der pädiatrischen Proband*innen (KNTx)

Von den insgesamt 14 pädiatrischen Proband*innen (KNTx), die in der kindernephrologischen Ambulanz rekrutiert wurden, war der Abstand zwischen der Nierentransplantation und dem Zeitpunkt der Urinprobe insgesamt sehr heterogen mit einem Median von 42,33 Monaten (Interquartilsabstand IQR = 69,83 Monate) und einem Minimum von 6 Monaten bzw. einem Maximum von 191 Monaten.

Die Proband*innen waren im Median 13 Jahre alt (IQR = 9 Jahre), wobei der jüngste Patient zum Zeitpunkt der Probenabgabe drei Jahre alt war und der älteste Patient 27 Jahre alt. Mehr als die Hälfte der Patient*innen waren mit ca. 57 % männlichen Geschlechts und ca. 43 % der Patient*innen waren weiblichen Geschlechts. Im Median waren die Proband*innen 142 cm groß (IQR = 45,75 cm) und die Größe erstreckte sich zwischen 90 cm und 175 cm. Das Gewicht lag bei einem Median von 37,45 kg (IQR = 33,35 kg); hier variierte der Bereich zwischen 33,4 kg und 77,6 kg.

Bei rund zwei Drittel (≈64%) der Patient*innen handelte es sich bei dem Nierentransplantat um eine Verstorbenenspende; die restlichen Patient*innen (≈36%) erhielten eine Lebendnierenspende.

Bei ca. 57% (n = 8) der pädiatrischen Patient*innen lag eine Erkrankung vor, die dem CAKUT-Formenkreis zugeordnet werden konnte. Die anderen 43% der Proband*innen (n = 6) hatten andere Grunderkrankungen (zystisch oder glomerulär).

Der Median des Kreatininwerts der Proband*innen lag bei 1,12 mg/dl (IQR = 0,524 mg/dl). Die eGFR nach der FAS-Formel lag im Median bei 62,5 ml/min/1,73 m^2 (IQR = 27,75 ml/min/1,73 m^2).

Die Hälfte der Patient*innen verwendete als immunsuppressive Medikation eine Kombination aus Tacrolimus / Mycophenolat-Mofetil (MMF). Die restlichen 50% der Proband*innen nahmen unterschiedliche Medikamente bestehend aus Kombinations- oder

Monotherapien ein. Zu den verschiedenen Präparaten gehörten hierbei Tacrolimus, Ciclosporin A, Everolimus, MMF und Azathioprin. 50% der Patient*innen nahmen bei Probenabgabe außerdem ein Prednisolonpräparat ein. Außerdem nahmen von den Proband*innen 71% (n = 10) zum Zeitpunkt der Urinabgabe einen ACE-Hemmer (*Angiotensin Converting Enzyme*-Hemmer) oder einen AT1-Blocker (*Angiotensin 1*-Blocker) ein.

Die klinischen Charakteristika der pädiatrischen Proband*innen sind nachfolgend dargestellt in Tabelle 1.

Tabelle 1: Klinische Charakteristika der pädiatrischen Proband*innen (KNTx)

Kategorie: Proband*innen (KNTx)	Subkategorie	Wert	± SD	IQR
Anzahl der Probanden (n)		14		
Geschlecht	männlich weiblich	≈57% (n=8) ≈43% (n=6)		
Alter (in Jahren)	Median Mittelwert	13 12,36	 ±6,39	9
Größe in cm	Median Mittelwert	142 139,07	 ±25,71	45,75
Gewicht in kg	Median Mittelwert	37,45 40,55	 ±20,06	33,35
Kreatinin in mg/dl	Median Mittelwert	1,12 1,11	 ±0,44	0,525
GFR nach FAS (ml/min/1,73 m2)	Median Mittelwert	62,5 61,57	 ±20,02	27,75
CKD-Stadium nach eGFR	G2 G3a andere	50% (n=7) ≈21% (n=3) ≈29% (n=4)		
Form der Transplantation	Postmortalspende (%) Lebendspende (%)	≈64% (n=9) ≈36% (n=5)		
Grunderkrankung	CAKUT andere	≈57% (n=8) ≈43% (n=6)		
Abstand zwischen Probe und Transplantation (in Tagen)	Median Mittelwert	1291 1851,5	 ±1702,75	2130
Abstand zwischen Probe und Transplantation (in Monaten)	Median Mittelwert	42,33 60,7	 ±55,83	69,83
ACE-Hemmer / AT1-Blocker	Ja (%)	71%		
Immunsuppression	Tacrolimus / MMF andere	50% (n=7) 50% (n=7)		
Prednisolon	ja (%) nein (%)	50% 50%		

4.1.2 Klinische Charakteristika der adulten Kontrollproband*innen (NTx)

Die 8 Kontrollproben aus der Klinik II für Innere Medizin (NTx) zeigen insgesamt einen kürzeren Abstand zwischen Probenentnahme und Zeitpunkt der Transplantation. Im Median lag der Abstand bei 20,5 Tagen (IQR = 340,5 Tage) wobei der kürzeste Abstand bei 11 Tagen

lag und der längste Abstand bei 460 Tagen. Die Proband*innen waren zum Zeitpunkt der Probenabgabe im Median 38,5 Jahre alt (IQR = 14,5 Jahre), mit einer Spannweite von 35 Jahren bis 66 Jahren, und auch hier waren rund zwei Drittel (62,5%) aller Patient*innen männlichen Geschlechts; 37,5% aller Proband*innen waren weiblich.

Bei 75% der Nierentransplantate handelte es sich um Lebendnierenspenden; 25% der Nieren stammten aus Verstorbenenspenden. 62,5% der Grunderkrankungen waren bei den adulten Proband*innen glomerulärer Genese (n = 5), die restlichen Patient* innen hatten Nierenerkrankungen anderer Genese (= 37,5%).

Der Kreatininwert zeigte sich zum Zeitpunkt der Probenabgabe im Median bei 1,85 mg/dl (IQR = 0,52 mg/dl). Die eGFR auf Basis der Formel nach CKD-EPI 2009 befand sich im Median bei 43 ml/min/1,73 m^2 (IQR = 0,52 ml/min/1,73 m^2).

Die Darstellung der klinischen Charakteristika der adulten Kontrollen (NTx) erfolgt nachfolgend in Tabelle 2.

Tabelle 2: Klinische Charakteristika der adulten Kontrollproband*innen (NTx)

Kategorie: Kontrollen NTx (alle)	Subkategorie	Wert	± SD	IQR
Anzahl der Kontrollen (n)	Gesamt	8		
Geschlecht	männlich weiblich	62,50% (n=5) 37,50% (n=3)		
Alter (in Jahren)	Median Mittelwert	38,5 43,25	 ±11,78	14,5
Kreatinin in mg/dl	Median Mittelwert	1,85 1,78	 ±0,48	0,52
GFR nach CKD-EPI (ml/min/1,73 m2)	Median Mittelwert	43 44,88	 ±12,52	17,25
CKD-Stadium nach eGFR	G3a G3b andere	37,5% (n=3) 50% (n=4) 12,5% (n=1)		
Form der Transplantation	Postmortalspende Lebendspende	25% (n=2) 75% (n=6)		
Grunderkrankung	glomerulär andere	62,50% (n=5) 37,5% (n=3)		
Abstand zwischen Proben und Transplantation (in Monaten)	Median Mittelwert	0,67 5,2	 ±6,13	11,16
Abstand zwischen Proben und Transplantation (in Tagen)	Median Mittelwert	20,5 158,75	 ±186,92	340,5

4.1.2.1 Subgruppe 1: Kontrollen <1 Monat post-OP

Fünf der Kontrollproben stammten von Messungen, die weniger als einen Monat nach der Nierentransplantation durchgeführt wurden, dabei erstreckte sich der Zeitraum von minimal 11 Tagen bis maximal 21 Tagen, mit einem Mittelwert von 15,8 Tagen. Die Proband*innen dieser Subgruppe zeigten sich im Durchschnitt 41 Jahre alt. 60% der

Patient*innen erhielten ihr Nierentransplantat durch eine Lebendspende (n = 3). 80% der Grunderkrankungen waren glomerulären Ursprungs (n = 4), ein Proband hatte eine Grunderkrankung anderen Ursprungs.

4.1.2.2 Subgruppe 2: Kontrollen >1 Jahr post-OP

Drei der Kontrollproben stammten von Messungen, die ein Jahr oder länger nach Transplantation durchgeführt wurden, hierbei erstreckte sich der Zeitraum von minimal 344 Tagen bis maximal 460 Tagen, im Mittel lag der Abstand bei 397 Tagen bzw. bei 56,7 Monaten. Die Proband*innen dieser Subgruppe waren im Durchschnitt 47 Jahre alt und alle Patient*innen haben eine Lebendnierenspende erhalten.

4.2 Divergente Proteinexpressionsprofile in Urinproben nierentransplantierter Kinder gegenüber nierentransplantierten Erwachsenen

4.2.1 Vergleich der Urinproteinprofile nierentransplantierter Kinder mit denen nierentransplantierter Erwachsener

Durch Verwendung massenspektrometrischer Verfahren, war es uns im Rahmen von dieser Arbeit möglich, nach der Entfernung der *Outlier* bzw. nach Filterung der Proteomdaten insgesamt 2291 Proteine in allen Proben (KNTx und NTx) zu identifizieren.

Weiterhin konnten insgesamt 1869 Proteine in mindestens 50% aller pädiatrischen Proben (KNTx) identifiziert werden. Mit dieser Proteinliste wurden jeweils ein GO- und ein KEGG-*Enrichment* durchgeführt, wobei das gesamte Genom den Hintergrund für die *Enrichment*-Analysen darstellte.

4.2.2 Differentielle Proteinexpressionsmuster in Urinproben nierentransplantierter Kinder versus nierentransplantierter Erwachsener

Im Rahmen der differentiellen Analysen zwischen KNTx und NTx konnten insgesamt 30 Proteine identifiziert werden, die sich bei einem adjustierten p-Wert von <0,05 signifikant unterschiedlich exprimiert zeigten. Darüber hinaus führten wir mit den Proben und den einzelnen Subgruppen der Kontrollen (NTx <1 Monat bzw. NTx >1 Jahr) zusätzlich differentielle Analysen durch.

Es zeigten sich für den Vergleich KNTx vs. NTx <1 Monat 168 Proteine mit einem adjustierten p-Wert von <0,05 signifikant unterschiedlich exprimiert. Die Analyse von KNTx vs. NTx >1 Jahr ergab keinen Nachweis von signifikant unterschiedlich exprimierten Proteinen. Im Anschluss an die differentiellen Analysen zwischen den Proben (KNTx) sowie den

Kontrollen bzw. Subgruppen, konnten ebenso *Enrichment*-Analysen durchgeführt werden.

4.3 Funktionelle und prozessbezogene Zusammenhänge von Proteinen mit unterschiedlichen Expressionsmustern in Urinproben nierentransplantierter Kinder versus nierentransplantierter Erwachsener

Wie zuvor bereits erwähnt, konnten im Rahmen der Proteinanalysen 2291 Proteine identifiziert werden. Von diesen gemessenen Proteinen konnten 1869 in mindesten 50% aller Kinderproben, also in 7 von 14 der KNTx-Proben, nachgewiesen werden. Mit ebendiesen Proteinen wurde im Verlauf ein GO- sowie ein KEGG-*Enrichment* durchgeführt.

Hierbei zeigten sich im Rahmen des GO-*Enrichments* insgesamt 3111 Signalwege, von denen 2278 bei einem adjustierten p-Wert von <0,05 statistisch signifikant angereichert sind. Es ist davon auszugehen, dass viele biologische Prozesse, molekulare Funktionen oder zelluläre Komponenten mit den hier untersuchten Proteinen assoziiert sind und von biologischer Relevanz sein könnten.

Darüber hinaus führten wir ein KEGG-*Enrichment* durch, in dem sich 68 der 319 Signalwege mit einem adjustierten p-Wert von <0,05 statistisch signifikant angereichert zeigten.

4.4 Vergleich der Proteinexpressionsprofile von KNTx versus NTx mittels hierarchischer Clusteranalyse

Hierarchisches Clustering im Rahmen der differentiellen Analyse aller gemessenen Proteine in KNTx und NTx mittels *Heatmaps* zeigte eine Tendenz, dass pädiatrische Proben vs. adulte Kontrollen dazu neigten, zu clustern (Abbildungen 2a und 2b). Proben in einer *Heatmap* clustern typischerweise, wenn ähnliche Muster oder Trends in den Daten auftreten, die eine Gruppierung oder Zusammenfassung der Proben nahelegen. Dies könnte bedeuten, dass Proben mit ähnlichen Eigenschaften oder Reaktionen auf bestimmte Bedingungen existieren. *Clustering* in einer *Heatmap* zeigt sich durch zusammenhängende Gruppen von Proben, die ähnliche Farbmuster als Repräsentation von relativen Expressionsunterschieden aufweisen

Die Z-Score transformierte *Heatmap* wurde unter anderem verwendet, um die relative Proteinexpression zwischen den Proben zu vergleichen. So können Unterschiede in der Baseline-Expression zwischen den Proben berücksichtigt werden (Abbildung 2b). Die pädiatrischen Proben zeigen vor allem in der *Heatmap* mit den rohen Proteinintensitäten ein Clustering und weisen ein ähnliches Profil auf (Abbildung 2a).

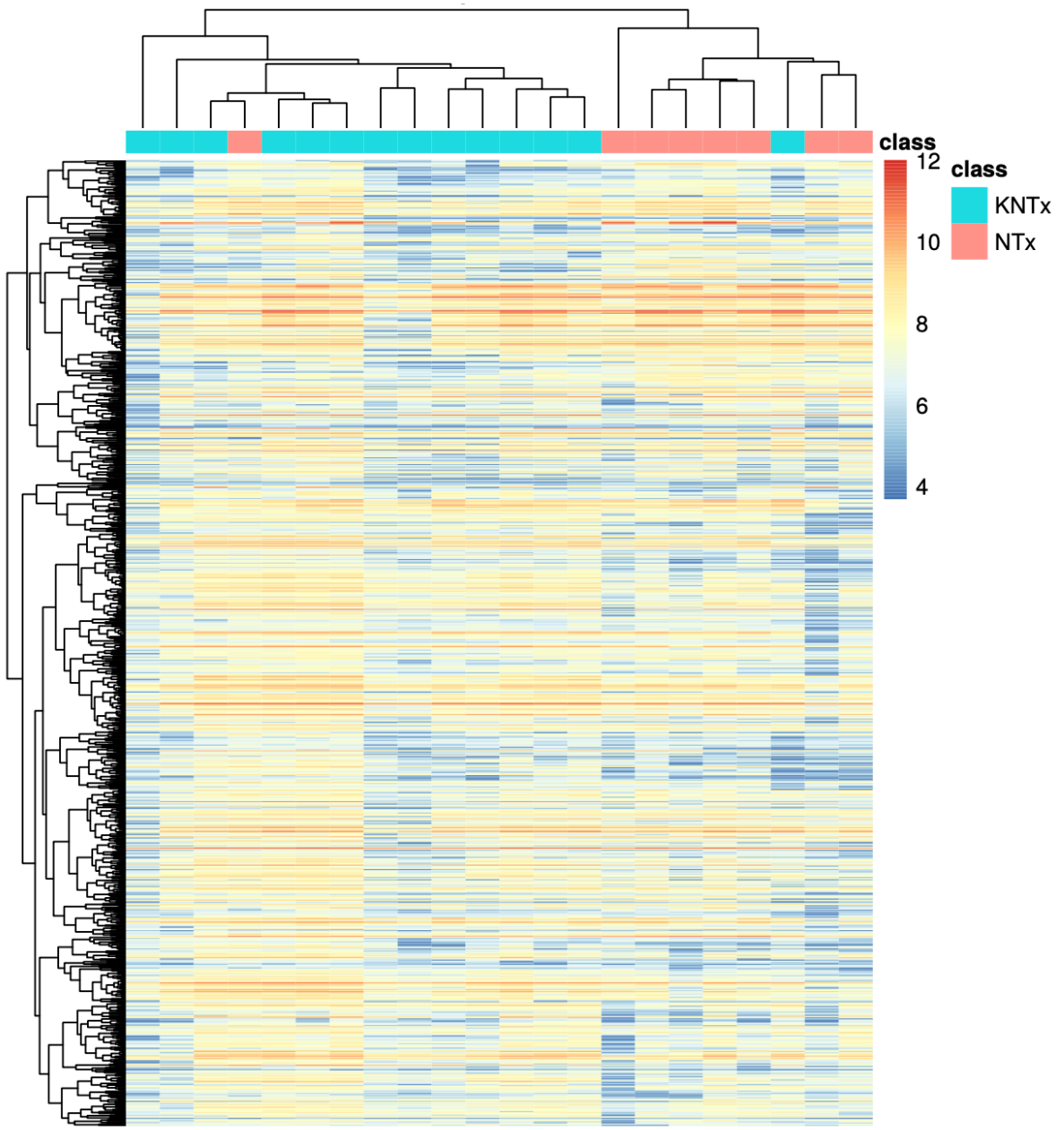


Abbildung 2a: Heatmap mit den rohen Proteinintensitäten in KNTx vs. NTx

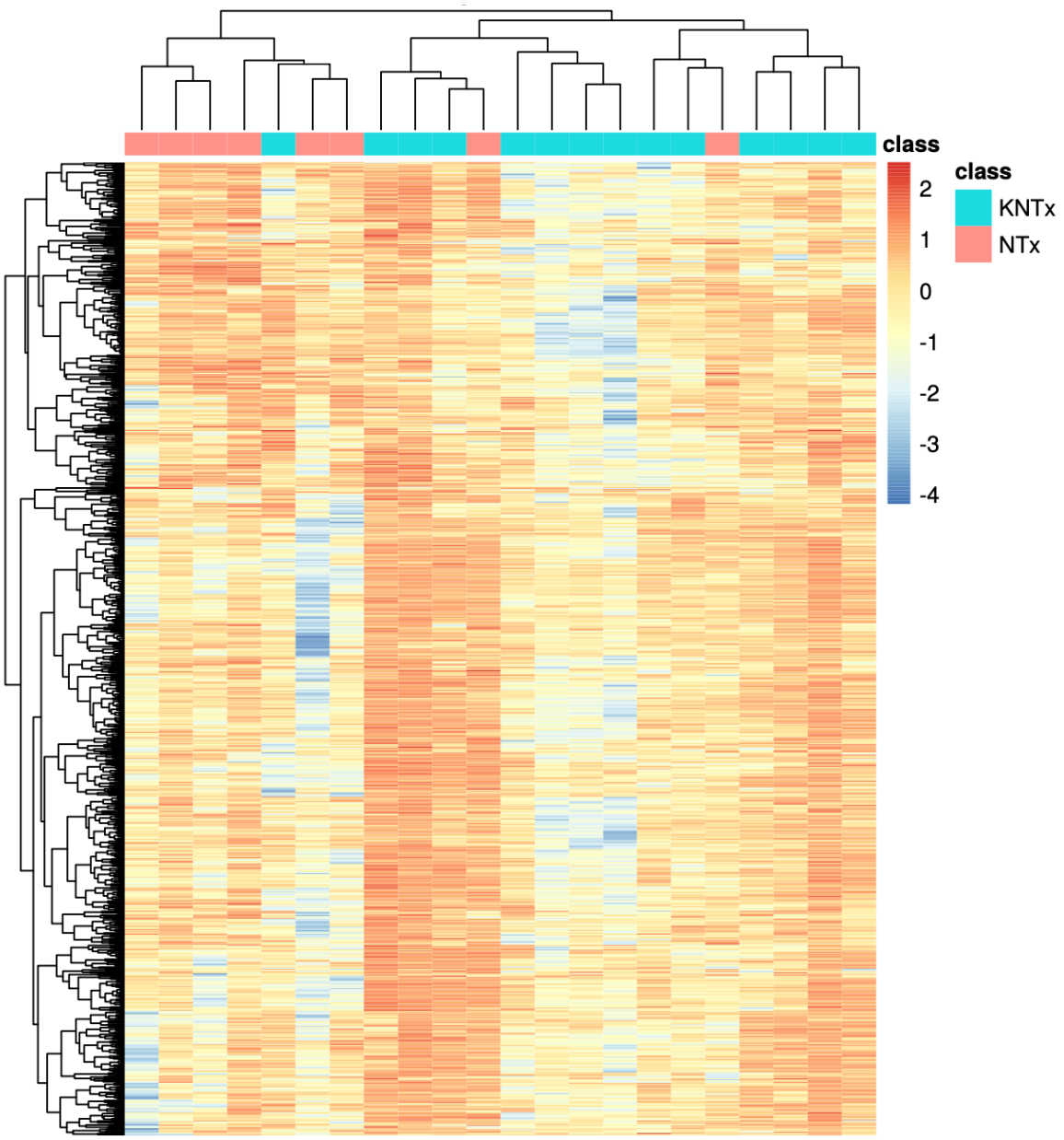


Abbildung 2b: Heatmap mit den Z-Scores der Proteinintensitäten in KNTx vs. NTx

Abbildungen 2a und 2b: Hierarchisches Clustering der Proteinintensitäten von KNTx vs. NTx auf Basis roher (Abbildung 2a) und Z-Score-transformierter (Abbildung 2b) Werte. Das Clustering gruppiert Proben mit ähnlichen Proteinexpressionsmustern, wobei die pädiatrischen Proben insbesondere in den Rohdaten deutlich zusammenliegen. In Abbildung 2a repräsentieren die Farben die absoluten Proteinintensitäten, sodass rot höhere und blau niedrigere Messwerte anzeigt. In Abbildung 2b zeigt die Farbgebung relative Veränderungen in der Proteinexpression. Werte oberhalb des Durchschnitts werden rot dargestellt, Werte unterhalb stellen sich blau dar. Die Farbgebung zeigt relative Veränderungen in der Proteinexpression.

4.5 PCA aller pädiatrischen versus adulten Urinproben (KNTx vs. NTx)

Die Durchführung der PCA erfolgte zur Reduktion der Dimensionalität unserer Daten, indem die Transformation in ein neues Koordinatensystem dabei Aufschluss über die größtmögliche Variation geben soll. Die erste Hauptkomponente gibt die größte Variation innerhalb der Daten an, gefolgt von der zweiten Hauptkomponente.

Die dicken Punkte innerhalb der PCA markieren die Schwere der Punktwolke, wobei diese sich auf die Streuung oder Verteilung der Datenpunkte in dem Koordinatensystem bezieht. Dicht gepackte Punkte, wie in unserer nachfolgenden Abbildung, bezeichnen eine „schwere“ Punktwolke, welche entlang einer Hauptkomponente auf eine hohe Varianz in diese Richtung hinweist. Schwere Punktwolken bedeuten somit eine starke Streuung und weisen also auf relevante Informationen in die entsprechende Richtung hin. Die Hauptkomponente 2 in unseren Analysen bildet gute Kinder- vs. Erwachsenenproben ab (Abbildung 3a).

Darüber hinaus erfolgte die Einfärbung der Punkte unserer PCA mit der eGFR der Proband*innen zum Zeitpunkt der Probenabnahme. Es lässt sich vermuten, dass unter anderem die eGFR der pädiatrischen Patient*innen eher im Bereich 60 – 80 ml/min liegt. Die Erwachsenen Proband*innen zeigen eher niedrigere eGFR-Werte mit <40 – 60 ml/min (Abbildung 3b).

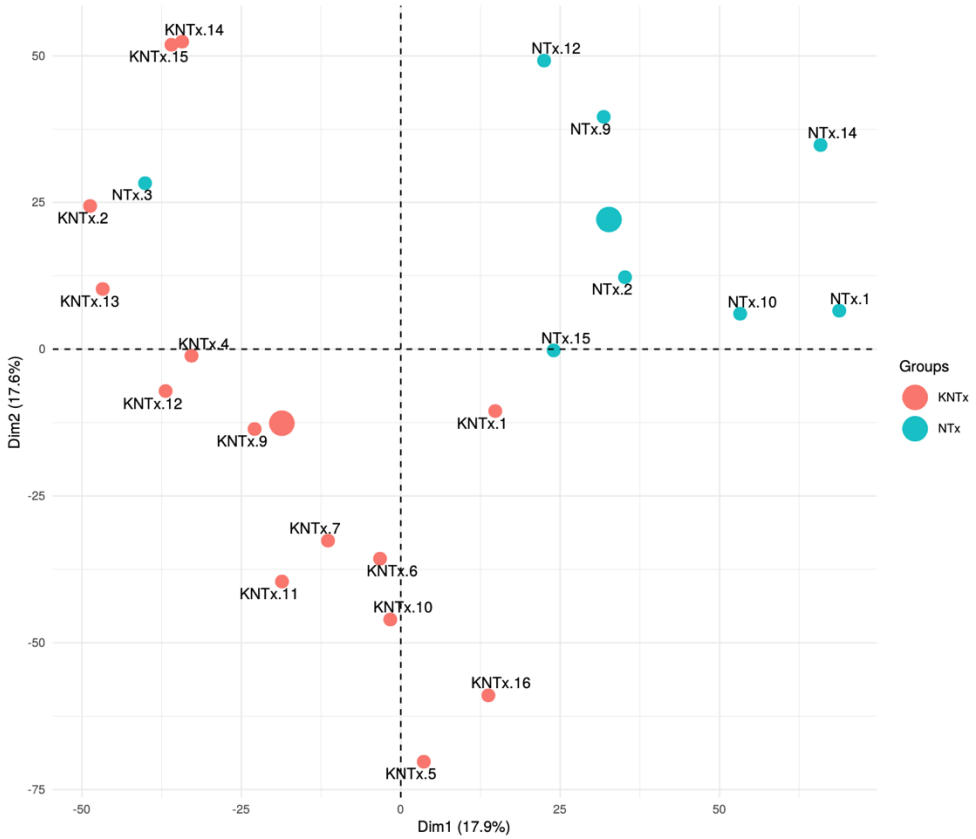


Abbildung 3a: PCA ohne Einfärbung der eGFR (KNTx vs. NTx)

Hier zeigt sich eine gute Trennung der pädiatrischen versus adulten Urinproben. Die dicken Punkte markieren jeweils den Schwerpunkt der jeweiligen Punktwolke.

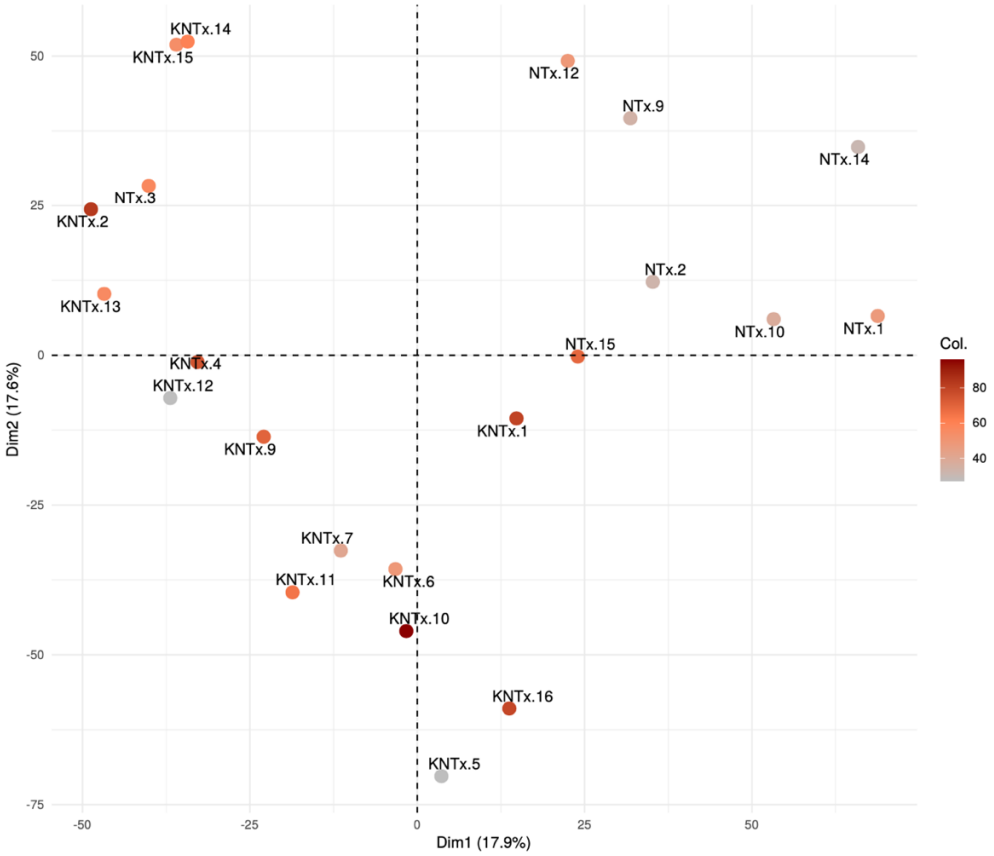


Abbildung 3b: PCA mit Einfärbung der eGFR (KNTx vs. NTx)

Es zeigt sich eine gute Abgrenzung zwischen den pädiatrischen Proben und den adulten Kontrollproben.

4.5.1 Pearson-Korrelationsanalyse der eGFR mit den ersten beiden Hauptkomponenten PC1 und PC2

Um besser erkennen zu können, ob die eGFR mit einer der Hauptkomponenten korreliert, wurden Hauptkomponente 1 und Hauptkomponente 2 jeweils mit der eGFR geplottet. Die Korrelationsanalysen erfolgten nach Pearson. Es stellte sich hierbei heraus, dass beide Korrelationen mit vordefinierten p-Wert von <0,05 nicht signifikant sind. Die Pearson-Korrelationsanalyse zeigte einen Trend zwischen der ersten Hauptkomponente (PC1) und der eGFR, wobei der Zusammenhang bei einem p-Wert von 0,0786 statistisch nicht signifikant war (Abbildung 4a). Bei PC2 ist bei einem p-Wert von 0,5513 auch kein Trend erkennbar (Abbildung 4b).

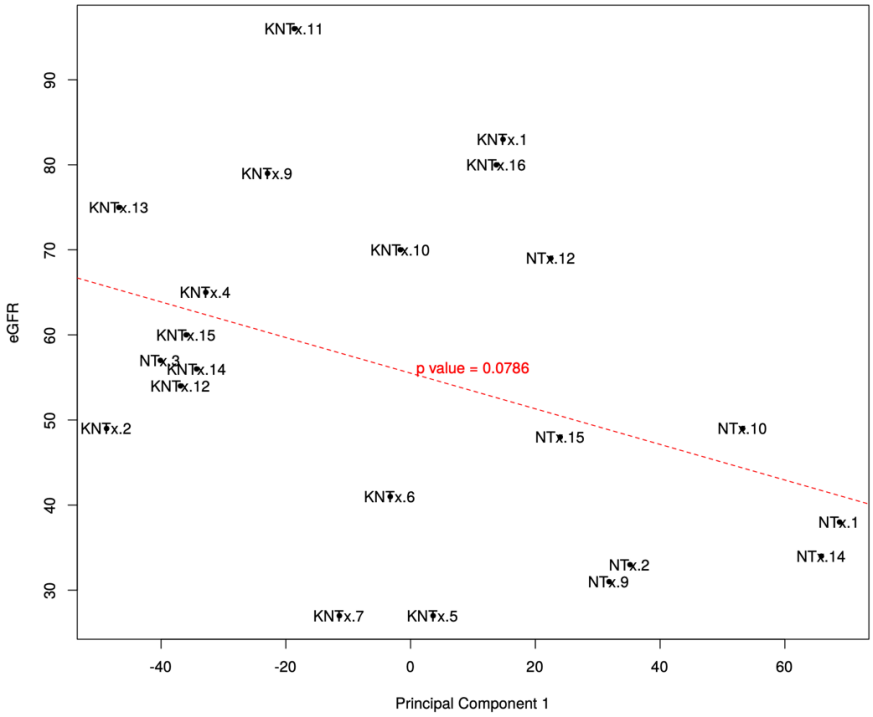


Abbildung 4a: Pearson-Korrelationsanalyse von PC1 mit der eGFR

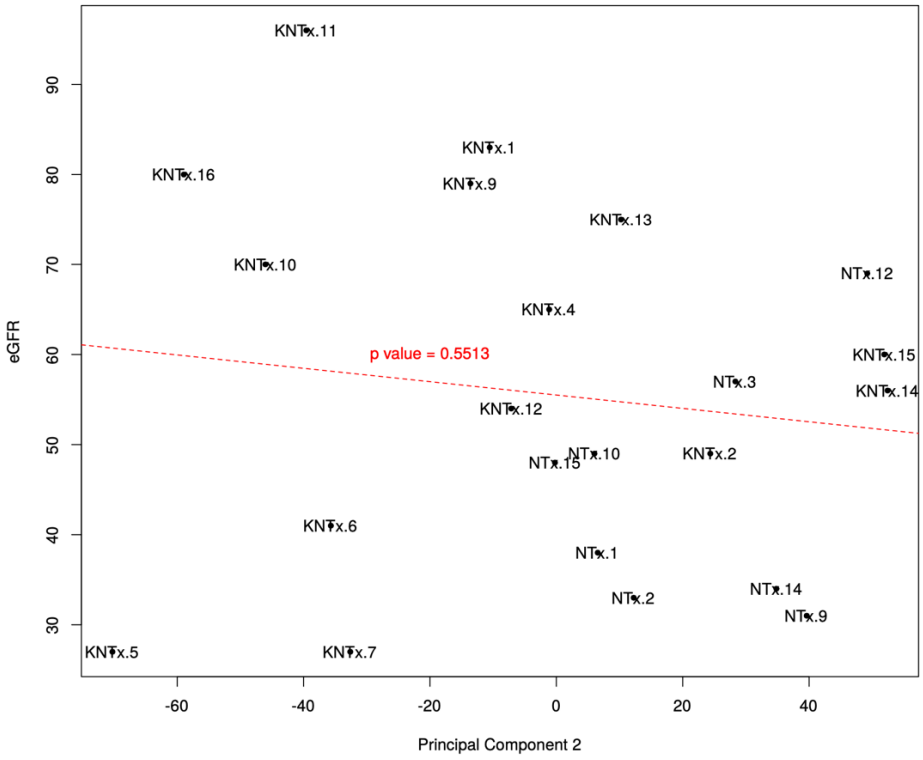


Abbildung 4b: Pearson-Korrelationsanalyse von PC2 mit der eGFR

Abbildungen 4a und 4b: Um Korrelationen zwischen den Hauptkomponenten mit der eGFR zu erkennen, erfolgte eine Korrelationsanalyse nach Pearson mit PC1 und PC2. Es konnte keine Korrelation zwischen den erste beiden Hauptkomponenten (PC1 und PC2) und der eGFR gezeigt werden.

4.6 Analyse der differentiell exprimierten Proteine in den pädiatrischen versus adulten Urinproben (KNTx vs. NTx)

Wie oben bereits beschrieben, konnten wir im Rahmen der differentiellen Analysen zwischen den Proben KNTx und den Kontrollen NTx insgesamt 30 signifikant unterschiedlich exprimierte Proteine bei einem adjustierten p-Wert von <0,05 identifizieren. Die Liste dieser Proteine befindet sich nachfolgend abgebildet. Hierbei sind zur vereinfachten Darstellung die UniProt-ID zur Identifikation des Proteins, der logarithmische *Fold-Change* für jedes einzelne Protein, der adjustierte p-Wert (adj.P.Val), der Genname für das Protein (ext_gene) und der Name des Proteins aufgelistet (Tabelle 3).

Zur besseren Darstellung der im Zuge der differentiellen Analysen ermittelten Proteine und zur besseren Visualisierung der signifikanten Unterschiede in der Proteinexpression erstellten wir Volcano Plots. Es wird hier die Beziehung zwischen der statistischen Signifikanz (adjustierter p-Wert) und der biologischen Relevanz (*Fold-Change*) für jedes einzelne Protein abgebildet. Der negative dekadische Logarithmus des p-Werts ($-\log_{10}p$) ist auf der y-Achse aufgetragen. Der logarithmische *Fold Change* ($\log_2FC$) stellt sich auf der x-Achse dar (Abbildung 5).

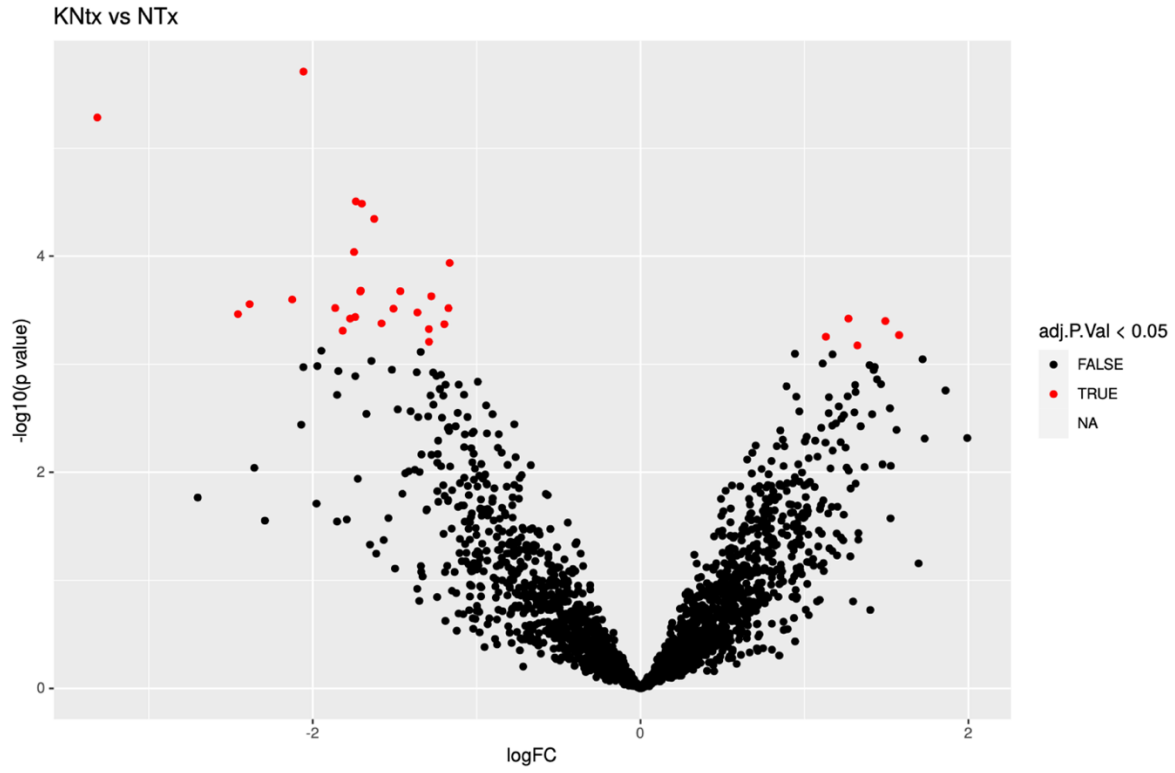


Abbildung 5: Volcano Plot der differentiell exprimierten Proteine in KNTx vs. NTx

Die rot markierten Proteine sind signifikant unterschiedlich exprimiert (adjustierter P-Wert < 0.05). Das sind insgesamt 30 Proteine. Der negative dekadische Logarithmus des p-Werts ($-\log_{10}p$) ist auf der y-Achse aufgetragen. Der logarithmische *Fold Change* ($\log_2FC$) stellt sich auf der x-Achse dar

Tabelle 3: Signifikant unterschiedlich exprimierte Proteine in der differentiellen Analyse von KNTx vs. NTx

UniProt ID	logFC	adj.P.Val	ext_gene	Protein
P21333	-2.05710345402801	0.00427064277074959	FLNA	Filamin-A
Q15149	-3.31412293142581	0.00568134154701504	PLEC	Plectin
P05388	-1.73738274823518	0.0179509349336695	RPLP0	Large ribosomal subunit protein uL10
Q7Z406	-1.70079226687974	0.0179509349336695	MYH14	Myosin-14
P35998	-1.62546843702149	0.0198537600858546	PSMC2	26S proteasome regulatory subunit 7
P31146	-1.74822791118826	0.0335174200328772	CORO1A	Coronin-1A
Q9HDC9	-1.16509874049373	0.0362533068617775	APMAP	Adipocyte plasma membrane-associated protein
P04843	-2.12529084265106	0.0389923110466533	RPN1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1
P05107	-2.38539650571688	0.0389923110466533	ITGB2	Integrin beta-2
P05783	-1.58091600864383	0.0389923110466533	KRT18	Keratin, type I cytoskeletal 18
P08729	-1.77242852428826	0.0389923110466533	KRT7	Keratin, type II cytoskeletal 7
P18124	-1.74109511048979	0.0389923110466533	RPL7	Large ribosomal subunit protein uL30
P23396	-1.71006850409344	0.0389923110466533	RPS3	Small ribosomal subunit protein uS3
P26640	-1.36196022793745	0.0389923110466533	VARS1	Valine--tRNA ligase
P32189	1.26849507099797	0.0389923110466533	GK	Glycerol kinase
P32969	-1.19790525419583	0.0389923110466533	RPL9	Large ribosomal subunit protein uL6
P46779	-1.50801685100673	0.0389923110466533	RPL28	Large ribosomal subunit protein eL28
P51659	-1.86334908324161	0.0389923110466533	HSD17B4	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2
P62753	-1.27704921052903	0.0389923110466533	RPS6	Small ribosomal subunit protein eS6
P62913	-1.46645004080967	0.0389923110466533	RPL11	Large ribosomal subunit protein uL5
Q09666	-2.4564827265225	0.0389923110466533	AHNAK	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK
Q12923	1.49379441421693	0.0389923110466533	PTPN13	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 13
Q13268	-1.70722822553654	0.0389923110466533	DHRS2	Dehydrogenase/reductase SDR family member 2, mitochondrial
Q9Y2Q3	-1.17221801518052	0.0389923110466533	GSTK1	Glutathione S-transferase kappa 1
P53621	-1.81759347857877	0.0413763238564415	COPA	Coatomer subunit alpha
Q07020	-1.29192165669679	0.0413763238564415	RPL18	Large ribosomal subunit protein eL18
Q86YZ3	1.57713055870047	0.0436507315160726	HRNR	Hornerin
Q99571	1.13070685959621	0.0436507315160726	P2RX4	P2X purinoceptor 4
P39023	-1.29107252020121	0.0468867299999875	RPL3	Large ribosomal subunit protein uL3
P15907	1.32314701886475	0.0490200012806313	ST6GAL1	Beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1

4.6.1 Enrichment-Analysen auf Basis von KEGG und GO für KNTx vs. NTx

Für den Vergleich der Proteinexpressionen zwischen KNTx und NTx erfolgte eine Gene Set *Enrichment* Analyse mittels KEGG und GO. Der *Enrichment*-Score gibt hierbei an, wie stark ein bestimmtes Gen-Set mit den experimentellen Daten assoziiert ist. Ein positiver *Enrichment*-Score zeigt an, dass die Gene des betreffenden Gen-Sets in den experimentellen Daten überrepräsentiert sind, während ein negativer *Enrichment*-Score darauf hinweist, dass die Gene des Gen-Sets unterrepräsentiert sind.

Insgesamt erfolgte der Nachweis von 1226 signifikanten GO-*Terms* bei einem adjustierten p-Wert von <0,05. In Abbildung 6a ist das Balkendiagramm der *Enrichment*-Analyse mittels GO dargestellt. Die dargestellten *Terms* oben bzw. unten in der Grafik zeichnen sich jeweils als Top 20 mit den positivsten bzw. negativsten *Enrichment Score*

innerhalb der Analysen aus. In Abbildung 6b ist das Punktdiagramm der *Enrichment*-Analysen mit GO dargestellt. Die *Gene Ratio* im Punktdiagramm gibt hierbei das Verhältnis der Anzahl der differentiell exprimierten Proteine innerhalb eines bestimmten Gen-Sets zur Gesamtanzahl der Gene in diesem Gen-Set an. Je höher die *Gene Ratio* ist, desto mehr sind die Proteine innerhalb eines *Gene Sets* differentiell exprimiert. Bei den aktivierten Genen liegt die *Gene Ratio* bei mindestens 0,4 und reicht bis annähernd 1,0 (*viral budding*). Die supprimierten Gene hingegen zeigen eher geringere *Gene Ratios* von 0,2 bis maximal 0,4.

Im Rahmen der KEGG-*Enrichment* Analysen wurde nach signifikanten Signalwege mit einem adjustierten p-Wert von <0,05 gesucht. Hier zeigten sich 40 signifikante Signalwege, wobei 31 einen negativen *Enrichment*-Score und 9 einen positiven *Enrichment*-Score aufweisen. Das Balkendiagramm der signifikanten KEGG-Signalwege befindet sich nachfolgend in Abbildung 6c.

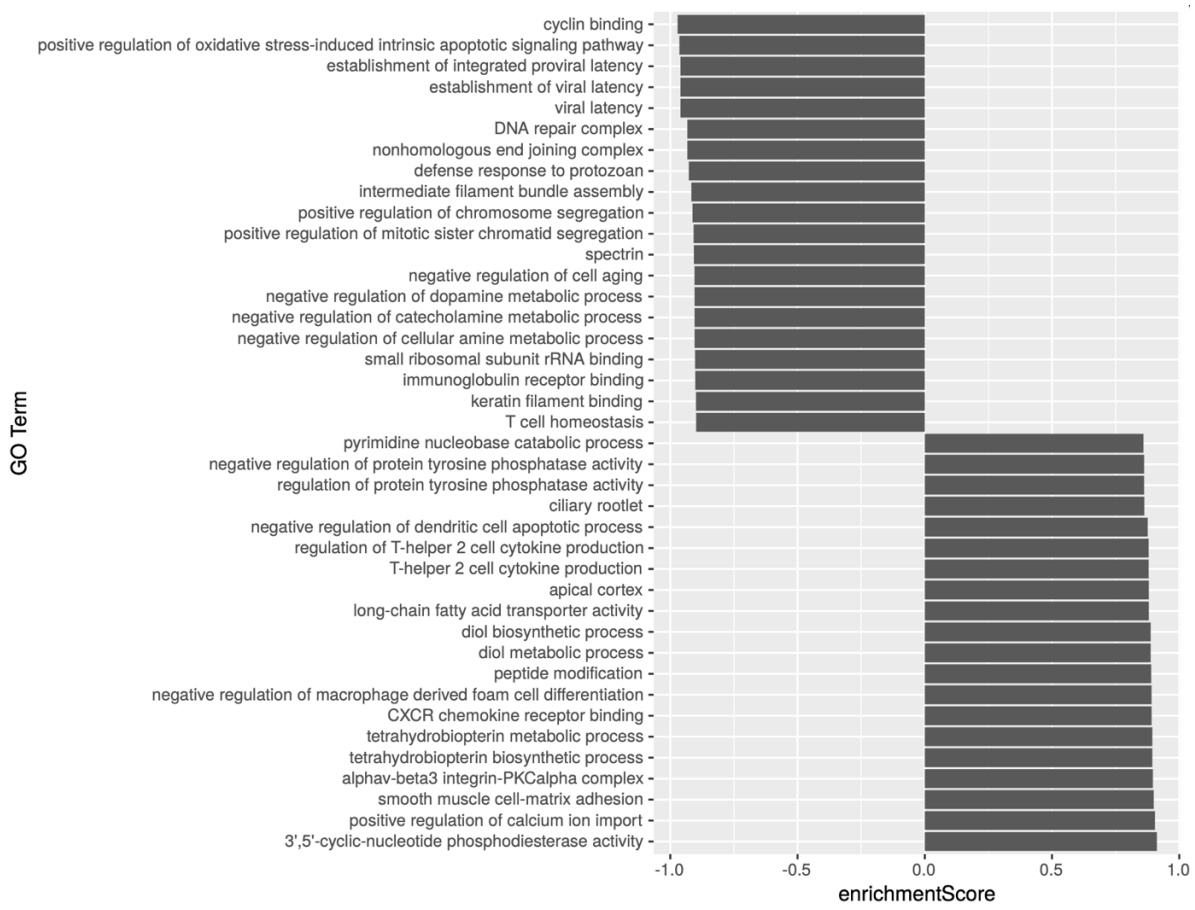


Abbildung 6a: Balkendiagramm der *Enrichment* Analyse mittels GO (KNTx vs. NTx): *cellular component* (CC), *molecular function* (MF) und *biological process* (BP)

Es zeigen sich hier jeweils die Top 20 Proteine mit dem positivsten bzw. negativsten Enrichment Score. Die GO-Terms sind also im Vergleich beider Gruppen in den pädiatrischen Daten über- bzw. unterrepräsentiert und können den unterschiedlichen Kategorien *cellular component*, *molecular function* und *biological process* zugeordnet werden.

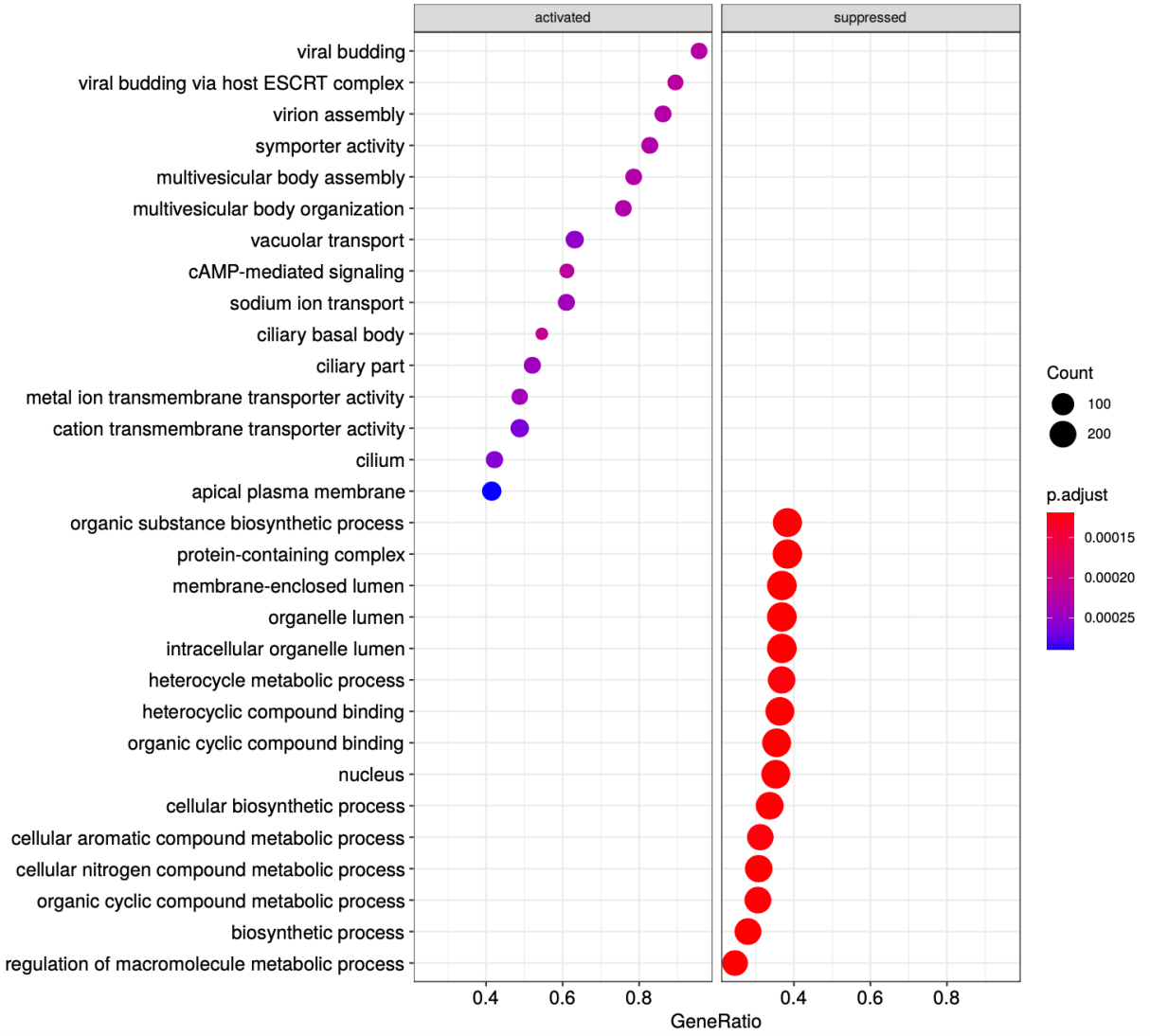


Abbildung 6b: Punktdiagramm der *Enrichment* Analyse mittels GO (KNTx vs. NTx)

Es zeigen sich jeweils die Top 15 GO-Terms mit der höchsten Gene Ratio der aktivierten bzw. supprimierten Gene Sets. Eine höhere *Gene Ratio* bedeutet, dass mehr Proteine innerhalb eines *Gene Sets* differentiell exprimiert sind. Die Terms gehören zu den unterschiedlichen Kategorien *cellular component*, *molecular function* und *biological process*.

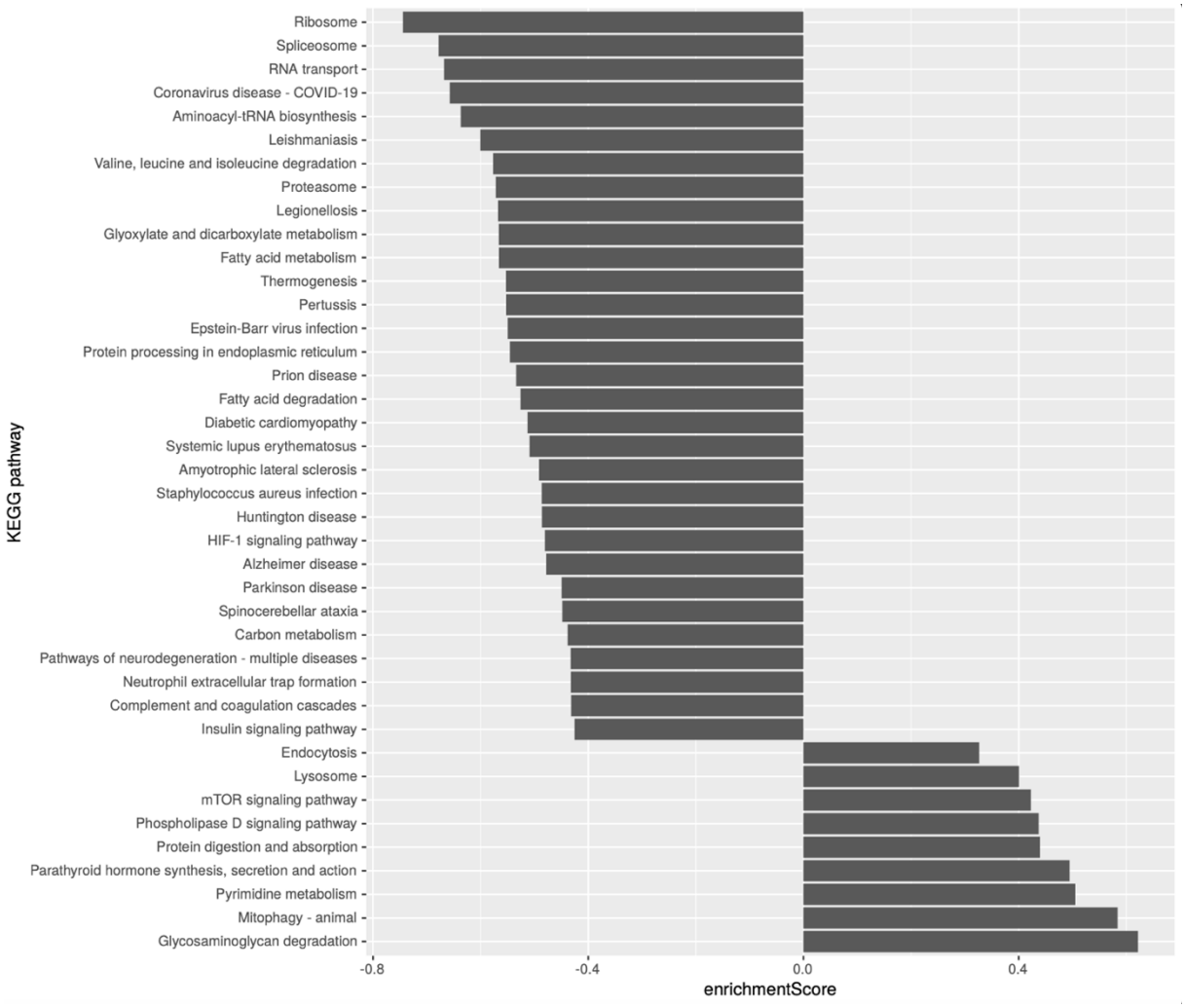


Abbildung 6c: Balkendiagramm der *Enrichment* Analyse mittels KEGG (KNTx vs. NTx)
Es zeigen sich 40 signifikante Signalwege, von denen 31 einen negativen und 9 einen positiven *Enrichment*-Score aufweisen. Die signifikanten Signalwege sind also im Vergleich beider Gruppen in den pädiatrischen Daten über- bzw. unterrepräsentiert.

4.6.2 GO-Enrichment aller vermindert bzw. vermehrt exprimierten Proteine in KNTx versus NTx

Der Fisher-Test ist eine statistische Methode, die verwendet wird, um festzustellen, ob es eine signifikante Assoziation zwischen zwei kategorialen Variablen gibt.[52] In der GO-*Enrichment*-Analyse wird der Fisher-Test verwendet, um festzustellen, ob die beobachteten differentiell exprimierten Gene in einem bestimmten GO-*Term* überrepräsentiert sind, verglichen mit der erwarteten Verteilung von Genen im gesamten Datensatz. Es wurde ein Fisher-Test separat für vermindert und vermehrt exprimierte Gene durchführt. In den nachfolgenden Abbildungen 7a und 7b sind die Balkendiagramme für das GO-*Enrichment* aller Proteine mit Nachweis vermehrter (positiv) und verminderter Expression (negativ) dargestellt.

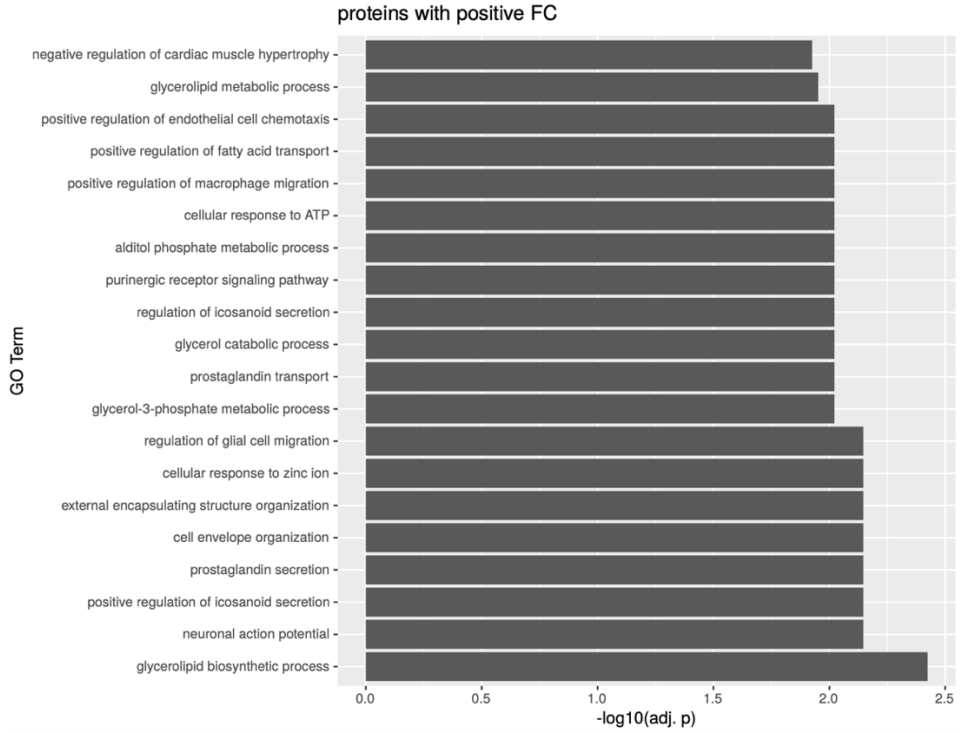


Abbildung 7a: Balkendiagramm des GO-*Enrichments* aller Proteine mit Nachweis vermehrter Expression (KNTx vs. NTx)

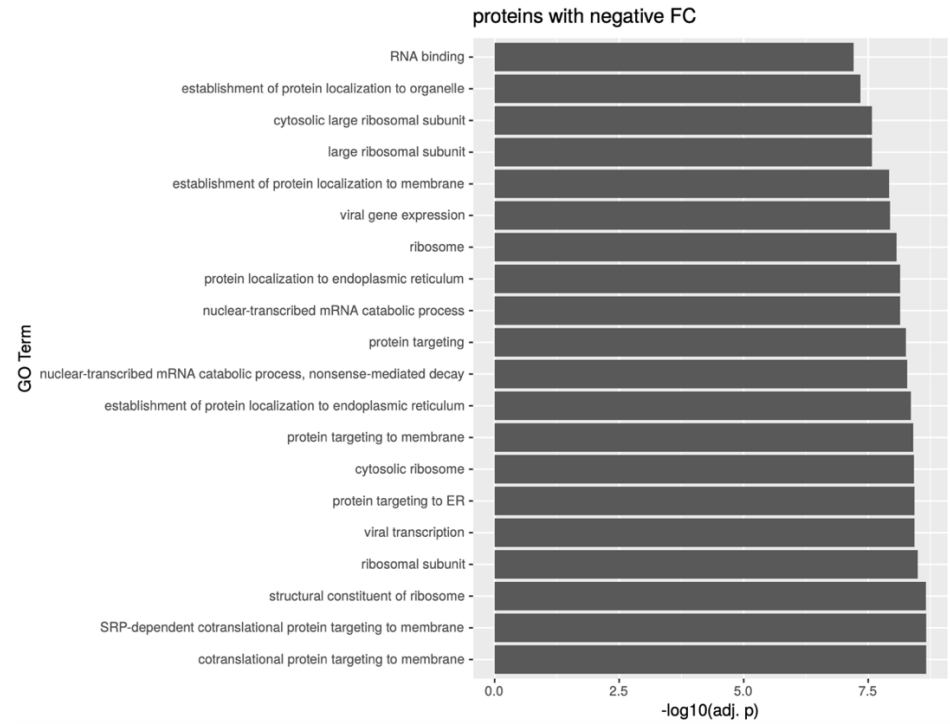


Abbildung 7b: Balkendiagramm des GO-*Enrichments* aller Proteine mit Nachweis verminderter Expression (KNTx vs. NTx)

Abbildungen 7a und 7b: GO-*Enrichment* (Fisher-Test) aller Proteine mit Nachweis vermehrter Expression (*positive*) bzw. verminderter Expression (*negative*) sowie die dazugehörigen Balkendiagramme für den Vergleich von KNTx vs. NTx.

4.7 Sub-PCAs der Kinder- versus Erwachsenenproben

Wenn ein Datensatz aus mehreren Subgruppen oder Kategorien besteht, wie es bei unseren Kontrollproben der Fall ist, kann die Durchführung separater PCAs für jede Subgruppe dabei helfen, Unterschiede zwischen den einzelnen Untergruppen zu identifizieren. Dadurch können Einblicke in die Muster innerhalb der Gruppe gewonnen werden, die im Rahmen der kollektiven Analyse möglicherweise verborgen geblieben wären.

Wir führten eine Subgruppenanalyse mittels PCA für die Kinderproben vs. Erwachsenenproben <1 Monat (*KNTx vs. NTx <1 month post-OP*), sowie für die Kinderproben vs. Erwachsenenproben >1 Jahr (*KNTx vs. NTx >1 year post-OP*) durch.

Es zeigte sich, weiterhin dass die Hauptkomponente 2 in der Subgruppenanalyse *KNTx vs. NTX <1 month post-OP* gute Kinder- vs. Erwachsenenproben abbildet (Abbildung 8a).

In der Subgruppenanalyse *KNTx vs. NTX >1 year post-OP* zeigt sich insgesamt keine gute Trennung der Kinder- vs. Erwachsenenproben. Dies kann unter anderem an der geringen Anzahl der Proben innerhalb der Subgruppe liegen, weshalb die Daten nicht ausreichend repräsentativ sind (Abbildung 8b).

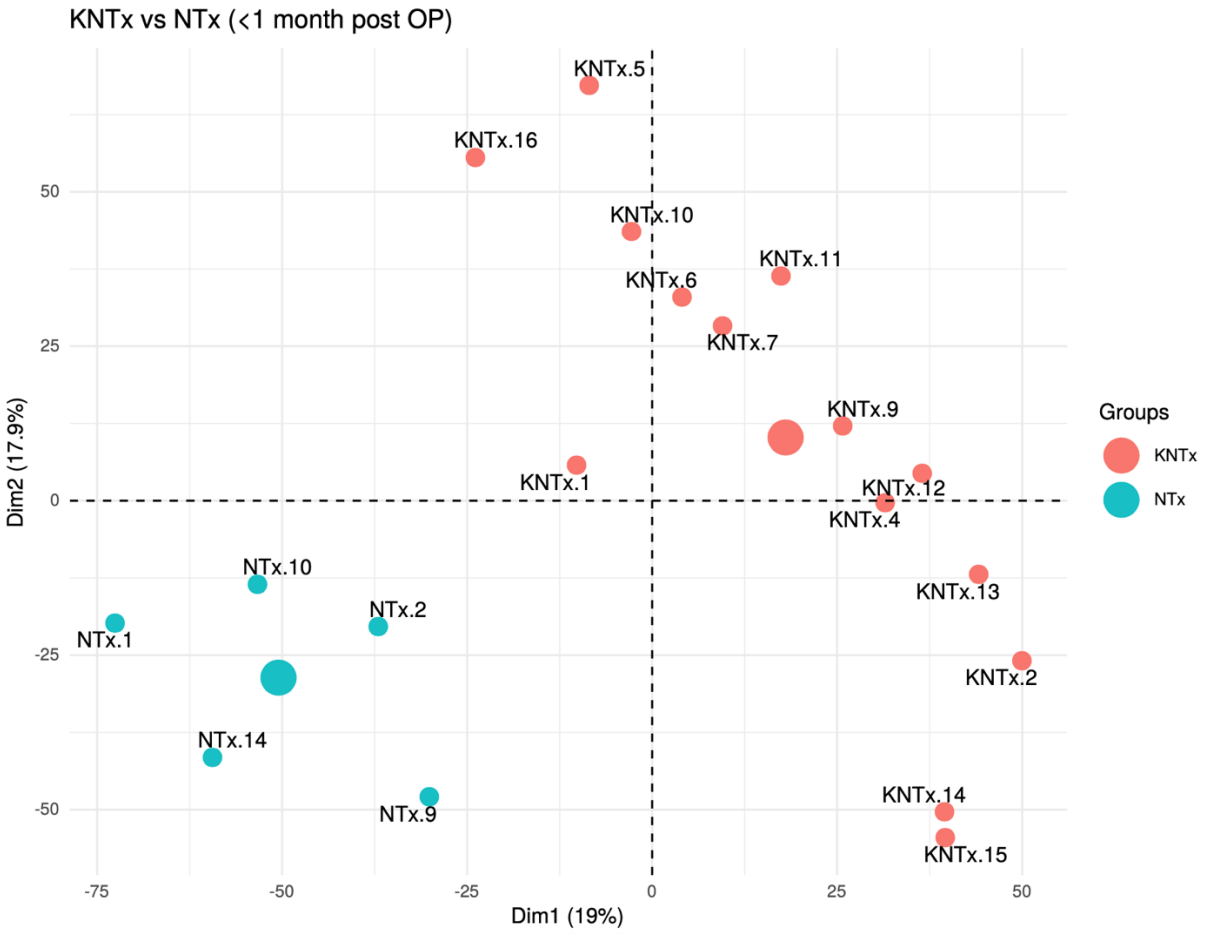


Abbildung 8a: PCA von KNTx vs. NTX <1 Monat post-OP

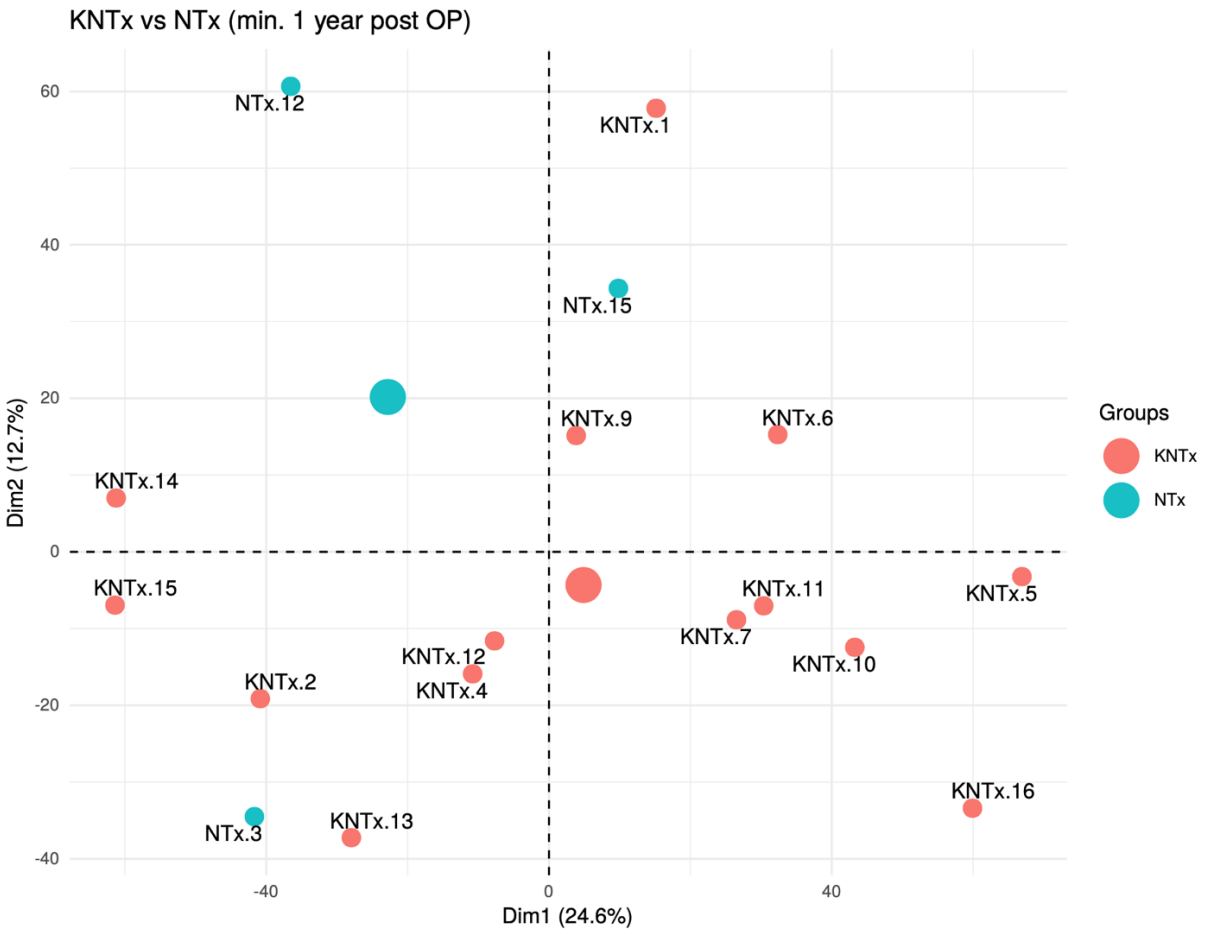


Abbildung 8b: PCA von KNTx vs. NTX >1 Jahr post-OP

Abbildungen 8a und 8b: Es zeigen sich die sub-PCAs für die Subgruppenanalyse KNTx vs. NTx <1 Monat (Abbildung 8a) und KNTx vs. NTx >1 Jahr post-OP (Abbildung 8b). In Abbildung 8a zeigt sich eine gute Trennung der Kinder- vs. Erwachsenenproben; in Abbildung 8b zeigt sich keine gute Trennung. Die dicken Punkte markieren wieder die Schwerpunkte der jeweiligen Punktwolken.

4.8 Analyse der differentiell exprimierten Proteine in KNTx vs. NTx <1 Monat post-OP

Wie oben bereits erwähnt, konnten wir im Zuge der differentiellen Analysen zwischen den Proben KNTx und der Subgruppe der Kontrollen NTx <1 Monat insgesamt 168 signifikant unterschiedlich exprimierte Proteine bei einem adjustierten p-Wert von <0,05 identifizieren.

Die Liste der signifikanten Proteine ist in der nachfolgenden Tabelle 4 abgebildet. Hier sind zur vereinfachten Darstellung die UniProt-ID zur Identifikation des Proteins, der logarithmische *Fold Change* (logFC) für jedes einzelne Protein, der adjustierte p-Wert (adj.P.Val), der Name des Proteins und der Genname für das Protein (Gen) aufgelistet. Aufgrund der großen Anzahl signifikant exprimierter Proteine in dieser Subgruppenanalyse erfolgt hier lediglich die tabellarische Darstellung aller signifikant exprimierten Proteine mit

einem angepassten Signifikanzniveau von <0,01 (adjustierter p-Wert).

Zur besseren Visualisierung der im Rahmen der Analysen identifizierten Proteine und der signifikanten Unterschiede in ihrer Expression erstellten wir auch hier Volcano Plots. Diese zeigen die signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine ($-\log_{10}p$) im Vergleich zur biologischen Relevanz (*Fold Change,* $\log_2FC$) (Abbildung 9).

Tabelle 4: Signifikant unterschiedlich exprimierte Proteine in der Analyse von KNTx vs. NTx <1 Monat (mit adjustiertem p-Wert <0,01)

UniProt ID	logFC	adj.P.Val	Protein	Gen
Q6P1N0	2.19312480149053	0.0028699516828865	Coiled-coil and C2 domain-containing protein 1A	CC2D1A
O15244	1.75774346960298	0.0028699516828865	Solute carrier family 22 member 2	SLC22A2
P09210	1.47917890937486	0.00341291848641744	Glutathione S-transferase A2	GSTA2
Q86XT2	1.65078324766649	0.00341291848641744	Vacuolar protein sorting-associated protein 37D	VPS37D
P21333	-2.1768250969717	0.00411615402401112	Filamin-A	FLNA
Q8WZ75	1.98383966905883	0.00411615402401112	Roundabout homolog 4	ROBO4
Q9NP79	1.15044611035929	0.00411615402401112	Vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog	VTA1
Q99835	1.92158333379412	0.00411615402401112	Protein smoothened	SMO
P02549	-3.02637857731184	0.00518755753481881	Spectrin alpha chain, erythrocytic 1	SPTA1
Q8WW52	1.31752755337273	0.00518755753481881	Protein FAM151A	FAM151A
Q96FN5	1.30165346038148	0.00518755753481881	Kinesin-like protein KIF12	KIF12
P00749	2.14757590506047	0.00518755753481881	Urokinase-type plasminogen activator	PLAU
Q9H3R2	2.19437023576861	0.00518755753481881	Mucin-13	MUC13
P05388	-1.97750143011959	0.00568303461946685	Large ribosomal subunit protein uL10	RPLP0
Q86YZ3	2.11814534069064	0.00568303461946685	Hornerin	HRNR
P07998	1.81591508686359	0.00568303461946685	Ribonuclease pancreatic	RNASE1
Q99571	1.52137100348476	0.00568303461946685	P2X purinoceptor 4	P2RX4
P22732	1.92990757279548	0.00584541137059386	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 5	SLC2A5
Q14344	1.57221108130479	0.00645448440686236	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13	GNA13
Q05513	1.51938281276874	0.00645448440686236	Protein kinase C zeta type	PRKCZ
Q8TF65	1.73802986633689	0.00667951495273031	PDZ domain-containing protein GIPC2	GIPC2
O75348	1.41984194503608	0.00698901487635289	V-type proton ATPase subunit G 1	ATP6V1G1
Q5Y7A7	1.92515859992905	0.00698901487635289	HLA class II histocompatibility antigen, DRB1 beta chain	HLA-DRB1
Q15149	-3.20232930180226	0.00698901487635289	Plectin	PLEC
Q13268	-2.03438724112923	0.00698901487635289	Dehydrogenase/reductase SDR family member 2, mitochondrial	DHRS2
Q9UBP0	1.83185857069102	0.00698901487635289	Spastin	SPAST
Q9UNF0	1.6879892343987	0.00698901487635289	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2	PACSIN2
P33121	-1.76068872803437	0.00698901487635289	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	ACSL1
O60658	2.41486220505532	0.00698901487635289	High affinity cAMP-specific and IBMX-insensitive 3',5'-cyclic phosphodiesterase 8A	PDE8A
P51570	1.30117922888686	0.00698901487635289	Galactokinase	GALK1
Q14117	1.65330842084924	0.00698901487635289	Dihydropyrimidinase	DPYS
Q12923	1.90024125712582	0.00698901487635289	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 13	PTPN13
Q8N3R9	1.93920818588378	0.00698901487635289	Protein PALS1	PALS1
Q9Y2Q3	-1.45253165749689	0.0073881693215185	Glutathione S-transferase kappa 1	GSTK1
Q9BXP8	2.6027829210642	0.0076791274454947	Pappalysin-2	PAPPA2
P11597	1.36842937819147	0.0076791274454947	Cholesteryl ester transfer protein	CETP
Q96A22	1.70155995904294	0.0086569321478893	Uncharacterized protein C11orf52	C11orf52
Q4KMQ2	1.17648794725722	0.0086569321478893	Anoctamin-6	ANO6
P17252	1.58048046070277	0.00921886792083636	Protein kinase C alpha type	PRKCA
Q4U2R8	1.84053929024806	0.0093552705713325	Solute carrier family 22 member 6	SLC22A6
P35998	-1.74249501319404	0.0093552705713325	26S proteasome regulatory subunit 7	PSMC2
P20711	1.1535250851574	0.00992893281739321	Aromatic-L-amino-acid decarboxylase	DDC
P32969	-1.46952924591706	0.00993173707296554	Large ribosomal subunit protein uL6	RPL9; RPL9P7; RPL9P8; RPL9P9

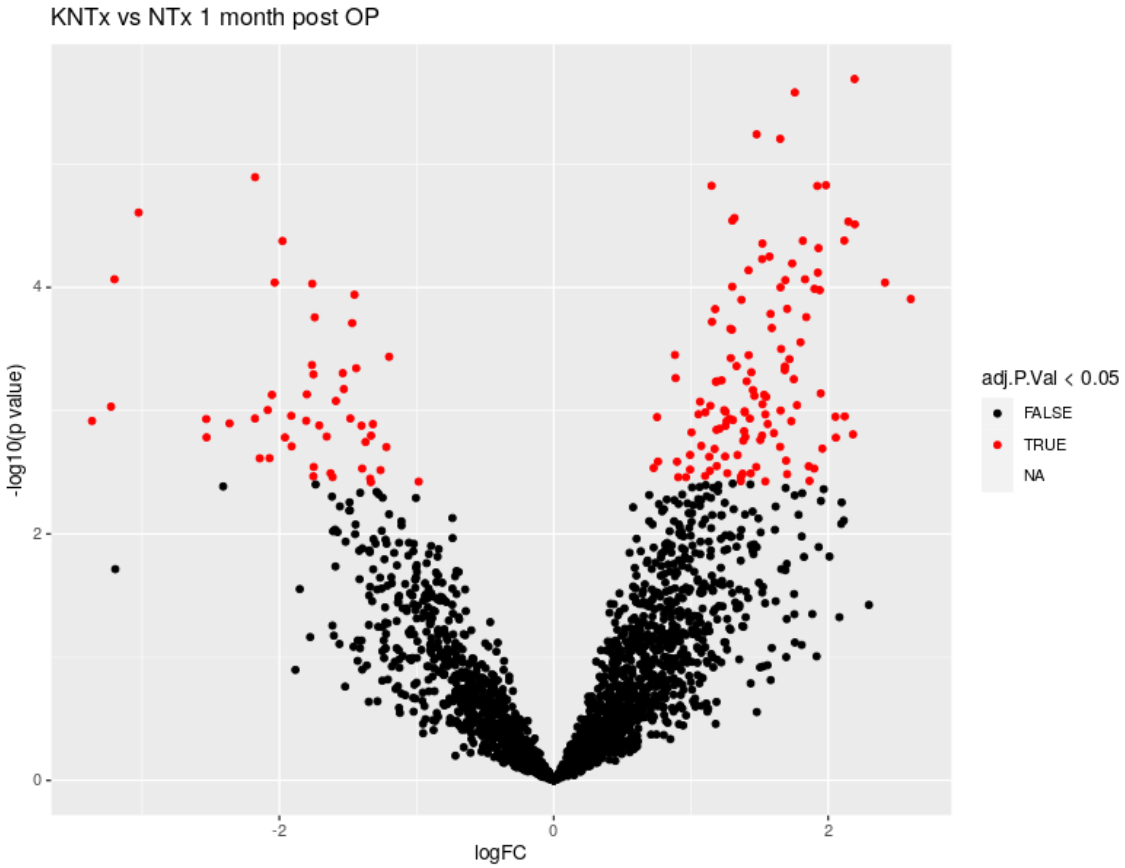


Abbildung 9: Volcano Plot von KNTx vs. NTX <1 Monat post-OP

Die roten Punkte stellen die signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine dar (insgesamt 168). Der negative dekadische Logarithmus des p-Werts ($-\log_{10}p$) ist auf der y-Achse aufgetragen. Der logarithmische *Fold Change* ($\log_2FC$) stellt sich auf der x-Achse dar

4.8.1 Enrichment-Analysen auf Basis von KEGG und GO für KNTx vs. NTx <1 Monat post-OP

Wir führten im Rahmen unserer Subgruppenanalysen jeweils ein GO- sowie ein KEGG-*Enrichment* der Proben KNTx vs. NTx <1 Monat durch.

Zusammenfassend zeigten sich im GO-*Enrichment 7 Terms* bzw. Signalwege signifikant angereichert bei einem adjustiertem p-Wert von <0,05. Diese sind nachfolgend aufgelistet (siehe Tabelle 5). Hierbei sind jeweils die GO-ID der identifizierten Terms, der Count, also wie viele der identifizierten Proteine einem bestimmten GO-Term zugeordnet sind, die *background ratio* (BgRatio), also wie häufig ein GO-Term im Vergleich zur Hintergrundpopulation vorkommt und die Gene Ratio, ein Maß für das Vorhandensein der identifizierten Proteine in Bezug auf die Gesamtzahl der Proteine innerhalb einer Kategorie, aufgelistet.

Im KEGG-*Enrichment* zeigten sich 16 signifikant angereicherte Signalwege mit einem adjustierten p-Wert <0.05. Auch hier wurden neben der KEGG-ID die Gene Ratio und die Background Ratio dargestellt (siehe Tabelle 6).

Tabelle 5: Signifikant angereicherte Signalwege/*Terms* im GO-*Enrichment* KNTx vs. NTx <1 Monat post-OP

	ONTOLOGY	ID	Description	GeneRatio	BgRatio	p.adjust	Count
GO:0014731	CC	GO:0014731	spectrin-associated cytoskeleton	4/166	6/2177	0.000433638999666018	4
GO:0005452	MF	GO:0005452	inorganic anion exchanger activity	4/163	5/2138	0.000153502979115465	4
GO:0015171	MF	GO:0015171	amino acid transmembrane transporter activity	4/163	6/2138	0.000433121609820999	4
GO:0030506	MF	GO:0030506	ankyrin binding	4/163	6/2138	0.000433121609820999	4
GO:0008509	MF	GO:0008509	anion transmembrane transporter activity	11/163	52/2138	0.00139152067119835	11
GO:0015179	MF	GO:0015179	L-amino acid transmembrane transporter activity	3/163	4/2138	0.00164456932735273	3
GO:0008514	MF	GO:0008514	organic anion transmembrane transporter activity	8/163	32/2138	0.00207358467099892	8

Tabelle 6: Signifikant angereicherte Signalwege im KEGG-*Enrichment* KNTx vs. NTx <1 Monat post-OP

ID	Description	GeneRatio	BgRatio	p.adjust	geneID	Count
hsa04974	Protein digestion and absorption	7/105	103/8101	0.000359278028298477	80781/340024/1278/23428/6519/6510/7512	7
hsa04610	Complement and coagulation cascades	6/105	85/8101	0.000784583476529803	3689/5328/2162/725/7450/1604	6
hsa05205	Proteoglycans in cancer	8/105	205/8101	0.00501341308129193	6194/1278/5328/2316/5578/286/6608/3339	8
hsa04512	ECM-receptor interaction	5/105	88/8101	0.00556109804371098	7148/1278/255743/7450/3339	5
hsa00760	Nicotinate and nicotinamide metabolism	3/105	35/8101	0.0102504299719245	5169/554235/30833	3
hsa04145	Phagosome	6/105	152/8101	0.0138860163858624	1536/3689/11151/51606/9550/9146	6
hsa04150	mTOR signaling pathway	6/105	155/8101	0.0151685700241416	6794/6194/5578/51606/9550/51719	6
hsa04216	Ferroptosis	3/105	41/8101	0.0157885003647686	1536/2879/2180	3
hsa00360	Phenylalanine metabolism	2/105	17/8101	0.0199367845865254	1644/3242	2
hsa00510	N-Glycan biosynthesis	3/105	50/8101	0.0267075710388788	4121/6184/6480	3
hsa05110	Vibrio cholerae infection	3/105	50/8101	0.0267075710388788	5578/51606/9550	3
hsa00770	Pantothenate and CoA biosynthesis	2/105	21/8101	0.0297706169579619	5169/1807	2
hsa00240	Pyrimidine metabolism	3/105	57/8101	0.0373796260645046	5169/1807/30833	3
hsa00480	Glutathione metabolism	3/105	57/8101	0.0373796260645046	2879/2939/373156	3
hsa04933	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	4/105	100/8101	0.0405663011880169	1536/5590/1278/5578	4
hsa04966	Collecting duct acid secretion	2/105	27/8101	0.0473333844618926	9550/6521	2

4.9 Analyse der differentiell exprimierten Proteine in KNTx vs. NTx >1 Jahr post-OP

Im Rahmen der differentiellen Analysen zwischen den Proben KNTx und der Subgruppe der Kontrollen NTx >1 Jahr post-OP konnten wir keine signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine bei einem adjustierten p-Wert von <0,05 identifizieren. Die beste *false discovery rate* (FDR) lag in dieser Subgruppenanalyse bei 0,21. Dies könnte unter anderem an der geringen Probenanzahl liegen (3 Proben für NTx >1 Jahr). Der Volcano Plot für die differentielle Analyse

befindet sich nachfolgend in Abbildung 10.

Aufgrund des fehlenden Nachweises von signifikant unterschiedlich exprimierten Proteinen, erfolgte für diese Subgruppe kein klassisches GO- oder KEGG-*Enrichment*.

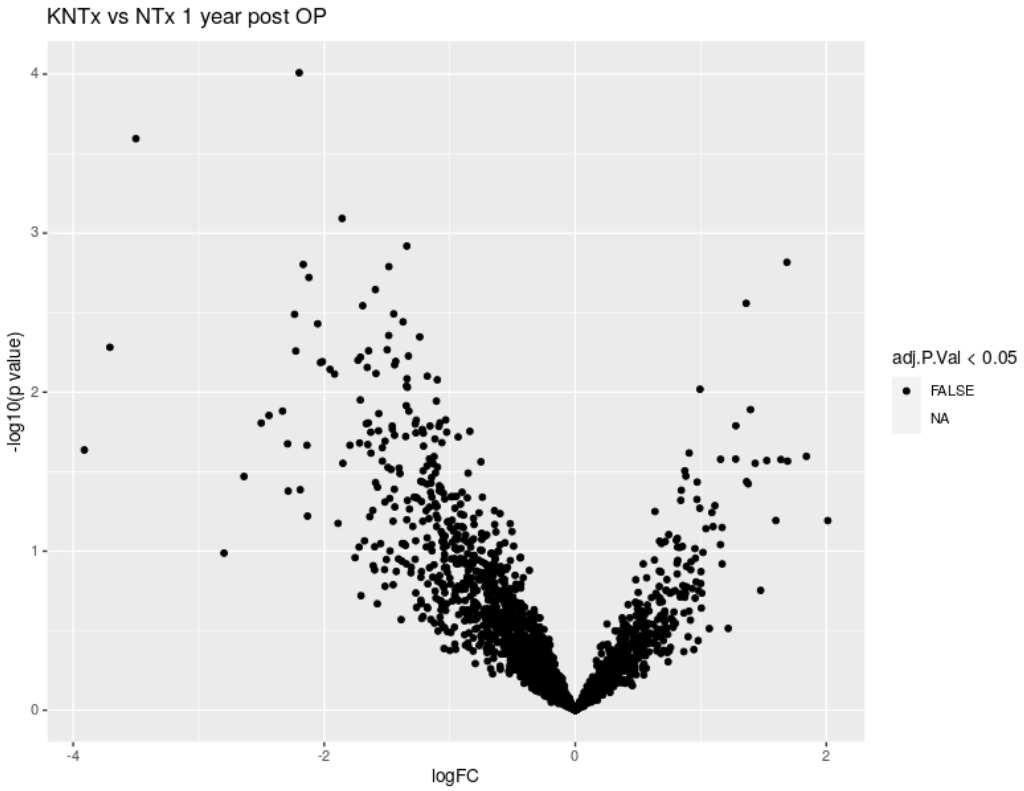


Abbildung 10: Volcano Plot von KNTx vs. NTX >1 Jahr post-OP

Hier zeigen sich in der Analyse keine signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine. Der negative dekadische Logarithmus des p-Werts ($-\log_{10}p$) ist auf der y-Achse aufgetragen. Der logarithmische *Fold Change* ($\log_2FC$) stellt sich auf der x-Achse dar

4.10 Korrelationsanalysen aller gemessenen Proteine der pädiatrischen Urinproben (KNTx) mit dem Abstand zur Tx, dem Alter und der eGFR

Wir führten Korrelationsanalysen und Plots für Abstand zur Transplantation, Alter und eGFR versus der gemessenen Proteinintensitäten in den KNTx- Proben durch. Hierbei wurden die Korrelationskoeffizienten zwischen den jeweiligen Variablen im Streudiagramm bzw. Scatterplot dargestellt, wobei die Werte zweier Variablen entlang der x- und y-Achsen aufgetragen werden und jeder Punkt eine KNTx-Proben repräsentiert.

Der Korrelationskoeffizient wurde hier nach Pearson ermittelt und ist ein Maß für die Stärke und Richtung der linearen Beziehung zwischen zwei kontinuierlichen Variablen. Er wird

verwendet, um zu quantifizieren, wie gut die beiden Variablen zusammen variieren und liegt zwischen -1 und +1. Ein positiver Wert zeigt somit eine positive lineare Beziehung an und ein negativer Wert eine negative lineare Beziehung.[53]

Wenn die Datenpunkte im Scatterplot tendenziell von links unten nach rechts oben verlaufen, deutet dies auf eine positive Korrelation hin. Das bedeutet, dass höhere Werte einer Variablen dazu tendieren, mit höheren Werten der anderen Variablen einherzugehen. Umgekehrt deutet ein Verlauf von links oben nach rechts auf eine negative Korrelation hin, was bedeutet höhere Werte einer Variablen neigen dazu, mit eher niedrigeren Werten der anderen Variablen einherzugehen.

Die nachfolgenden Tabellen zeigen die Proteine, die in den jeweiligen Korrelationsanalysen signifikant mit den untersuchten klinischen Parametern der Proband*innen korrelierten. Hierbei ist jeweils die UniProt-ID, der Korrelationskoeffizient nach Pearson (*pearson*), die Signifikanz der Korrelation mittels adjustiertem p-Wert (*significance*), sowie der Proteinname (Name) und das dazugehörige Gen aufgelistet. Als Signifikanzniveau wurde ein adjustierter p-Wert von <0,05 festgelegt.

4.10.1 Korrelationsanalysen der Proteinintensitäten von KNTx vs. Abstand zur Transplantation

Bei einem festgelegten Signifikanzniveau von p <0,05 zeigten sich zwei der Korrelationen signifikant mit dem Abstand zur Transplantation assoziiert. Die signifikant korrelierten Proteine Histamine-N-methyltransferase (HNMT) und Septin-7 (SEPTIN7) sind nachfolgend aufgelistet (Tabelle 7). Die Scatterplots zu den jeweiligen Korrelationen der Proteine sind in der Abbildung 11a und 11b dargestellt. Beide Korrelationen zeigen sich positiv. Das heißt, dass ein großer Abstand zur Transplantation eher mit einer höheren Proteinintensität assoziiert ist.

Tabelle 7: Korrelationen der Proteinintensitäten von KNTx vs. Abstand zur Tx

UniProt ID	pearson	significance	Name	Gen
P50135	0.621708468407327	0.0176136354702556	**Histamine N-methyltransferase**	HNMT
Q16181	0.561292403233556	0.0367551949659695	**Septin-7**	SEPTIN7

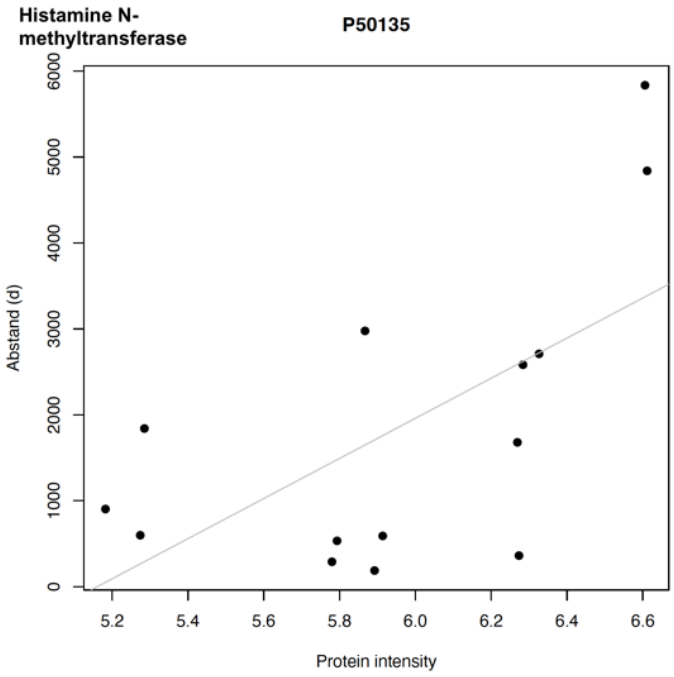


Abbildung 11a: **Scatterplot für Histamin-N-Methyltransferase**

Die Korrelation ist positiv.

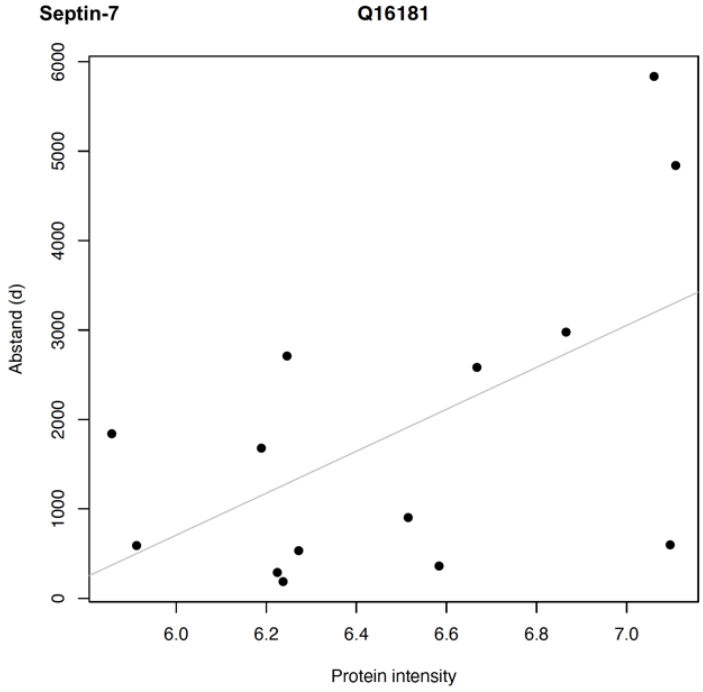


Abbildung 11b: **Scatterplot für Septin-7**

Die Korrelation ist positiv.

4.10.2 Korrelationsanalysen der Proteinintensitäten von KNTx vs. Alter der Proband*innen

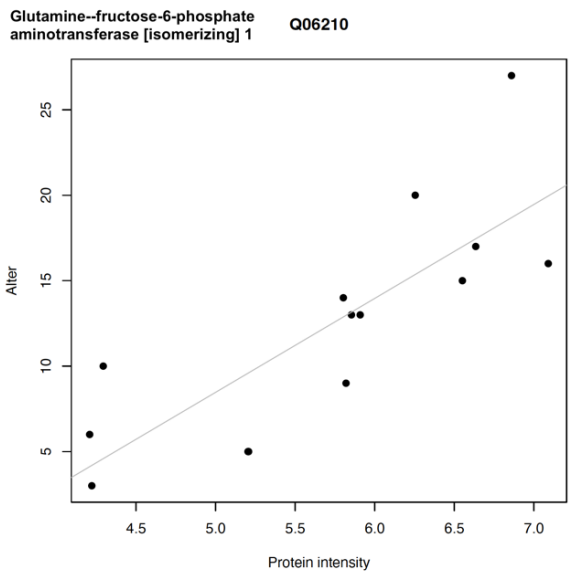
Bei einem adjustierten p-Wert von <0,05 zeigten sich im Rahmen der Analysen 53 der korrelierten Proteine signifikant mit dem Alter assoziiert. Die Auflistung dieser Proteine findet sich nachfolgend in Tabelle 8.

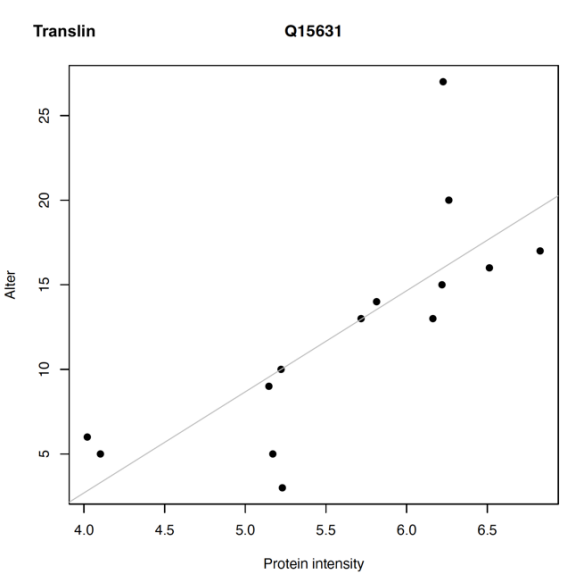
Von den insgesamt 53 Proteinen weisen 52 eine positive Korrelation auf, während ein Protein, die *Thymidine phosphorylase* (TYMP), einen negativen Korrelationskoeffizienten zeigt. Somit nimmt die Proteinintensität bei nahezu allen Proteinen mit zunehmendem Alter zu, während bei der Thymidine phosphorylase eine höhere Proteinintensität eher mit einem jüngeren Alter assoziiert ist.

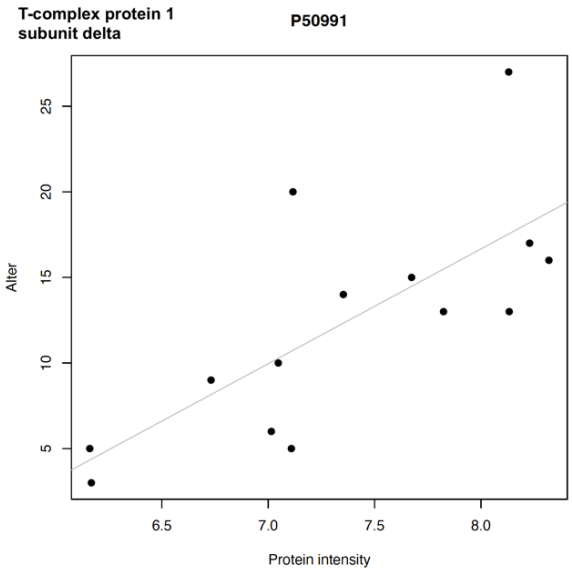
Zur einfacheren Veranschaulichung bei einem Nachweis von mehreren Dutzend Proteinen werden im folgenden die Scatterplots für die ersten 12 Proteine mit einem Signifikanzniveau von p <0,01 dargestellt (Abbildung 12a). Der Scatterplot für TYMP befindet sich nachfolgend ebenfalls abgebildet (12b).

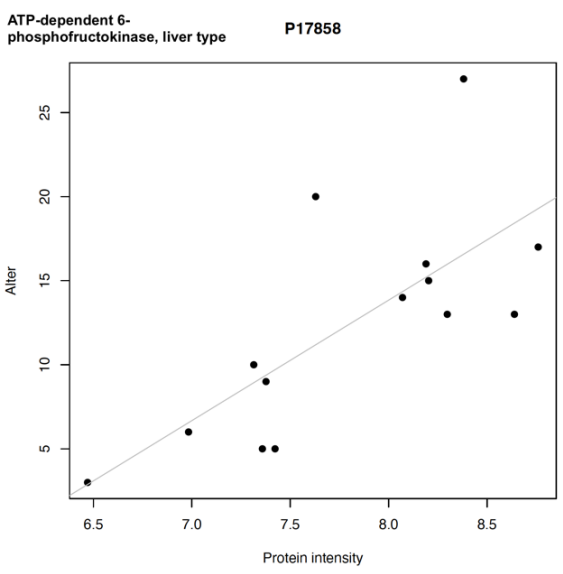
Tabelle 8: Korrelationen der Proteinintensitäten von KNTx vs. Alter

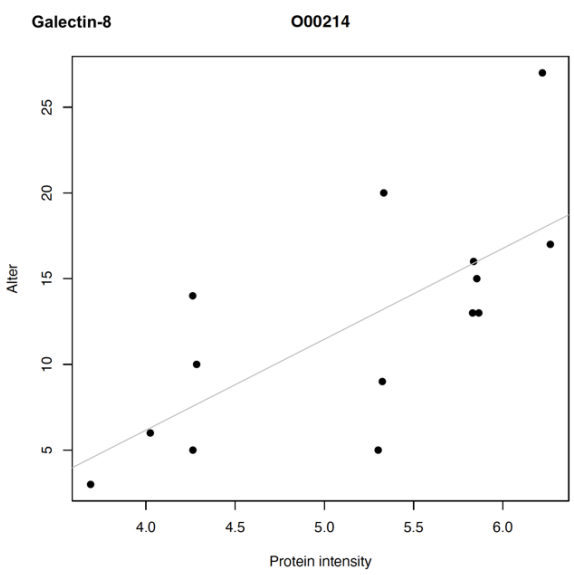
UniProt ID	pearson	significance	Name	Gen
Q06210	0.801536997560846	0.000566680016708985	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1	GFPT1
Q15631	0.763819615303874	0.00147364257329645	Translin	TSN
P50991	0.730299460120195	0.00301746525173886	T-complex protein 1 subunit delta	CCT4
P17858	0.723072482610694	0.00347559195959228	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type	PFKL
O00214	0.706219502615222	0.00475713614280841	Galectin-8	LGALS8
P63151	0.692408437472615	0.00606061581615663	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B alpha isoform	PPP2R2A
Q04760	0.682270261592899	0.00718275996221635	Lactoylglutathione lyase	GLO1
P49588	0.681844011210678	0.00723323859038868	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	AARS1
Q9HCE6	0.674713580486009	0.00811922507717139	Rho guanine nucleotide exchange factor 10-like protein	ARHGEF10L
Q02790	0.673429319991283	0.0082873497532902	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4	FKBP4
P17987	0.668869774590576	0.00890610892798954	T-complex protein 1 subunit alpha	TCP1
Q9Y5S2	0.663860266865401	0.00962645456219555	Serine/threonine-protein kinase MRCK beta	CDC42BPB
P49327	0.661343867391029	0.0100048424883203	Fatty acid synthase	FASN
Q01518	0.655466261179923	0.0109332966404912	Adenylyl cyclase-associated protein 1	CAP1
O43175	0.648253975152499	0.0121615326172231	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	PHGDH
P17655	0.642377601241893	0.0132382673413564	Calpain-2-catalytic subunit	CAPN2
O94973	0.642370124572722	0.013239682182944	AP-2 complex subunit alpha-2	AP2A2
P41250	0.641391436446181	0.01342588454615	Glycine--tRNA ligase	GARS1
O95433	0.640236205292356	0.0136482455625361	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1	AHSA1
P50570	0.638135144377318	0.0140598666684398	Dynamin-2	DNM2
P11216	0.63121675859983	0.0154825605870464	Glycogen phosphorylase, brain form	PYGB
P30153	0.624022472974408	0.0170756655286862	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	PPP2R1A
Q16555	0.620703320372283	0.0178512819734864	Dihydropyrimidinase-related protein 2	DPYSL2
Q14204	0.616737455553793	0.0188127316227888	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	DYNC1H1
Q9NY33	0.616665486854904	0.0188305337481772	Dipeptidyl peptidase 3	DPP3
P49189	0.600123244066764	0.0232726088004932	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	ALDH9A1
Q96IJ6	0.595937078180276	0.0245120300929847	Mannose-1-phosphate guanyltransferase alpha	GMPPA
P14324	0.592750093762124	0.0254883319497917	Farnesyl pyrophosphate synthase	FDPS
Q96HD9	0.592572664849487	0.0255435286196478	N-acyl-aromatic-L-amino acid amidohydrolase (carboxylate-forming)	ACY3
P08238	0.588259101004869	0.0269131972692703	Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1
Q9P2T1	0.584311885673648	0.0282139906049317	GMP reductase 2	GMPR2
Q7Z2W4	0.575771962183954	0.0311882631953417	Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1	ZC3HAV1
P53621	0.570439634388935	0.0331598838697455	Coatomer subunit alpha	COPA
Q5R3I4	0.570393152006705	0.0331774669212938	Tetratricopeptide repeat protein 38	TTC38
P22314	0.569328433069288	0.0335821173277707	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	UBA1
Q96GA7	0.569105591379647	0.0336672698485314	Serine dehydratase-like	SDSL
P47756	0.566168279260868	0.0348046881001475	F-actin-capping protein subunit beta	CAPZB
P19971	-0.565143301649268	0.0352082034355255	Thymidine phosphorylase	TYMP
P12277	0.564747516210308	0.0353649391392831	Creatine kinase B-type	CKB
P48637	0.557997786992576	0.0381180472528213	Glutathione synthetase	GSS
P40227	0.557126852792756	0.0384844568391803	T-complex protein 1 subunit zeta	CCT6A
P53396	0.553598129945507	0.0399956075238032	ATP-citrate synthase	ACLY
O75369	0.550191751621638	0.0414953080121634	Filamin-B	FLNB
Q16181	0.547994171102569	0.0424844613288987	Septin-7	SEPTIN7
P36871	0.547271883348118	0.0428133116292083	Phosphoglucomutase-1	PGM1
Q9UL46	0.542331187201549	0.0451129722536939	Proteasome activator complex subunit 2	PSME2
Q16851	0.540140235720121	0.0461611192857799	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	UGP2
Q9ULV4	0.536707096467331	0.0478391075642099	Coronin-1C	CORO1C
P50990	0.536270804035251	0.0480554883646968	T-complex protein 1 subunit theta	CCT8
Q14914	0.534793257666012	0.0487935775872657	Prostaglandin reductase 1	PTGR1
P10768	0.534215444532046	0.0490844480455474	S-formylglutathione hydrolase	ESD
A6ND91	0.534088319276052	0.0491486116320562	Aspartate dehydrogenase domain-containing protein	ASPDH
Q14847	0.533304925319022	0.0495453588938213	LIM and SH3 domain protein 1	LASP1

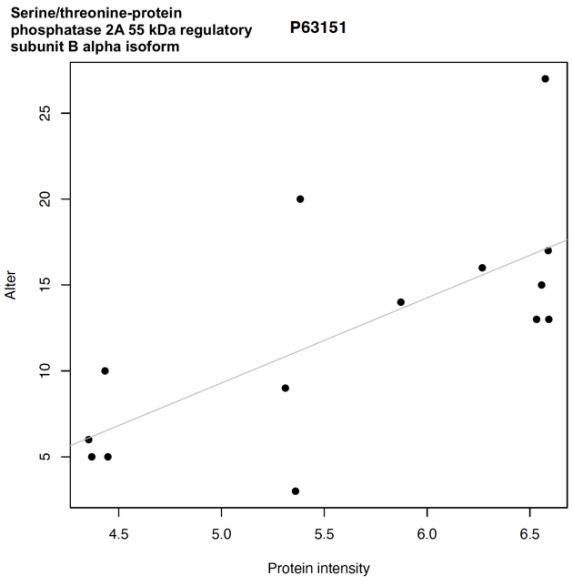

Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1
Q06210
Alter
Protein intensity

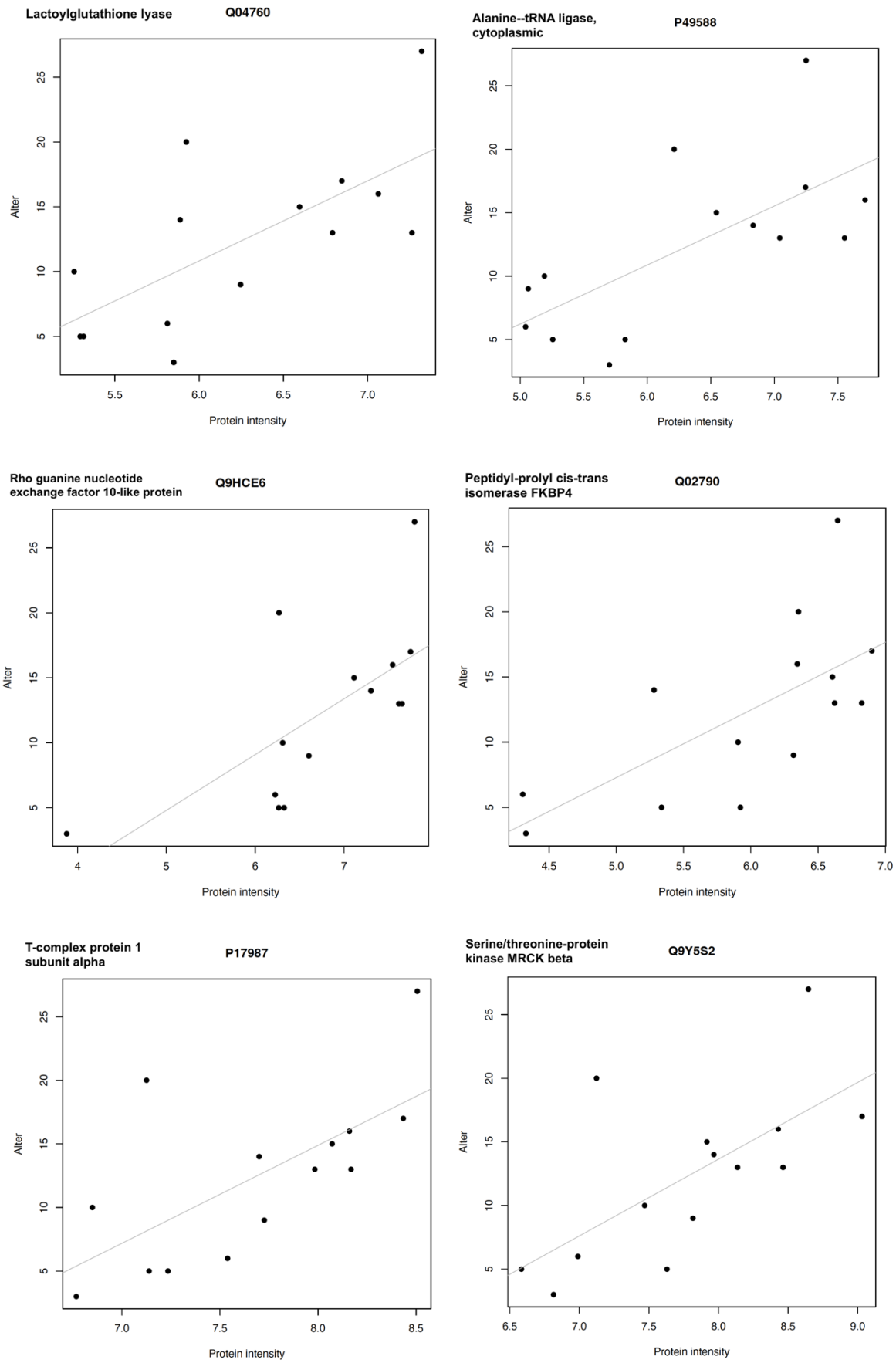

Translin
Q15631
Alter
Protein intensity


T-complex protein 1 subunit delta
P50991
Alter
Protein intensity


ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type
P17858
Alter
Protein intensity


Galectin-8
O00214
Alter
Protein intensity


Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B alpha isoform
P63151
Alter
Protein intensity



Abbildungen 12a: **Scatterplots für positive Korrelationen von KNTx vs. Alter**

Es zeigen sich zwölf signifikante positive Korrelationen mit einem adjustierten p-Wert <0,01.

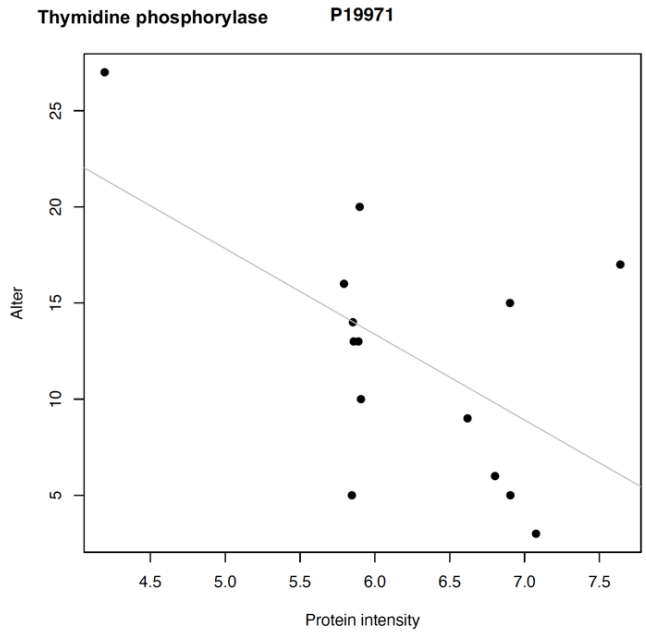


Abbildung 12b: **Scatterplot für Thymidine phosphorylase (TYMP)**
Hier zeigt sich eine negative Korrelation zum Alter der Proband*innen.

4.10.3 Korrelationsanalysen der Proteinintensitäten von KNTx vs. eGFR

Bei einem festgelegten Signifikanzniveau von p <0,05 zeigten sich 12 der Korrelationen signifikant mit der eGFR assoziiert. Die signifikant korrelierten Proteine sind allesamt nachfolgend aufgelistet (Tabelle 9). Es ist ersichtlich, dass 7 der 12 Korrelationen negativ sind, während die übrigen einen positiven Korrelationskoeffizienten aufweisen. Demnach sind etwa zwei Drittel der Proteine mit einer insgesamt höheren Proteinintensität bei einer niedrigeren eGFR assoziiert.

Die Scatterplots zu den jeweiligen Korrelationen der Proteine sind in Abbildung 13a (positive Korrelation) und Abbildung 13b (negative Korrelation) abgebildet.

Tabelle 9: Korrelationen der Proteinintensitäten von KNTx vs. eGFR

UniProt ID	pearson	significance	Name	Gen
P55017	0.62996425064821	0.015751429502736	**Solute carrier family 12 member 3**	**SLC12A3**
O75264	-0.625738310387283	0.016684888678159	**Small integral membrane protein 24**	**SMIM24**
P11684	-0.586143028630381	0.0276048376310668	**Uteroglobin**	**SCGB1A1**
O00764	-0.585763769990946	0.027730188429919	**Pyridoxal kinase**	**PDXK**
P15907	-0.581554523939771	0.0291501170873562	**Beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1**	**ST6GAL1**
Q14697	0.575213084020114	0.0313907138161968	**Neutral alpha-glucosidase AB**	**GANAB**
P61769	-0.566743668256326	0.0345796727919554	**Beta-2-microglobulin**	**B2M**
P60953	-0.56631865114889	0.0347457784487957	**Cell division control protein 42 homolog**	**CDC42**
O43175	0.558483150039825	0.0379149695794803	**D-3-phosphoglycerate dehydrogenase**	**PHGDH**
Q8IWA5	0.552991676595063	0.0402596446735417	**Choline transporter-like protein 2**	**SLC44A2**
P60983	-0.548468629795933	0.0422694549300734	**Glia maturation factor beta**	**GMFB**
O75309	0.546558695646122	0.0431398446657809	**Cadherin-16**	**CDH16**

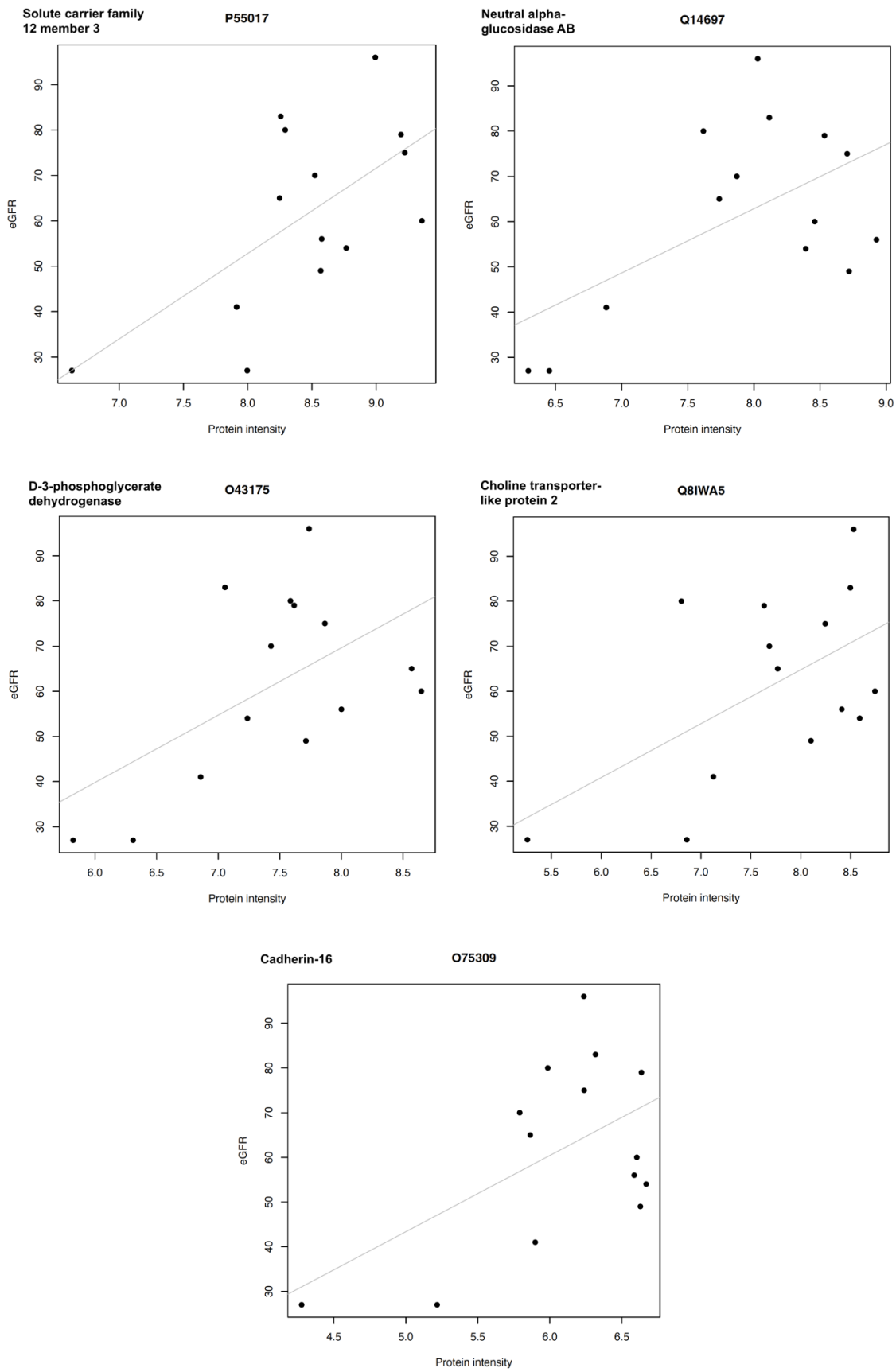
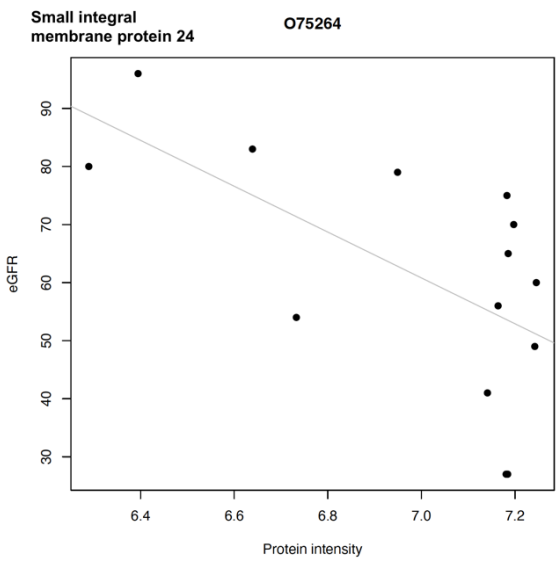
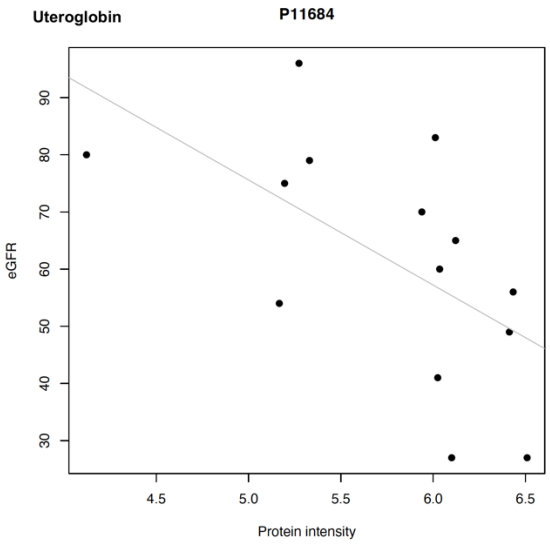
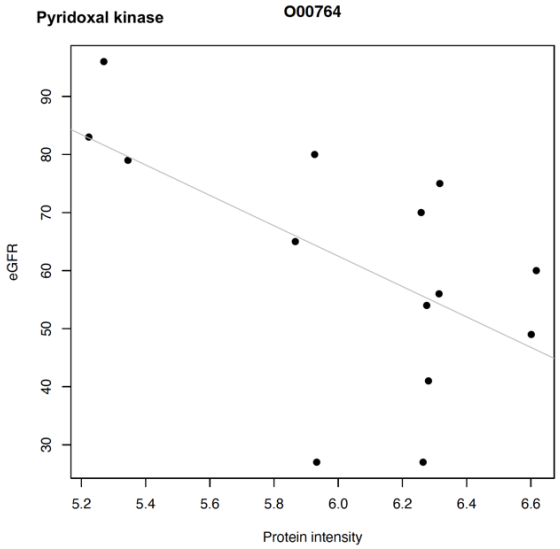


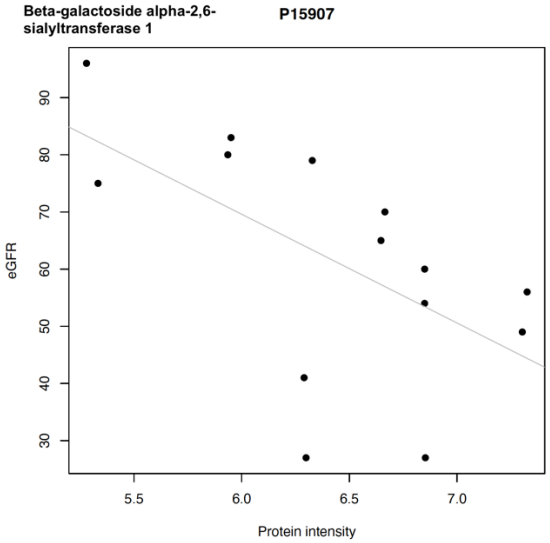
Abbildung 13a: **Scatterplots für positive Korrelationen von KNTx vs. eGFR**

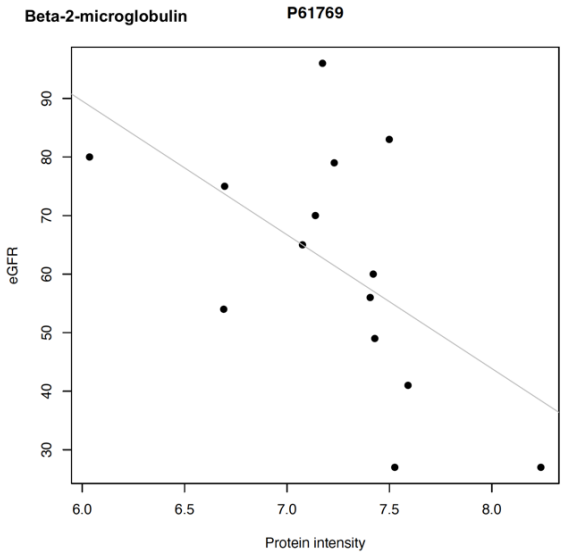
Es zeigen sich fünf Scatterplots mit einem positiven Korrelationskoeffizienten. Eine höhere Proteinexpression zeigt sich mit einer höheren eGFR assoziiert.

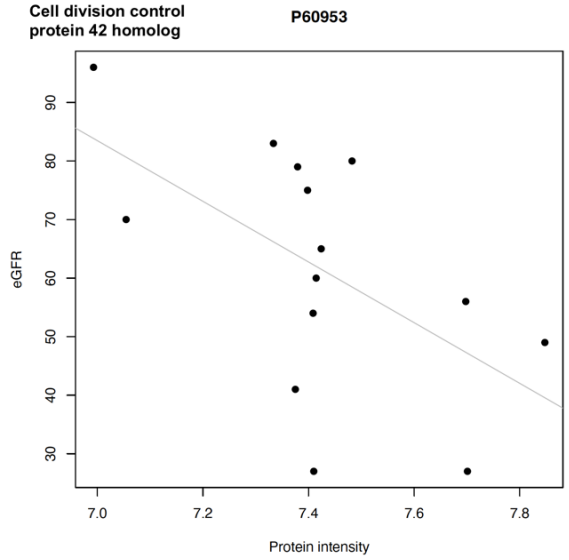

Small integral membrane protein 24
O75264
eGFR
Protein intensity


Uteroglobin
P11684
eGFR
Protein intensity


Pyridoxal kinase
O00764
eGFR
Protein intensity


Beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1
P15907
eGFR
Protein intensity


Beta-2-microglobulin
P61769
eGFR
Protein intensity


Cell division control protein 42 homolog
P60953
eGFR
Protein intensity

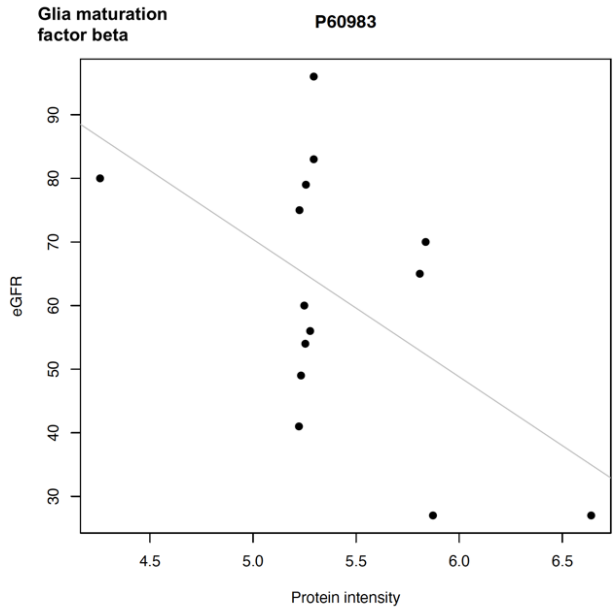


Abbildung 13b: **Scatterplots für negative Korrelationen von KNTx vs. eGFR**
Hier zeigen sich sieben Scatterplots mit einem negativen Korrelationskoeffizienten. Eine höhere Proteinexpression ist assoziiert mit einer niedrigeren eGFR.

4.11 Untersuchung von Protein-Matches im Vergleich differentiell exprimierter Proteine (KNTx vs. NTx) und Korrelationen der Proteinexpression pädiatrischer Urinproben mit klinischen Variablen

Zum besseren Verständnis, ob die im Rahmen der differentiellen Analyse von KNTx vs. NTx identifizierten signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine auch im klinischen Kontext möglicherweise relevant sein könnten, haben wir diese mit den Proteinen verglichen, die in unseren Korrelationsanalysen signifikant mit den klinischen Variablen der Proband*innen (KNTx) assoziiert waren. Im Vergleich der signifikanten Proteine von KNTx vs. NTx und Alter bzw. eGFR konnte jeweils ein übereinstimmendes Protein nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Abstand zur Transplantation zeigten sich keine übereinstimmenden signifikanten Proteine.

4.11.1 Identifikation von Protein-Matches zwischen dem Gesamtgruppenvergleich (KNTx vs. NTx) und altersabhängigen Korrelationen in der pädiatrischen Kohorte (KNT vs. Alter)

Im Vergleich der signifikanten Proteine im Rahmen der differentiellen Analyse von

KNTx vs. NTx und den signifikanten Korrelationen der Proteine im Bezug zum Alter der Patient*innen zeigt sich das Protein *Coatomer subunit alpha* (COPA) übereinstimmend (Tabelle 10). Abbildung 14 stellt den Protein-Match als Venn-Diagramm dar.

Tabelle 10: Protein-Match signifikanter Proteine (KNTx vs. NTx) verglichen mit signifikanten Korrelationen der Proteinintensitäten von KNTx vs. Alter

Gen	Match 1	Match 2	UniProt ID	Protein
COPA	Top Table KNTx/NTx alle	Alter	**P53621**	**Coatomer subunit alpha**

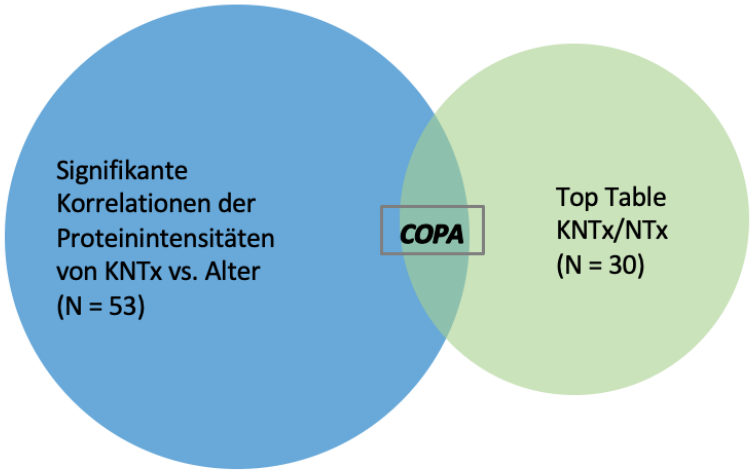


Abbildung 14: Venn-Diagramm von *Coatomer subunit alpha* (COPA) als Protein-Match
Es zeigen sich die Protein-Matches zwischen dem Gesamtgruppenvergleich (KNTx vs. NTx) und altersabhängigen Korrelationen in der pädiatrischen Kohorte (KNT vs. Alter). Hier stellt sich COPA als übereinstimmendes Protein dar.

4.11.2 Identifikation von Protein-Matches zwischen dem Gesamtgruppenvergleich (KNTx vs. NTx) und eGFR-abhängigen Korrelationen in der pädiatrischen Kohorte (KNTx vs. eGFR)

Im Anschluss erfolgte ein Vergleich der signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine aus der differentiellen Analyse von KNTx vs. NTx mit den Proteinen, die eine signifikante Korrelation zur eGFR der Patient*innen aufweisen. Auch hier konnte mit *Beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase* (ST6GAL1) ein Protein-Match nachgewiesen werden (Tabelle 11). In Abbildung 15 wird der Protein-Match als Venn-Diagramm dargestellt.

Tabelle 11: Protein-Match signifikanter Proteine (KNTx vs. NTx) verglichen mit signifikanten Korrelationen der Proteinintensitäten von KNTx vs. eGFR

Gen	Match 1	Match 2	UniProt ID	Protein
ST6GAL1	Top Table KNTx/NTx alle	eGFR	**P15907**	**Beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1**

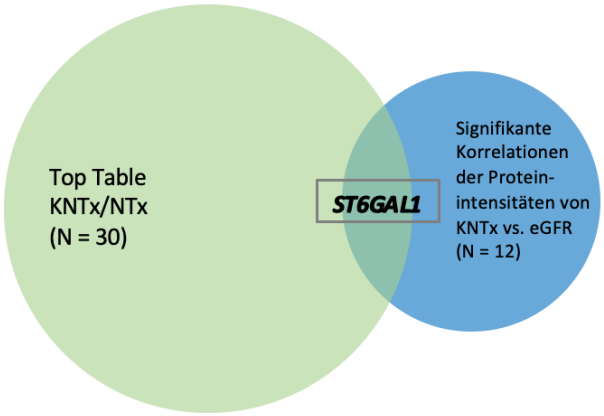


Abbildung 15: Venn-Diagramm von *Beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase* (ST6GAL1) als Protein-Match

Es zeigen sich die Protein-Matches zwischen dem Gesamtgruppenvergleich (KNTx vs. NTx) und eGFR-abhängigen Korrelationen in der pädiatrischen Kohorte (KNT vs. eGFR). Hier stellt sich ST6GAL1 als übereinstimmendes Protein dar.

4.12 Untersuchung von Protein-Matches zwischen den signifikant unterschiedlich exprimierten Proteinen der Gesamtgruppenanalyse (KNTx vs. NTx) und der Subgruppenanalyse (KNTx vs. NTx <1 Monat)

Wir haben zusätzlich geschaut, ob bestimmte Proteine sowohl in der Gesamtanalyse von KNTx vs. NTx als auch in der Subgruppenanalyse von KNTx vs. NTx <1 Monat signifikant exprimiert sind. Es konnten 8 Proteine nachgewiesen werden, die sich in beiden Analysen signifikant unterschiedlich exprimiert zeigten. Die Auflistung dieser Proteine befindet sich nachfolgend in Tabelle 12. Weiterhin sind die Protein-Matches in Abbildung 16 als Venn-Diagramm dargestellt. Alle 8 der Protein-Matches zeigten hierbei sowohl in der Gesamt-, als auch in der Subgruppenanalyse eine gleichgerichtete Proteinexpression. Während Hornerin (HRNR) und *Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 13* (PTPN13) in beiden Fällen eine vermehrte Expression aufweisen, stellen sich die restlichen 6 Proteinen in beiden Fällen jeweils mit einer verminderten Expression dar.

Tabelle 12: Protein-Match signifikant unterschiedlich exprimierter Proteine in der Gesamt- (KNTx vs. NTx) versus Subgruppenanalyse (KNTx vs. NTx <1 Monat)

Gen	Match 1	logFC	Match 2	LogFC	UniProt ID	Protein
HRNR	Top Table KNTx/NTx alle	positiv	Top Table KNTx/NTx <1 Monat	positiv	**Q86YZ3**	**Hornerin**
PTPN13	Top Table KNTx/NTx alle	positiv	Top Table KNTx/NTx <1 Monat	positiv	**Q12923**	**Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 13**
FLNA	Top Table KNTx/NTx alle	negativ	Top Table KNTx/NTx <1 Monat	negativ	**P21333**	**Filamin-A**
RPL9; RPL9P7; RPL9P8; RPL9P9	Top Table KNTx/NTx alle	negativ	Top Table KNTx/NTx <1 Monat	negativ	**P32969**	**Large ribosomal subunit protein uL6**
PLEC	Top Table KNTx/NTx alle	negativ	Top Table KNTx/NTx <1 Monat	negativ	**Q15149**	**Plectin**
DHRS2	Top Table KNTx/NTx alle	negativ	Top Table KNTx/NTx <1 Monat	negativ	**Q13268**	**Dehydrogenase/reductase SDR family member 2, mitochondrial**
GSTK1	Top Table KNTx/NTx alle	negativ	Top Table KNTx/NTx <1 Monat	negativ	**Q9Y2Q3**	**Glutathione S-transferase kappa 1**
PSMC2	Top Table KNTx/NTx alle	negativ	Top Table KNTx/NTx <1 Monat	negativ	**P35998**	**26S proteasome regulatory subunit 7**

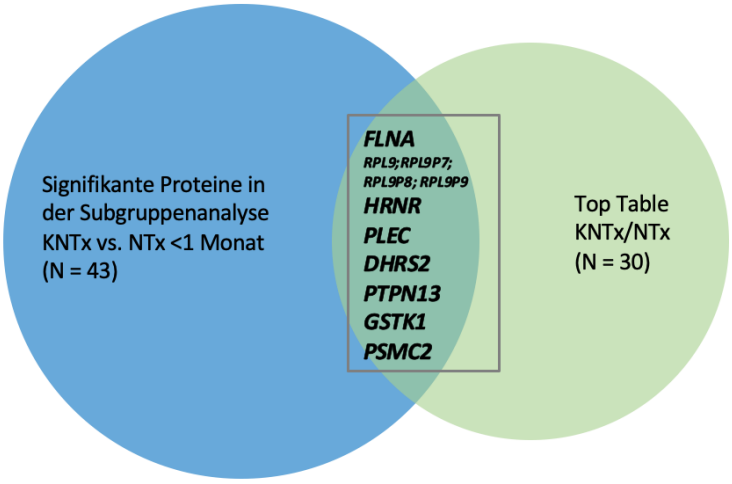


Abbildung 16: Venn-Diagramm der Protein-Matches zwischen Gesamt- (KNTx vs. NTx) und Subgruppenanalyse (KNTx vs. NTx <1 Monat)

Es zeigen sich die Protein-Matches zwischen dem Gesamtgruppenvergleich (KNTx vs. NTx) und dem Subgruppenvergleich (KNT vs. NTx <1 Monat). Hier zeigen sich acht Proteine übereinstimmend. HRNR und PTPN13 zeigen in beiden Gruppen eine vermehrte Expression.

5 Diskussion

Die Nierentransplantation gilt insbesondere bei Kindern als präferiertes Nierenersatzverfahren, da sie im Vergleich zur chronischen Dialysetherapie zu einem verbesserten Überleben, einer höheren Lebensqualität sowie einer besseren neuropsychologischen Entwicklung beiträgt und gleichzeitig das Risiko für Langzeitkomplikationen vermindert.[54] Im Rahmen dieser Arbeit untersuchten wir das Proteom von Urinexosomen bzw. *small urinary extracelular vesicles* im Urin nierentransplantierter Kinder und Jugendlicher und verglichen es mit dem von adulten nierentransplantierten Kontrollpersonen, um erste Biomarkerkandidaten zu identifizieren und Einblicke in die zugrundeliegenden biologischen Prozesse nach einer pädiatrischen Nierentransplantation zu gewinnen. Langfristiges Ziel dieser Pilotstudie ist es, bereits frühzeitig Einblicke in intrazelluläre Signalprozesse zu erhalten und mögliche Funktionseinschränkungen besser zu erkennen und zu erforschen. Somit möchten wir herausfinden, inwieweit das Proteom von suEVs nierentransplantierter pädiatrischer Patient*innen zukünftig als diagnostisches Werkzeug abseits der Forschung etabliert werden kann. Hierbei untersuchten wir, ob sich Veränderungen in den Proteommustern der suEVs identifizieren lassen, die als potenzielle Biomarker für den Transplantatzustand dienen könnten, mit dem Ziel, nicht-invasive diagnostische Verfahren für Nierenfunktionsstörungen und Abstoßungsreaktionen zu entwickeln und invasive diagnostische Methoden wie die Nierenbiopsie in Zukunft zu ersetzen.

5.1 Stellenwert von urinary extracellular vesicles in der Forschung

Studien haben bei erwachsenen nierentransplantierten Patient*innen bereits gezeigt, dass *urinary extracellular vesicles* das Potenzial besitzen, als mögliches Werkzeug zur Überwachung der Transplantatfunktion nach einer Nierentransplantation zu fungieren. Unter anderem konnte in vorangehenden Arbeiten gezeigt werden, dass nierenspezifische Proteine wie Aquaporin-1 (AQP1) und Aquaporin-2 (AQP2) bei gesunden Nieren vermehrt ausgeschieden werden. Bei abnehmender Nierenfunktion und in den Stadien CKD G4-G5 zeigte sich unter anderem eine deutlich verminderte Ausscheidung von insbesondere AQP1 und AQP2. Nach erfolgter Nierentransplantation konnten beide Proteine wieder in erhöhter Menge nachgewiesen werden und werden somit am ehesten bei adäquater Nierenfunktion ausgeschieden.[55]

5.1.1 PCK2 als potenzieller Biomarker im adulten Patientenkollektiv

Bereits publizierte Arbeiten von Braun et al. untersuchten suEVs von 22 lebenden Spendern und deren Empfängern zu fünf definierten Zeitpunkten vor und nach der Transplantation. In den Proteomanalysen wurden zeitliche Muster der suEV-Proteine und die

damit verbundenen zellulären Prozesse detektiert. Hier zeigte sich mitunter die Aktivierung der komplementassoziierten Proteine aus den suEVs als eine der am stärksten regulierten Komponenten, was unter anderem auf eine zentrale Rolle in der frühen Immunantwort und Transplantatabstoßung hinweist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine hohe Anreicherung von *Phosphoenolpyruvate carboxykinase* (PCK2) im suEV-Proteom am Folgetag nach der Nierentransplantation prädiktiv für eine bessere Nierenfunktion ein Jahr nach dem Eingriff ist. Insgesamt zeigte sich hier in den ersten vier Wochen nach Transplantation eine vermehrte PCK2-Expression, die ein Jahr nach Transplantation deutlich abnahm. Die Bestätigung von PCK2 als früher prädiktiver Marker für die Transplantatfunktion erfolgte mittels *targeted* Massenspektrometrie in einer unabhängigen Validierungskohorte.[33,34] PCK2 ist ein mitochondriales Enzym, das eine zentrale Rolle im Glukosestoffwechsel spielt, indem es an der Gluconeogenese beteiligt ist.[56] Es zeigt eine vermehrte Expression im proximalen Tubulus, der bevorzugt von akuten Schädigungen betroffen ist. Ergänzend wurden in der Studie auch immunhistochemische Untersuchungen von Nierenbiopsaten vor Explantation (prä-Tx) und nach Reperfusion (post-Tx) durchgeführt, welche eine vermehrte Expression im proximalen Tubulus bestätigten. Eine Korrelation zu der PCK2-Expression in den suEVs konnte hier aber nicht festgestellt werden.[33] Ein Anstieg von PCK2 kurz nach Transplantation könnte hierbei darauf hindeuten, dass es eine Rolle bei der Regeneration und Anpassung des transplantierten Organs spielt.

5.1.1.1 PCK2 zeigt im Vergleich zwischen pädiatrischen und adulten Proben ein ähnliches Proteinexpressionsmuster

Im Rahmen unserer Studie konnte PCK2 in 13 der 14 pädiatrischen Proben in den massenspektrometrischen Messungen detektiert werden. Bezogen auf die differentiellen Analysen zwischen KNTx und NTx konnten im Zuge dieser Arbeit insgesamt 30 Proteine identifiziert werden, die sich bei einem adjustierten p-Wert von <0,05 signifikant unterschiedlich exprimiert zeigten, zu denen PCK2 jedoch nicht gehörte. Somit zeigt sich bezogen auf den Vergleich zwischen den pädiatrischen und adulten Proben insgesamt ein ähnliches Proteinexpressionsmuster bezogen auf PCK2 und deutet in beiden Gruppen auf eine ähnliche Exkretion nach Transplantation hin. Daten zu der Expression von PCK2 bei pädiatrischen Proband*innen vor Durchführung der Nierentransplantation im CKD Stadium 4 bzw. Stadium 5 liegen uns nicht vor. Zur besseren Beurteilung, ob PCK2 seine Relevanz als potenzieller Biomarker im pädiatrischen Kontext ebenfalls bestätigen kann, müssten im Verlauf weitere Untersuchungen zu den Proteinexpressionsmustern zu definierten Zeitpunkten vor und nach Nierentransplantation erfolgen, ähnlich wie es auch in den Arbeiten von Braun et. al.[33,34] umgesetzt wurde.

5.2 Identifizierte Proteine

Im Rahmen unserer Arbeit konnten in allen vorliegenden Proben (KNTx und NTx) insgesamt 2291 Proteine identifiziert werden. Davon waren 1869 Proteine in mindestens 50% aller pädiatrischen Proben (KNTx) nachweisbar.

5.2.1 Es zeigen sich Unterschiede in der Proteinexpressionen pädiatrischer und adulter Urinproben

Ein zentraler Aspekt der Studie war der Vergleich der Proteinexpression zwischen den Urinproben von Kindern und Jugendlichen gegenüber Proben von Erwachsenen, um mögliche Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten des Proteoms aufzuzeigen. Die Ergebnisse zeigten eine Reihe von Proteinen, die signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Gruppen exprimiert waren. Diese Unterschiede wurden mittels verschiedener statistischer Methoden, einschließlich Heatmaps und PCAs, visualisiert.

Hier zeigte sich insbesondere, dass die pädiatrischen Proben in der Heatmap mit den rohen Proteinintensitäten zusammen clustern und insgesamt ein ähnliches Profil aufweisen, was unter anderem auf eine homogene Proteinexpression innerhalb dieser Gruppe hinweist. Im Gegensatz dazu bildeten die erwachsenen Proben ein separates Cluster. Dies wurde unter anderem auch durch die PCA bestätigt, welche eine gute Trennung zwischen den Kinder- und Erwachsenenproben zeigte. Auch das weist darauf hin, dass die Proteinprofile der beiden Gruppen sich zum Teil deutlich unterscheiden. Hier ist jedoch unter anderem zu beachten, dass die Probensammlung der adulten Kontrollproben zu einem insgesamt früheren Zeitpunkt erfolgte, als bei den pädiatrischen Proben. Wohingegen bei den Kontrollen ein Abstand zur Nierentransplantation von einem Median von 20,5 Tagen (IQR = 340,5 Tage) vorlag, waren es bei den pädiatrischen Proben im Median 1291 Tage (IQR = 2130 Tage). Relevant ist in diesem Zusammenhang zu erwähnen, dass die transplantierten Nieren der pädiatrischen Proband*innen, wie auch die der erwachsenen Kontrollproband*innen von adulten Spender*innen stammen.

5.2.2 Assoziation der Proteinexpression mit der eGFR

In unseren weiteren Untersuchungen zeigte sich eine Assoziation der Proteinexpression mit der eGFR der Proband*innen. Die Daten zeigten zu Beginn, dass die Kinder im Durchschnitt eine höhere eGFR aufwiesen als die Erwachsenen, was sich möglicherweise auch in den unterschiedlichen Proteinprofilen widerspiegelt. Es zeigte sich unter anderem, dass die eGFR der pädiatrischen Patient*innen eher etwas höher im Bereich 60 – 80 ml/min liegt. Die adulten Kontrollen zeigen eher niedrigere eGFR-Werte mit <40 – 60 ml/min. Es ist in diesem Zusammenhang jedoch zu beachten, dass bei den eGFR-Werten der Kinder und der Erwachsenen unterschiedliche Schätzformeln angewendet wurden (FAS vs.

CKD-EPI). Weiterhin ist auch hier nochmals zu unterstreichen, dass die Probensammlung der Proband*innen und Kontrollen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transplantation stattfand, mit einem insgesamt kürzeren Abstand nach Transplantation bei den adulten Kontrollen.

Weidmann et al. (2024) beschreiben unter anderem, dass Faktoren wie die Art der Immunsuppression und der Zeitpunkt nach Nierentransplantation die eGFR auf Basis von Cystatin C- und Kreatinin-basierten Formeln erheblich beeinflussen können. Hier kam man zu dem Schluss, dass sowohl Kreatinin als auch Cystatin C nützliche Marker zur Beurteilung der Nierenfunktion nach einer Transplantation einsetzbar sind, aber dass ihre Diskrepanz unter bestimmten klinischen Bedingungen berücksichtigt werden muss. Insbesondere in den ersten

Wochen nach der Transplantation kann Cystatin C eine genauere Schätzung der Nierenfunktion liefern.[57] Um eine bessere Vergleichbarkeit der beiden Gruppen zu erreichen, könnte in zukünftigen Analysen ggfs. auch bei der Beurteilung der Nierenfunktion der Erwachsenen Kontrollprobanden auf eine Cysatin C-basierte Formel (FAS-Formel) zurückgegriffen werden.

Zur besseren Vergleichbarkeit der pädiatrischen Proben mit den Kontrollen erfolgte außerdem eine Subgruppenunterteilung in Kontrollen, die ihre Transplantation vor weniger als einem Monat erhalten haben und die ihre Transplantation vor mehr als einem Jahr erhalten haben. Auch hier ist unter anderem zu beachten, dass sich die Patient*innen mit kurzem Abstand nach Nierentransplantation ggfs. noch nicht in einem *steady state*, also einem Gleichgewichtszustand, befinden und aktuell noch eine instabile Nierenfunktion vorliegt. Im *steady state* bleiben Serumkreatininwerte konstant, da sich Bildung und Elimination gleichen.[12] Aus diesem Grund ist die Vergleichbarkeit mit den pädiatrischen Proben, die ihre Nierentransplantationen bereits vor einem deutlich längeren Zeitraum erhalten haben und daher eher in einem *steady state* sind, zum Teil eingeschränkt.

Eine Korrelation der eGFR mit einer der Hauptkomponenten in der PCA konnten wir nicht nachweisen, da sowohl bei PC1 als auch bei PC2 die Werte nicht signifikant waren. Bei PC1 deutet jedoch der p-Wert von 0,0786 auf einen möglichen Trend hin (siehe Abbildung 4a).

5.3 Unterschiede der Proteinexpressionsmuster zwischen KNTx und NTx

Im Rahmen der differentiellen Analysen zwischen den Proben KNTx und den Kontrollen NTx konnten insgesamt 30 signifikant unterschiedlich exprimierte Proteine bei einem adjustierten p-Wert von <0,05 identifiziert werden, welche in Tabelle 3 dargestellt sind und im Verlauf für weitere Analysen verwendet wurden. Zusammenfassend zeigten sich hier unter anderem verschiedene Zytoskelett- und Zelladhäsionsproteine (z.B. Filamin-A[58] und

Plectin[59]), ribosomale Proteine (u.a. *Large ribosomal subunit protein uL3*[60]) und Proteine, die unter anderem am Proteintransport und an der Proteinmodifikation beteiligt sind (z.B. *Betagalactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1*[61] und Hornerin[62]).

5.3.1 Im Rahmen der Subgruppenanalyse zeigen sich große Unterschiede bezogen auf die Proteinexpressionsmuster

In der Subgruppenanalyse KNTx vs. NTx <1 Monat konnten insgesamt 168 signifikant unterschiedlich exprimierte Proteine identifiziert werden. Somit zeigt sich bezogen auf diese beiden Gruppen, dass diese sich hinsichtlich ihrer Proteinexpressionsmuster deutlich unterscheiden. Bei der Untersuchung von KNTx vs. NTx >1 Jahr hingegen konnten keine signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine identifiziert werden. Insgesamt zeigt sich also, dass hier die Proteinexpression insgesamt deutlich ähnlicher ist.

Dass in der Subgruppe KNTx vs. NTx >1 Jahr keine signifikant unterscheidlich exprimierten Proteine nachgewiesen werden konnten, liegt womöglich auch an der geringen Probenanzahl (n = 3), weshalb die Daten nicht ausreichend repräsentativ sein könnten. Zur besseren Vergleichbarkeit der Kinder- und Erwachsenenproben waren wir unter anderem auch auf Proben angewiesen, die im gleichen Proben-Batch gemessen wurden. Hierbei handelt es sich um Proben, die in der gleichen massenspektrometrischen Messung untersucht wurden, um Messunterschiede diesbezüglich möglichst zu vermeiden. Zur besseren Vergleichbarkeit sind unter anderem mehr Proben, insbesondere in der Kontrollgruppe, erforderlich. Zudem wären beispielsweise ähnliche Abstände zur Transplantation zwischen Proband*innen und Kontrollen sinnvoll, um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

5.4 Enrichment-Analysen zeigen vielfältige biologische Funktionen in den signifikant angereicherten Gene-Sets auf

Zur weiteren Charakterisierung der Unterschiede in der Proteinexpression der pädiatrischen Proben und adulten Kontrollen wurden *Gene Set Enrichment* Analysen unter Verwendung der *Gene Ontology* und der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* Datenbanken durchgeführt. Diese Analysen identifizierten mehrere biologische Prozesse und Signalwege, die zwischen den beiden Gruppen unterschiedlich reguliert sind.

5.4.1 GO-Enrichment

Es zeigten sich insgesamt 1226 signifikant angereicherte GO-*Terms* bei einem adjustierten p-Wert von <0,05. Diese können hierbei grob unterteilt werden in *Terms*, die in immunologische Prozesse involviert sind (u.a. Immunantwort, Immunregulation und Entzündungsreaktionen), mit dem Zytoskelett und der Zellstruktur zusammenhängen, an

DNA-Reparatur, Zellzyklus, Signalübertragung und Apoptose beteiligt sind, metabolische Funktionen haben (insbesondere Fettsäuremetabolismus) an der Proteinbiosynthese und an der Proteinmodifikation beteiligt sind. Es zeigt sich hier insbesondere, dass die signifikant angereichert GO-*Terms* zwischen nierentransplantierten Kindern und Erwachsenen (KNTx vs. NTx) ein breites Spektrum an biologischen Prozessen abdecken (siehe Abbildung 6a und 6b).

Pädiatrische Proband*innen zeigen eine vermehrte Expression von Proteinen der adaptiven Immunantwort im Vergleich zu den adulten Kontrollen

Die Unterschiede in diesen Funktionen könnten unter anderem auf altersbedingte Unterschiede in der Immunantwort und im Stoffwechsel nach einer Nierentransplantation hinweisen. So zeigte unter anderem eine Arbeit von Schaenman et al. (2019), die eine Genexpressionsanalyse peripherer mononukleärer Blutzellen nierentransplantierter Patient*innen, darunter 23 ältere (≥ 60 Jahre) und 37 jüngere (30–59 Jahre), durchführte, eine verringerte Expression von Genen, die unter anderem mit T-Zell-Funktionen assoziiert sind. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass jüngere Nierentransplantierte eine gesteigerte adaptive Immunantwort aufweisen.[63]

Im Rahmen unserer Arbeit zeigten sich bei den pädiatrischen Proband*innen im Gesamtgruppenvergleich KNTx vs. NTx (siehe Abbildung 6a) unter anderem verschiedene, zur adaptiven Immunantwort zugehörige GO-*Terms* vermehrt exprimiert (*negative regulation of dendritic cell apoptotic process, T-helper 2 cell cytokine production* und *regulation of Thelper 2 cell cytokine production*),[63] was unterstützt, dass das Alter signifikant die Immunantwort nach Nierentransplantation beeinflussen könnte. Unabhängig vom Alter ist hier jedoch auch der Zeitpunkt nach Nierentransplantation sowie die Art der Immunsuppression zu berücksichtigen. Außerdem unterstreicht dieser Befund erneut die Notwendigkeit, altersspezifische Faktoren bei der Nachsorge und Behandlung von Patient*innen nach Nierentransplantation zu beachten.

Eine vermehrte Proteinexpression im Lipidmetabolismus nierentransplantierter Kinder deutet auf mögliche pathophysiologische Veränderungen nach erfolgter Nierentransplantation hin

Bezogen auf den Metabolismus zeigte sich in unseren Daten, dass GO-*Terms*, die den Fett- und Fettsäuremetabolismus betreffen, wie beispielsweise *long-chain fatty acid transporter activity*, bei Kindern vermehrt exprimiert sind (KNTx vs. NTx). Die renalen proximalen Tubuluszellen nehmen langkettige Fettsäuren aus dem Urin auf.[64] Ein Nachweis vermehrter Expression dieser GO-*Terms* deutet insbesondere auf eine gesteigerte Aktivität entsprechender Transportmechanismen hin.

Erkan et al. (2015) zeigten unter anderem im Rahmen von Analysen der

Lipidzusammensetzung im Urin von Kindern mit fokal-segmentaler Glomerulosklerose im Vergleich zu Kindern mit minimal change disease (MCD), dass sich bei Kindern mit FSGS eine erhöhte Konzentration von Fettsäuren (*fatty acids*, FA) im Urin zeigte. Ein gestörter Lipidstoffwechsel sowie eine Akkumulation von Lipiden spielen unter anderem eine Rolle in der Pathophysiologie der FSGS, sodass die identifizierten Lipidstoffwechselveränderungen als Biomarker in der Diagnose von FSGS verwendet werden könnten.[65] Bezogen auf unsere Daten könnte dies hinweisend für relevante Veränderungen des Lipidstoffwechsels nach erfolgter Nierentransplantation bei Kindern sein.

Die verminderte Expression von GO-Terms der viralen Latenz im Kontext der vermehrten Expression viraler Replikationswege in der pädiatrischen Gruppe führt zu einer erhöhten Vulnerabilität

Weiterhin zeigen sich im Vergleich zwischen KNTx und NTx auch GO-*Terms* im Kontext von viraler Latenz bei Kindern vermindert exprimiert (siehe: *establishment of integrated proviral latency, establishment of viral latency und viral latency*), was vor allem im Anschluss an eine erfolgte Nierentransplantation von klinischer Relevanz ist. Bei Immunsuppression nach Transplantation sind vor allem Reaktivierungen latenter Viren wie dem Cytomegalievirus (CMV), dem Epstein-Barr Virus (EBV) oder dem BK-Polyomavirus (BKV) eine klinische Herausforderung. Unter anderem können entsprechende Virusreaktivierungen die Morbidität und Mortalität nach einer erfolgten Transplantation beeinflussen, insbesondere auch aufgrund des erhöhten Risikos einer akuten Abstoßungsreaktion oder einer Transplantatschädigung.[66]

Geht man in diesem Kontext von einer verminderten Expression von GO-*Terms* wie „*viral latency*“ bei pädiatrischen nierentransplantierten Patient*innen aus, deutet dies auf eine erhöhte Vulnerabilität für Virusreaktivierungen hin. Betrachtet man in diesem Zusammenhang zusätzlich die Dotplots der GSEA mit *Gene Ontology* (Abbildung 6b), so erkennt man unter den aktivierten Signalwegen insbesondere auch *Terms*, die mit viraler Replikation und intrazellulärem Transport assoziiert sind (siehe: *viral budding, viral budding via host ESCRT complex* und *virion assembly*). Im Zusammenhang mit der verminderten Expression der *Terms*, die eine geringere virale Latenz widerspiegeln, zeigt sich somit auf eine zusätzliche Vulnerabilität durch eine vermutliche Aktivierung viraler Replikationswege.

Im Gesamtgruppenvergleich (KNTx vs. NTx) zeigen multivesikulärer Transport und renale Epithelzelldifferenzierung bei pädiatrischen Proband*innen eine signifikant höhere Expression

Im Dotplot der *Enrichment* Analyse mittels GO (Abbildung 6b) zeigten sich aktivierte *Terms* im Bereich des multivesikulären Transports (*multivesicular body assembly,*

multivesicular body organization) sowie bei verschiedenen Ionen- und Metabolitentransportern (z. B. *sodium ion transport, metal ion transmembrane transporter activity*).

Carreras-Planella et al. (2020) untersuchten in ihrer Arbeit das Proteom von urinary extracellular vesicles (uEVs) bei nierentransplantierten Patient*innen unter Behandlung mit Calcineurin-Inhibitoren (CNI) wie Tacrolimus oder Cyclosporin A. Ziel war es, molekulare Veränderungen im Zusammenhang mit CNI-induzierter Toxizität (CNIT) zu identifizieren. Unter anderem wurde auch hier eine Überexpression von Vesikel-assoziierten *Gene Sets* wie „*multivesicular body organization*" gezeigt, welche sich auch im Zuge unserer Arbeit bestätigte.[67] Intraluminale Vesikel werden als Exosomen in den extrazellulären Raum freigesetzt, wenn Endosomen bzw. multivesikuläre Körper mit der Zellmembran verschmelzen.[68] Somit haben multivesikuläre Körper durch ihren direkten Zusammenhang mit der Freisetzung von Exosomen unter anderem einen Einfluss auf die Zell-Zell-Kommunikation, an der Regulation von Entzündungsprozessen und Immunreaktion sowie an der Entstehung von Fibrose und Gewebeschädigung.[69] Eine vermehrte Expression entsprechender *Terms* könnte somit ein Hinweis für die Anpassung an zellulären Stress sowie und metabolische Veränderungen sein.

Die ebenfalls bei den pädiatrischen Proband*innen signifikant vermehrt exprimierten *Terms* „*cilium*" und „*ciliary basal body*" betreffen ziliäre Strukturen, welche beide essenziell für die Funktion renaler Epithelzelldifferenzierung und -proliferation sind. Unter anderem sind primäre Zilien auch an den Hedgehog- und Wnt-Signalwegen beteiligt.[70]

Verschiedene metabolische Prozesse zeigen im Vergleich von KNTx vs. NTx in der pädiatrischen Gruppe eine verminderte Expression

Im Gegensatz dazu fanden sich unter den supprimierten Signalwegen im Dotplot der *Enrichment* Analyse vorwiegend metabolische Prozesse. Hierzu gehörten unter anderem (zelluläre) Stoffwechselwege (*cellular aromatic compound metabolic process, cellular nitrogen compound metabolic process und heterocycle metabolic process*), welche unter Umständen mit der Transplantatfunktion assoziiert sein könnten. Zuvor publizierte Daten suggerierten bereits, dass die Nierentransplantatfunktion einen Einfluss auf verschiedene Metaboliten im Plasma haben könnte.[71]

Die gleichzeitige Aktivierung viraler Replikationspfade und Veränderung immunologischer und metabolischer Prozesse könnte hiermit zur Entwicklung und zum Fortschreiten transplantatassoziierter Schäden beitragen, insbesondere auch vor dem Hintergrund einer veränderten epithelialen Aktivität und Zellkommunikation.

.

5.4.1.1 Fisher-Test der vermindert (*negative*) bzw. vermehrt exprimierten (*positive*) Proteine für den Vergleich von KNTx vs. NTx

Zur detaillierteren Beobachtung der biologischen Prozesse erfolgte die Durchführung eines Fisher-Tests für Proteine mit Nachweis einer verminderten bzw. einer vermehrten Expression in der GO-*Enrichment*-Analyse.

Die Proteinbiosynthese und -verarbeitung zeigt in der pädiatrischen Gruppe eine verminderte Expression

Untersucht man die GO-Terms mit einem negativen *Fold Change* genauer (Abbildung 7b), zeigt sich, dass diese hauptsächlich mit Prozessen der Proteinbiosynthese, Proteinlokalisierung und Proteinverarbeitung verknüpft sind. Auch *Terms* zur viralen Genexpression und Transkription sind vertreten. Insgesamt deutet dies auf eine reduzierte bzw. herabgesetzte Proteinbiosynthese und -verarbeitung hin und könnte verschiedene klinische Zusammenhänge haben. Eine verringerte Proteinbiosynthese bzw. ribosomale Aktivität könnte insgesamt auf eine reduzierte Zellproliferation hindeuten. Bei nierentransplantierten Kindern könnte es eine Reaktion auf die Immunsuppression durch entsprechende Medikation darstellen. Unter anderem ist bei nierentransplantierten Patient*innen eine Suppression der T-Zell-Proliferation unter Immunsuppression bekannt.[72]

Bei pädiatrischen Proband*innen zeigt sich eine vermehrte Expression im Glycerolipidstoffwechsel sowie in der Immunantwort

Im Unterschied dazu sind die GO-*Terms* mit positiven *Fold Change* (Abbildung 7a) vor allem mit Stoffwechselprozessen assoziiert (u.a. *glycerolipid metabolic process* und *glycerol3-phosphate metabolic process*), was auf eine erhöhte Glycerolipidverarbeitung und produktion hindeutet. Zudem zeigen sich Assoziationen zu verschiedenen Signalkaskaden (u.a. *purinergic receptor signaling pathway, cellular response to ATP, prostaglandin transport* und *prostaglandin secretion*), was auf verstärkte Entzündungs- und Signalprozesse schließen lässt. Auch GO-*Terms* aus den Bereichen der Zellmigration und Immunantwort, etwa *positive regulation of endothelial cell chemotaxis* und *positive regulation of macrophage migration,* sind unter den GO-*Terms* mit positivem *Fold Change* vertreten.

Die GO-*Terms* mit Nachweis einer vermehrten Expression sind vor allem in Lipidstoffwechsel, Signalgebung und Immunprozesse involviert und scheinen somit adaptive

Funktionen zu erfüllen. Unter anderem ist bereits bekannt, dass Lipide in der Regulation von Immunzelldifferenzierung, -Aktivierung und Expansion eine direkte Rolle spielen; diese können hierbei exogenen oder endogenen Ursprungs sein.[73] Nüsken et. al. (2024) untersuchten unter anderem die zentrale Rolle des Lipidstoffwechsels in der Niere bei Kindern und dessen Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf von pädiatrischen

Nierenerkrankungen, insbesondere der minimal change Glomerulonephritis, der FSGS und der membranösen Glomerulonephritis. Hier zeigte sich u.a., dass Glycerophospholipide wichtige strukturelle Bestandteile der Zellmembran sind und eine entscheidende Rolle bei der Signalübertragung und der Membranfluidität spielen. Somit kann eine Dysregulation dieser zur Entstehung und Progression von Nierenerkrankungen beitragen.[74]

5.4.2 KEGG-Enrichment

Im Rahmen des KEGG-*Enrichments von KNTx vs. NTx (siehe Abbildung 6c)* zeigten sich insgesamt 40 signifikant angereicherte Signalwege, von denen 31 einen negativen Enrichment-Score und 9 einen positiven Enrichment-Score vorweisen konnten. Die signifikant angereicherten Signalwege sind im Vergleich beider Gruppen in den pädiatrischen Daten jeweils über- (positiv) bzw. unterrepräsentiert (negativ).

KEGG-Signalwege mit negativem Enrichment Score repräsentieren vielfältige Prozesse der Proteinbiosynthese und des Stoffwechsels

Die KEGG-Signalwege mit negativem *Enrichment-Score* sind hierbei vor allem mit grundlegenden zellulären Prozessen wie der Proteinbiosynthese und RNA-Verarbeitung (u.a. *Ribosome, Spliceosome, RNA transport* und *Protein processing in endoplasmic reticulum*) assoziiert. Außerdem zeigen sich reichlich Stoffwechselwege mit einem negativen *Enrichment-Score*, insbesondere in Bezug auf den Abbau von Aminosäuren (*Valine, leucine and isoleucine degradation*) und den Fettsäurestoffwechsel (z.B. *Fatty acid degradation* und *Fatty acid metabolism*). Weiterhin zeigt sich der *Insulin signaling pathway* unter den KEGG-*Signalwege* mit einem negativen *Enrichment-Score*.

Signalwege bezogen auf verschiedene Krankheitsmechanismen und Erkrankungen sind in den pädiatrischen Daten unterrepräsentiert

Darüber hinaus zeigen sich negative *Enrichments* bei mehreren Infektionskrankheiten (z.B. *COVID-19, Leishmaniasis, Legionellosis*) und immunologischen Prozessen (z.B. *Complement and coagulation cascades*, *Neutrophil extracellular trap formation*). Zusätzlich zeigen sich auch neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Morbus Huntington und die amyotrophe Lateralsklerose (ALS) in den *Signalwege* vertreten. Zusammenfassend könnte dies hinweisend sein für eine verminderte Aktivität von Stoffwechsel und immunologischen Prozessen, sowie eine reduzierte Aktivität der Proteinbiosynthese.

Signalwege mit positivem Enrichment Score deuten auf vermehrte Signaltransduktion und Zellkommunikation in der pädiatrischen Gruppe hin

Im Gegensatz dazu sind die *Signalwege* mit positivem *Enrichment-Score* vor allem mit zellulären Abbau- und Transportmechanismen wie *Endocytosis, Lysosome* und *Mitophagy* verbunden. Auch Signalwege, die unter anderem mit dem Zellwachstum assoziiert sind, wie der *mTOR signaling pathway* und der *Phospholipase D signaling pathway*[75] zeigen eine erhöhte Aktivität. Außerdem zeigen sich weitere metabolische Funktionen (u.a. *Protein digestion and absorption* und *Pyrimidine metabolism*) verstärkt aktiviert. Zusammenfassend könnten diese Veränderungen auf eine vermehrte Zellkommunikation, Signaltransduktion sowie einen zunehmenden zellulären Abbau hinweisen. Unter anderem spielt der mTOR-Signalweg eine wichtige Rolle im Zellmetabolismus, -Wachstum und in der -Proliferation,[76] wohingegen der Phospholipase-D-Signalweg an der interzellulären Signalweiterleitung, insbesondere im Rahmen von zellulärem Stress, beteiligt ist.[77]

5.4.3 Enrichment-Analysen von KNTx vs. NTx <1 Monat post-OP

Im Zuge der Enrichment-Analysen mittels KEGG und GO für KNTx vs. NTx <1 Monat post-OP zeigten sich im GO-Enrichment 7 Terms bzw. Signalwege signifikant angereichert (Tabelle 5), im KEGG-Enrichment zeigten sich 16 Signalwege signifikant angereichert (Tabelle 6).

***GO-Terms für Membranstruktur und molekularen Transport zeigen sich signifikant angereichert im* Subgruppenvergleich KNTx vs. NTx <1 Monat post-OP**

Die signifikant angereichert GO-*Terms* gehören überwiegend zur Kategorie der molekularen Funktionen. In der Analyse signifikant angereicherter GO-*Terms* im Subgruppenvergleich KNTx vs. NTx <1 Monat post-OP zeigen sich vor allem Veränderungen in der Membranstruktur sowie im molekularen Transport. Insbesondere die *Terms spectrin-associated cytoskeleton* und *ankyrin binding* sind assoziiert mit Zellmembran und Zytoskelett, was unter anderem auf eine Veränderung der Zellorganisation hindeuten könnte. Außerdem sind Spektrin und Ankyrin auch mit der Zell-Zell-Interaktion assoziiert.[78] Die übrigen GO-*Terms* beziehen sich auf Transmembrantransporter für organische und anorganische Anionen sowie (L-)Aminosäuren.

Diese Transportmechanismen sind unter anderem wichtig für die Zell-Homöostase sowie die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen[79] und könnten für funktionelle Anpassungen nach der Transplantation hinweisend sein.

Signifikant angereicherte KEGG-Signalwege sind hinweisend für Veränderungen in immunologischen, metabolischen und strukturellen Prozessen

Ergänzend stellen sich im Rahmen der Subgruppenanalyse für KNTx vs. NTx <1 Monat post-OP mehrere KEGG-*Signalwege* signifikant unterschiedlich angereichert dar. Hier zeigen sich unter anderem Hinweise für Veränderungen in immunologischen, metabolischen und strukturellen Prozessen. Immunologisch assoziierte *Signalwege* wie *Complement and coagulation cascades, Phagosome* und der *AGE-RAGE* (*advanced glycation endproductsreceptor for AGE) signaling pathway in diabetic complications* sprechen für eine aktivierte Immunantwort[80] und möglicherweise für Entzündungsmechanismen. Hierbei ist vor allem das Komplemetsystem essenziell für die Immunüberwachung und Immunhomöostase.[81] Außerdem ist bekannt, dass das *AGE-RAGE signaling* bei Diabetes mitunter in der Verursachung vaskulärer Komplikationen durch die Aktivierung von Immunzellen, Inflammation und endothelialer Zelldysfunktion involviert ist.[82] *Signalwege* wie *Glutathione metabolism*, *Pyrimidine metabolism* und *Phenylalanine metabolism* sind erneut hinweisend für eine Anpassung metabolischer Prozesse. Zudem ist auch der mTOR signaling pathway signifikant exprimiert, welcher, wie oben bereits erwähnt, mit dem Zellwachstum assoziiert ist.[76,83] mTOR-Inhibitoren wie Everolimus oder Sirolimus werden auch im Rahmen von immunsuppressiven Konzepten nach Nierentransplantation zur Hemmung der Zellproliferation eingesetzt, häufig auch in Kombination mit Tacrolimus.[84] Ein *Pathway* betraf außerdem direkt die renalen Sammelrohre (*Collecting duct acid secretion*) und könnte somit auch direkt die Funktion des Nierentransplantats betreffen.

Veränderungen könnten auf klinische Unterschiede zwischen den pädiatrischen Probanden*innen und der Kontrollgruppe NTx <1 Monat post-OP hinweisen

Zusammenfassend zeigen sich Veränderungen in Zellstruktur, Transportfunktionen, Zellimmunität und Regulation des Stoffwechsels. Unter anderem könnten diese Veränderungen direkte Auswirkungen durch die Transplantation, mögliche Komplikationen nach erfolgter Transplantation oder Veränderungen durch beispielsweise die immunsuppressive Therapie widerspiegeln.

Mögliche Unterschiede in dieser Subgruppenanalyse könnten auch auf den zeitlichen Unterschied zwischen der kürztlich transplantierten adulten Kontrollgruppe und den pädiatrischen Proband*innen mit insgesamt längerem Abstand zur Nierentransplantation zurückzuführen sein, insbesondere im Hinblick auf die Immunantwort. Unter anderem könnte hier auch ein Unterschied in der Anpassung des Transplantatorgans an die neue Umgebung eine Rolle spielen. Auch kann eine höhere Immunsuppressionsdosis bei den Kontrollproband*innen kurz nach der Nierentransplantation im Vergleich zur niedrigeren

Dosierung bei den pädiatrischen Proband*innen für Veränderungen in der Proteinexpression bzw. in der Signifikanz der *Signalwege* ausschlaggebend sein.

5.5 Korrelationsanalysen der Proteinintensitäten von KNTx

5.5.1 KNTx vs. Abstand zur Transplantation

Im Rahmen unserer Korrelationsanalysen der Proteinintensitäten von KNTx vs. dem Abstand zur Transplantation zeigten sich zwei der Korrelationen signifikant. Zu den signifikanten Korrelationen zählen hierbei Septin 7 und Histamin-N-Methyltransferase (HNMT) und zeigen sich beide mit einem positiven Korrelationskoeffizienten.

5.5.1.1 Septin 7 spielt eine Rolle bei der Pathogenese renaler Erkrankungen

Septin 7 gehört zu der Familie der Septine, und ist ein GTP-bindendes Protein, das eine wichtige Rolle in der Zellteilung, der Organisation des Zytoskeletts und dem intrazellulären Vesikeltransport spielt. Es ist für die normale Funktion verschiedener Gewebe, insbesondere in Nierenzellen, notwendig und wird mit verschiedenen Krankheitsprozessen in Verbindung gebracht.[85]

In Analysen der *messenger RNA* (mRNA)-Expression humaner Gewebe zeigte sich, dass mehrere Septin-Isoformen, darunter auch SEPT2 und SEPT7, in der Niere exprimiert werden. In Tiermodellen von Maus und Zebrafisch konnte Septin 7 sowohl in glomerulären als auch tubulären Kompartimenten nachgewiesen werden. Auch in humanem Nierengewebe wurde eine glomeruläre Lokalisation von Septin 2 beschrieben.[85]

In kultivierten Podozyten zeigt Septin 7 eine konstante Expression sowohl in proliferierenden als auch differenzierten Zellen. In Podozyten bildet Septin 7 gemeinsam mit Septin 9 und Septin 11 sowie mit *CD2-associated protein* (CD2AP) und Nephrin funktionelle Komplexe. Somit ist von einer Rolle von Septin 7 bei der Aufrechterhaltung der glomerulären Filtrationsbarriere auszugehen, was auf eine potenzielle Relevanz für glomeruläre Erkrankungen hinweist.[85,86]

Septine, insbesondere SEPT2, SEPT7 und SEPT11, spielen eine zunehmend anerkannte Rolle in der Pathogenese renaler Erkrankungen. In Nierenzellkarzinomen (*Renal cell carcinoma,* RCC) sind SEPT2 und SEPT11 überexprimiert. Die verstärkte Expression von SEPT2 ist dabei abhängig vom Tumorsuppressorgen von Hippel-Lindau (VHL), einem zentralen Regulator in der Entstehung von RCCs.[85]

Darüber hinaus zeigen Untersuchungen an Zebrafischmodellen, dass ein *Knockdown* von sept7b (Septin 7b) zu zystischen Veränderungen in der Niere führt, ähnlich wie bei Ziliopathien. SEPT2 interagiert zudem mit *DAZ-interacting zinc finger protein 1-like* (DZIP1L), einem Protein, das auch bei ARPKD mutiert ist. Obwohl bisher keine septinbezogenen

Mutationen bei menschlichen Zystennierenerkrankungen identifiziert wurden, deuten Daten auf eine Beteiligung von Septinen an ziliären Signalwegen hin. Auch in Modellen von Ziliopathien wie dem Meckel-Gruber- und dem Bardet-Biedl-Syndrom wurde eine gestörte Lokalisation von SEPT2 und SEPT7 beobachtet.[85]

Insgesamt legen diese Befunde nahe, dass Septine nicht nur bei malignen, sondern auch bei ziliär bedingten, strukturellen Nierenerkrankungen funktionell relevant sind. Hierbei kann auch eine direkte genetische Veränderungen vorliegen.[85] Daten zu Septin 7 oder Septinen speziell im Zusammenhang mit pädiatrischer Nierentransplantation gibt es zum aktuellen Zeitpunkt nicht. Eine positive Korrelation zwischen der Zeit nach der Transplantation und der Proteinintensität von Septin-7 könnte unter anderem auf verstärkte Zellteilungs- und Migrationsprozesse hinweisen, aber auch auf auf pathologische Veränderungen wie Fibrose[87] hindeuten.

5.5.1.2 HNMT ist an der Pathogenese salzinduzierter und hypertensiver Nierenschäden beteiligt

In den Korrelationsanalysen der Proteinintensitäten von KNTx vs. dem Abstand zur Transplantation zeigte sich ebenso die Histamin-N-Methyltransferase unter den signifikanten Korrelationen. HNMT ist ein zytoplasmatisch lokalisiertes Enzym, das Histamin durch N-Methylierung inaktiviert und somit eine zentrale Rolle im intrazellulären Histaminabbau spielt. Es ist ein wichtiger Bestandteil beim Abbau von Histamin und bei der Atemwegsregulation als Reaktion auf Histamin. Zudem ist HNMT besonders stark in der Niere exprimiert.[88]

Daten von Spires et al. (2023) zeigen, dass das histaminerge System in der Niere aktiv an der Pathogenese salzinduzierter Nierenschäden beteiligt ist. In einem Dahlsalzempfindlichen Rattenmodell führte die Blockade des Histamin-H_2-Rezeptors zu einer signifikanten Reduktion von Proteinurie, glomerulären und tubulären Schäden sowie renaler Entzündungen. Gleichzeitig wurde eine veränderte Expression von HNMT beobachtet. Diese Befunde sind hinweisend für eine pathophysiologisch relevante Rolle von Histamin-H_2-

Signaling und HNMT im Rahmen hypertensiver und möglicherweise transplantationsassoziierter Nierenschäden.[89]

Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es keine spezifischen Daten, die die Rolle von HNMT bei nierentransplantierten Kindern oder Erwachsenen direkt untersuchen. Angesichts der Bedeutung von Histamin bei Immunreaktionen und Entzündungsprozessen könnte HNMT jedoch potenziell Einfluss auf Transplantatabstoßungen oder andere Komplikationen haben.

Die zunehmende HNMT-Expression mit größerem Abstand zur Nierentransplantation könnte somit eine verstärkte Regulierung der Histaminaktivität und damit eine Modulation immunologischer Reaktionen im Transplantat signalisieren.[90]

5.5.2 KNTx vs. Alter

Durch weitere Korrelationsanalysen der Proteinintensitäten von KNTx vs. Alter zeigten sich insgesamt 53 Proteine signifikant mit dem Alter assoziiert. Davon zeigten sich 52 mit einem positiven und ein Protein mit einem negativen Korrelationskoeffizienten.

5.5.2.1 Positive Korrelationen mit dem Alter

Es erfolgte eine funktionelle Gruppierung der Proteine mit einem positivem Korrelationskoeffizienten. Dieser beinhaltet alle Proteine, bei denen eine vermehrte Expression mit einem höheren Alter der Proband*innen assoziiert ist.

Es zeigt sich eine erhöhte Proteinfaltungsaktivität sowie ein erhöhter zellulärer Metabolismus

Auffällig ist hier eine starke Präsenz von Proteinen bzw. Enzymen, die an der Proteinfaltung beteiligt sind, insbesondere Mitglieder des *Chaperonin-containing* TCP1Komplexes (CCT), darunter vier *T-complex protein 1 Subunits* (α = alpha, δ = delta, θ = theta, ζ = zeta), sowie weitere Chaperone wie Hsp90β und FKBP4. Diese Proteine deuten auf einen erhöhten Bedarf an korrekter Proteinfaltung und Qualitätskontrolle hin, möglicherweise im Rahmen von zellulärem Stress oder vermehrter Synthese von Proteinen.[91,92] Ihre Zunahme könnte somit auch auf einen erhöhten Bedarf der Proteinhomöostase mit dem Alter hindeuten.

Ein weiterer Schwerpunkt liegt im zellulären Metabolismus. Es zeigen sich mehrere Enzyme des Kohlenhydratmetabolismus, die im Glycogenstoffwechsel und der Glycolyse involviert sind (u.a. *ATP-dependent 6-phosphofruktokinase*[93], *Glycogen phosphorylase*[94], *Glutamin--fructose-6-phosphate aminotransferase*[95] und *Phosphoglucomutase-1*[96]), sowie Enzyme des Lipid- bzw. Fettsäuremetabolismus (z.B. darunter *ATP-citrate synthase*[97] und *Fatty acid synthase*[98]) unter den signifikanten Korrelationen.

Zytoskelettassoziierte Proteine wie Filamin B, Coronin-1C und Septin 7 zeigen sich im Alter vermehrt exprimiert

Darüber hinaus wurden mehrere zytoskelettassoziierte Proteine wie Filamin B, Coronin-1C und auch Septin 7 detektiert, die im direkten Zusammenhang mit dem AktinZytoskelett sowie Zellmigration und -adhäsion stehen.[99,100] Zhou et. al. (2007) zeigten bereits, dass ein Mangel an Filamin B in einem Mausmodell zu Skelettfehlbildungen und einer beeinträchtigten mikrovaskulären Entwicklung führte.[101] Die Bedeutung von Septin 7 in renalen Zellen wurde oben bereits ausführlich eruiert.[85,86] Wang et al. (2019) untersuchten in einer Arbeit die Expression und Funktion von Coronin-1C in Nierenzellkarzinomen. Die Ergebnisse zeigten, dass miR-26 die Expression von Coronin-3 direkt hemmt, was eine verminderte Proliferation, Migration und Invasion von RCC-Zellen zur Folge hat. Die Überexpression von

Coronin-3 konnte diese hemmenden Effekte von miR-26 umkehren, was letztlich darauf hinweist, dass Coronin-3 eine wichtige Rolle bei der Progression von RCCs spielt.[102]

Diese Ergebnisse könnten auch hinweisend sein, dass Coronin-3 eine wichtige Rolle in der Nierenphysiologie und -pathologie einnimmt. Die vermehrte Expression dieser zytoskelettassoziierten Proteine mit steigendem Alter könnte adaptive Veränderungen in der Zellstruktur widerspiegeln, insbesondere auch im Kontext von Nierentransplantationen.

COPA zeigt sich als Protein des Vesikeltransports mit einer positiven Korrelation

Proteine des Coatomerkomplexes wie *Coatomer subunit alpha* (COPA) unterstreichen zusätzlich die Bedeutung von Veränderungen vesikulärer Transportmechanismen. COPA ist unter anderem am retrograden Vesikeltransport vom Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Retikulum (ER) beteiligt. Eine Arbeit von Lepelley et. al. (2020) zeigte, dass Mutationen im *COPA*-Gen, das für eine Untereinheit des COPI-Komplexes (*Coatomer protein complex* I) kodiert, zu einer fehlgeleiteten Immunantwort führen können. In diesem Zusammenhang entsteht eine autoinflammatorische Erkrankung, das COPA-Syndrom, welches u.a. mit interstitieller Lungenerkrankung und Nierenbeteiligung assoziiert ist.[103]

Weitere identifizierte Proteine sind unter anderem dem Proteinabbau (z.B. wie *Dipeptidyl peptidase 3*[104]) sowie der zellulären Signalweiterleitung (darunter *Rho guanine nucleotide exchange factor 10-like protein*[105]) zuzuordnen.

Eine vermehrte Expression der Glutathionsynthetase deutet auf eine Anpassung an oxidativen Stress im Alter hin

Weiterhin zeigen sich in unseren Daten Proteine des Glutathionmetabolismus wie die *Glutathione synthetase* (GSS) eher vermehrt mit zunehmendem Alter exprimiert. Glutathion dient als wichtiges intrazelluläres Antioxidans,[106] während erhöhte Homocysteinspiegel mit oxidativem Stress und kardiovaskulären Erkrankungen und in diesem Zusammenhang auch mit chronischen Nierenerkrankungen assoziiert sind.[107]

Huang et al. (2019) zeigte unter anderem den Zusammenhang zwischen Plasmaspiegeln von Homocystein und Glutathion mit der Nierenfunktion bei nierentransplantierten Patient*innen. In einer Kohorte von 66 Transplantatempfängerinnen waren sowohl erhöhte Homocystein- als auch reduzierte Glutathionspiegel unabhängig mit einer niedrigeren eGFR assoziiert.[108] In unseren Daten zeigte sich kein expliziter Zusammenhang zwischen Glutathion und der Nierenfunktion bzw. der eGFR, jedoch könnte eine Zunahme der Glutathion-Synthetase auf einen erhöhten Bedarf an antioxidativen Mechanismen mit dem Alter hinweisen. Ein Glutathionmangel ist unter anderem mit vermehrtem oxidativem Schaden assoziiert und spielt eine Rolle bei der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson sowie bei der Entstehung von

Nierenzellkarzinomen.[109] Eine vermehrte Expression der GSS könnte somit ein Hinweis auf eine Anpassung an vermehrten zellulären und oxidativen Stress sein.

Eine Studie untersuchte bereits die Glutathionspiegel älterer Probanden*innen (60-75 Jahre) und jüngeren Kontrollpersonen (30-40 Jahre) und zeigte, dass die älteren Proband*innen signifikant niedrigere intrazelluläre GSH-Spiegel sowie reduzierte Syntheseraten vorweisen.[110] Obwohl sich in unseren Daten eine positive Korrelation mit dem Alter der Proband*innen und der GSS-Expression zeigte, zeigen sich die Erkenntnisse aus der oben genannten Studie auch mit unseren Ergebnissen übereinstimmend. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass das Alter unserer Proband*innen im Median 13 Jahre betrug, und der älteste zum Zeitpunkt der Probenabnahme 27 Jahre alt war. Die Zunahme der GSSExpression könnte somit auf einen erhöhten Bedarf an antioxidativen Mechanismen mit zunehmendem Alter der pädiatrischen Proband*innen hinweisen.

Schlussendlich ergibt sich aus dem positiv korrelierten Proteinspektrum ein funktionelles Bild, dass sich aus verschiedenen Proteinen mit Beteiligung an Proteinfaltung, metabolischer Aktivität, zytoskelettärer Organisation und zellulärer Stressantwort zusammensetzt. Diese Prozesse könnten insbesondere im Kontext von Immunreaktionen und chronischer Nierenerkrankung, vor allem nach erfolgter Nierentransplantation, eine zentrale Rolle spielen. Zusammenfassend deuten diese altersabhängigen Veränderungen auf Anpassungen im Metabolismus sowie in verschiedenen biosynthetischen Prozessen hin.

5.5.2.2 Negative Korrelation von TYMP mit dem Alter

Im Gegensatz dazu zeigt die *Thymidine phosphorylase* (TYMP) als einziges Protein eine negative Korrelation mit dem Alter. Somit ist ein geringeres Alter in unseren Daten mit einer höheren TYMP-Expression verbunden.

Thymidinphosphorylase (TYMP), auch bekannt unter dem Namen *platelet-derived endothelial cell growth factor*, ist ein Enzym, das eine zentrale Rolle im Nukleotidstoffwechsel spielt. Es katalysiert die reversible Phosphorolyse von Thymidin zu Thymidin und 2Desoxyribose-1-phosphat und ist somit essenziell für den *Salvage Pathway* der Pyrimidinbasen. Darüber hinaus fördert TYMP die Angiogenese, indem es das Wachstum von Endothelzellen stimuliert.[111] Der Einfluss des Alters auf die Expression von TYMP ist bislang nicht umfassend untersucht worden. Lindskog et al. (2012) untersuchte die TYMP-Expression in der Mukosa von Patienten mit kolorektalem Karzinom und zeigte ebenfalls eine negative Korrelation der Expression in der Rektalmukosa bezogen auf das Alter, interessanterweise jedoch nicht in den Tumorproben. Es zeigte sich hier, dass die TYMP-Genexpression in der

Mukosa mit zunehmendem Alter der Patienten abnahm.[112] Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Alter einen Einfluss auf die TYMP-Expression in bestimmten Geweben haben könnte.

Bezogen auf Nierenerkrankungen wurde bereits herausgefunden, dass TYMP in klarzelligen RCCs überexprimiert ist und mit einer schlechten Prognose korreliert. Die hohe Expression von TYMP ist auch mit einer veränderten Immunzellinfiltration assoziiert.[113] Daten von Napoleon et al. (2025) zeigten, dass TYMP in Hautläsionen von Patient*innen mit Calciphylaxie, einer seltenen Erkrankung, die vor allem bei terminaler Niereninsuffizienz auftritt und dermale Mikrogefäßthrombosen mit schweren kutanen Nekrosen verursacht, ebenfalls überexprimiert ist. Diese Überexpression ging mit erhöhten Interleukin-6-Spiegeln und einer Aktivierung des Gewebefaktors einher,[114] was auf eine Beteiligung von TYMP an entzündlichen und thrombotischen Prozessen hindeutet. Daten zu TYMP bei pädiatrischen Nierenerkrankungen oder speziell bei Nierentransplantierten Patient*innen liegen aktuell nicht vor.

5.5.3 KNTx vs. eGFR

Es erfolgte weiterhin eine Korrelationsanalyse der Proteinintensitäten von KNTx vs. eGFR, in der sich 12 signifikante Korrelationen zeigten, von denen 7 einen positiven und 5 einen negativen Korrelationskoeffizienten vorweisen.

5.5.3.1 Positive Korrelationen zur eGFR

Die Proteine mit positiver Korrelation zur eGFR spielen vor allem unterschiedliche Rollen im tubulären Epithel und sind beteiligt an unterschiedlichen metabolischen Prozessen. Hier ist eine vermehrte Proteinexpression mit einer höheren eGFR assoziiert.

Es zeigt sich eine positive Korrelation verschiedener Proteine der Zelladhäsion, des Ionentransports und Biosynthese zur eGFR

Cadherin-16, auch nierenspezifisches Cadherin (ksp-Cadherin) genannt, ist ein kalziumabhängiges, membrangebundenes Zelladhäsionsprotein, das für die Embryonalentwicklung der Nieren sowie die Formation tubulärer Epithelzellen essenziell ist und in adulten Nieren hochgradig exprimiert wird.[115] Bezogen auf unsere Daten könnte eine hohe Expression für intakte tubuläre Strukturen bei guter Nierenfunktion sprechen.

Ebenso deutet die erhöhte Expression des Natrium-Chlorid-Kotransporters SLC12A3 (*Solute carrier family 12 member 3*) auf eine funktionelle Rückresorption im distalen Tubulus hin, die eng mit einer erhöhten eGFR verknüpft ist. SLC12A3 spielt eine zentrale Rolle im distalen Tubulus der Niere, wo es Natrium und Chlorid rückresorbiert.[116] Das SLC12A3-Gen

für *Solute carrier family 12 member 3* codiert für den Na-Cl Co-transporter (NCCT) und ist ebenso assoziiert mit der Entstehung des Gitelman-Syndroms, einem seltenen renal-tubulären Syndrom mit Salzverlust. Charakteristisch sind hierbei unter anderem eine Hypokaliämie, metabolische Alkalose sowie Hypokalzurie in Zusammenhang mit einer Aktivierung des ReninAngiotensin-Aldosteron Systems (RAAS).[117] Weiterhin zeigte sich bereits, dass Polymorphismen in SLC12A3 mit dem Risiko und dem Verlauf einer diabetischen Nephropathie assoziiert sein können.[116]

SLC44A2 codiert für das *choline transporter-like protein* (CTL2), welches wiederum eine wichtige Rolle bei der Thrombozytenaggregation und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten spielt. Es ist unter anderem in der Niere, in der Lunge und auf Erythrozyten exprimiert.[118] Darüber hinaus zeigen sich außerdem die Proteine *Neutral Alpha-Glucosidase AB* (GANAB), ein Enzym der Glykoproteinbiosynthese,[119] und *D-3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase* (PHGDH), welches an der Serinbiosynthese beteiligt ist,[120] signifikant korreliert. Letzteres könnte auf eine metabolische Anpassung hinweisen, wie sie bei gut erhaltener Nierenfunktion erforderlich ist.

5.5.3.2 Negative Korrelationen zur eGFR

In der Gruppe der Proteine mit einer inversen Korrelation zur eGFR waren vor allem verschiedene Proteine signifikant korreliert, die mit inflammatorischen Prozessen, Zelldifferenzierung oder strukturellen Umbauprozessen assoziiert sind. Hier ist eine vermehrte Expression mit einer eher verminderten eGFR assoziiert.

Erhöhte β_2-Mikroglobulin-Spiegel im Urin sind mit interstitieller Fibrose und tubulärer Atrophie (IFTA) assoziiert

Beta-2-Mikroglobulin ist ein klassischer Marker für eine eingeschränkte Nierenfunktion und akkumuliert bei eingeschränkter glomerulärer Filtration im Plasma. Es ist ein niedermolekulares Protein, das unter normalen Bedingungen glomerulär filtriert und fast vollständig im proximalen Tubulus resorbiert wird. Bei eingeschränkter Nierenfunktion, insbesondere bei Schädigungen der Tubuli, kann die Reabsorption beeinträchtigt sein, was zu erhöhten β2M-Konzentrationen im Urin führt.[121] Gleichzeitig führt eine verminderte glomeruläre Filtration zu erhöhten β2Microglobulin-Spiegeln im Plasma, da die Ausscheidung des Proteins vermindert ist.[122] Diese Eigenschaften unterstreichen die Bedeutung von β2Mikroglobulin als sensitiven Marker für tubuläre Schädigungen und progrediente Nierenfunktionseinschränkungen. Somit hat sich β2-Microglobulin bereits als Indikator für die tubuläre Funktion etabliert und bestätigt seine Relevanz auch in unseren Daten.

In einem Scoping-Review untersuchten Rainey et. al. (2023) den aktuellen Stand der proteomischen Forschung im Kontext von Nierentransplantationen. Insgesamt wurden 101

Studien analysiert, wobei der Großteil retrospektive Einzelzentrenstudien mit begrenzter Stichprobengröße waren. Die am häufigsten eingesetzte Methode zur Proteinanalyse war die Massenspektrometrie. Die untersuchten Proben umfassten verschiedene biologische Materialien wie Serum, Urin und Flüssigkeiten, die zur Perfusion von Spendernieren verwendet wurden. Hier wurde in unterschiedlichen Studien erhöhte β_2-Mikroglobulin (β_2M)Spiegel im Urin mit interstitieller Fibrose und tubulärer Atrophie (IFTA) sowie mit akuten Abstoßungen bei Nierentransplantierten in Verbindung gebracht.[123] Auch Kanzelmeyer et al. (2019) bestätigten diese Befunde in einer Studie mit pädiatrischen nierentransplantierten Patient*innen, in der mittels Kapillarelektrophorese und MS eine Assoziation von β_2Mikroglobulin mit IFTA festgestellt wurde.[124]

Proteine der Zellreifung (GMFB) und des Zytoskeletts (CDC42) zeigen eine inverse Korrelation mit der eGFR

Glia Maturation Factor Beta (GMFB) ist ein gehirnspezifisches Protein und an der Neuronen- und Gliazelldifferenzierung beteiligt. Eine Studie zeigte, dass GMFB im Tumorgewebe von klarzelligen Nierenzellkarzinomen signifikant niedriger exprimiert ist als in gesundem Nierengewebe. Gleichzeitig war eine niedrige GMFB-Expression mit einer ungünstigen Prognose, einschließlich einem kürzerem Gesamtüberleben, assoziiert.[125] Ob ein Zusammenhang der GMFB-Expression und der der Nieren- bzw. Nierentransplantatfunktion besteht, wurde bislang nicht untersucht.

Cell division cycle 42 (CDC42) gehört zur Familie der Rho-GTPasen und spielt durch die Regulation der Zellpolarität und der Organisation des Aktin-Zytoskeletts eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Funktion renaler Tubulusepithelzellen. Unter anderem zeigten Elias et. al. (2015), dass eine Deletion von CDC42 in murinen Zellen in einer abnormen Tubulogenese resultiert.[126] Choi et al. (2013) zeigten, dass eine CDC42-Defizienz in renalen Tubulusepithelzellen bei Mäusen zu zystischen Nierenveränderungen führt, die durch eine gestörte Ziliogenese, erhöhte Zellproliferation und Fibrose charakterisiert sind und der Nephronophthise, einer Form der zystischen Nierenerkrankung im Kindesalter, ähneln.[127]

ST6GAL1 kann bei IgA-Nephropathie mit einer schlechteren eGFR assoziiert sein

ST6GAL1 ist eine Sialyltransferase, die für die α2,6-Sialylierung von Glykoproteinen verantwortlich ist.[61] Bei Patienten mit IgA-Nephropathie zeigten sich erhöhte Plasma-ST6GAL1-Spiegel mit einer geringeren eGFR, einer ausgeprägteren Proteinurie und einem fortgeschritteneren Krankheitsverlauf assoziiert.[128] Dies zeigt sich auch passend zu unseren Ergebnissen. Weiterhin zeigte sich, dass bestimmte genetische Polymorphismen im ST6GAL1-Gen mit einer erhöhten Anfälligkeit für IgA-Nephropathie und einem ungünstigeren Verlauf der Erkrankung korrelieren,[129] was zusätzlich die Rolle von ST6GAL1 bei der

Entstehung von renalen Pathologien unterstreicht. Dieser Zusammenhang ist zum aktuellen Zeitpunkt jedoch nicht weiterreichend erforscht.

Pyridoxal kinase (PDXK) ist ein Enzym des Vitamin-B6-Stoffwechsels,[130] und könnte durch seine erhöhte Expression bei eingeschränkter Nierenfunktion eine Kompensation oxidativen Stresses darstellen.

Über die Funktion von *Uteroglobin* (SCGB1A1), einem antiinflammatorischen Sekretoprotein,[131] und von *Small integral membrane protein 24* (SMIM24) im Rahmen von Nierenerkrankungen ist noch wenig bis kaum bekannt.

5.6 Protein-Matches zeigen mögliche Relevanz der identifizierten Proteine auf

Um die mögliche klinische Relevanz der in Rahmen der differentiellen Analyse zwischen kindlichen (KNTx) und erwachsenen Nierentransplantatempfänger*innen (NTx) identifizierten, signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine zu untersuchen, erfolgte ein Vergleich mit den Proteinen, die in unseren Korrelationsanalysen signifikante Zusammenhänge mit klinischen Parametern der pädiatrischen Proband*innen (KNTx) aufzeigten.

5.6.1 COPA als Protein-Match im Vergleich zwischen signifikant unterschiedlich exprimierten Proteinen (KNTx vs. NTx) und den signifikanten Korrelationen mit dem Alter

Beim Vergleich der Protein-Matches signifikant differentiell exprimierter Proteine (KNTx vs. NTx) versus signifikanter Korrelationen der Proteinintensitäten von KNTx vs. Alter stellte sich das vesikuläre Transportprotein *Coatomer subunit alpha* (COPA) als übereinstimmendes, differentiell exprimiertes Protein dar und zeigt in beiden Gruppen eine gleichgerichtete Expression. Wie oben bereits beschrieben, ist der Coatomer-Komplex, einschließlich COPA, am retrograden vesikulären Transport beteiligt. Es ist außerdem beschrieben, dass Mutationen im COPA-Gen eine autoinflammatorische Erkrankung, das sogenannte COPA-Syndrom, auslösen können.[103] Die Übereinstimmung sowohl in der differentiellen Analyse als auch in der Alterskorrelation könnte hinweisend dafür sein, dass der intrazelluläre Vesikeltransport altersabhängig relevante Veränderungen bei nierentransplantierten Kindern vorweist und die Funktion von COPA im Rahmen von weiteren Studien, insbesondere im Hinblick auf eine mögliche Funktion als Biomarker in suEVs von Kindern, weitreichender untersucht werden sollte. Unter anderem könnten Veränderungen im vesikulären Transport Auswirkungen auf die Zellphysiologie und somit möglicherweise auf die langfristige Transplantatfunktion haben. Ein direkter Zusammenhang von COPA mit der primären Bildung von suEVs wurde bislang in der Literatur nicht beschrieben.

5.6.2 ST6GAL1 als Protein-Match im Vergleich zwischen differentiell exprimierten Proteinen (KNTx vs. NTx) und den signifikanten Korrelationen mit der eGFR

Im Vergleich der Protein-Matches signifikant differentiell exprimierter Proteine (KNTx vs. NTx) vs. signifikanter Korrelationen der Proteinintensitäten von KNTx vs. eGFR zeigte sich *Beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase* (ST6GAL1*)* übereinstimmend. Wie oben bereits beschrieben, wurde ST6GAL1 bislang vor allem bei der Progression der IgA-Nephropathie sowie der Funktion als Marker der Nierenfunktionseinschränkung in diesem Kontext bereits untersucht. Konkrete Daten zu nierentransplantierten Patient*innen oder Kindern gibt es bislang nicht. Laut Liu et. al. (2021) ist ST6GAL1 im Plasma ist bei Patient*innen mit einem erstmaligen Auftreten einer IgA-Nephropathie signifikant erhöht, wobei erhöhte ST6GAL1-Spiegel mit einer schwereren Krankheitsausprägung assoziiert sind. Funktionell vermittelt ST6GAL1 die terminale Sialylierung von Immunglobulin G (IgG), was zur Hemmung der proinflammatorischen Zytokinproduktion in peripheren mononukleären Blutzellen führt und damit zur Verzögerung der Krankheitsprogression beiträgt.[128]

Die Identifizierung dieses Enzyms sowohl in der differentiellen Analyse als auch in der Korrelation mit der eGFR in unseren Daten ist besonders interessant. Ob ST6GAL1 unabhängig von IgA-assoziierten Nierenerkrankungen im Kontext der Nierentransplantation, insbesondere bei pädiatrischen Patient*innen, einen Stellenwert als Biomarker in der Diagnostik haben könnte, ist weiterhin unklar. Hier sind vor allem weiterreichende Untersuchungen mit größeren Stichproben notwendig.

5.6.3 Im Gesamt- vs. Subgruppenvergleich (KNTx vs. NTx <1 Monat) zeigen sich Protein-Matches bezogen auf Zellstruktur, Proteinbiosynthese, Zytoskelett und oxidativen Stress

Letztlich erfolgte ein abschließender Vergleich der Protein-Matches im Vergleich differentiell gemessener signifikanter Proteine in der Gesamtgruppenanalyse (KNTx vs. NTx) sowie differentiell gemessener signifikanter Proteine in der Subgruppenanalyse (KNTx vs. NTx <1 Monat). Die Ergebnisse zeigen, dass einige signifikant exprimierte Proteine sowohl in der Gesamtanalyse (KNTx vs. NTx) als auch in der Subgruppenanalyse (KNTx vs. NTx <1 Monat) übereinstimmen. Jedoch muss auch davon ausgegangen werden, dass die Subgruppe der adulten Kontrollproband*innen mit einem Abstand zur Transplantation von <1 Monat die Gesamtergebnisse deutlich beeinflusst haben könnte. Hier ist unter anderem zu berücksichtigen, dass die Kontrollen mit einem Abstand von <1 Monat fünf der acht Kontrollen und somit fast Zweidrittel der Vergleichsgruppe ausmachen. Folglich ist daher auch ein Match signifikant unterschiedlich exprimierter Proteine in beiden Gruppen nicht notwendigerweise

hinweisend für eine größere Relevanz.

Insgesamt konnten hier acht Proteine identifiziert werden, die in beiden Analysen signifikant differentiell exprimiert waren. Diese Proteine sind in Tabelle 12 aufgeführt und in Abbildung 16 als Venn-Diagramm dargestellt.

Verschiedene identifizierte Proteine dienen als prognostischer Marker beim Nierenzellkarzinom – Funktionen bei anderen Nierenerkrankungen sind bislang unbekannt

Hornerin wurde unter anderem als Regulator der Tumorangiogenese, vor allem bei Pankreaskarzinomen, identifiziert. Es wurde in diesem Kontext auch festgestellt, dass Hornerin auf RCCs exprimiert wird.[62] *Protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 13* (PTPN13) zeigt sich bei Überexpression als prognostisch günstiger Faktor bei klarzelligen RCCs.[132] Auch die Expression von *26S proteasome regulatory subunit 7* (PSMC2) auf klarzelligen RCCs als ungünstiger prognostischer Faktor wurde beschreiben.[133] Letztlich wurde auch *Dehydrogenase/Reductase 2* (DHRS2) bei Überexpression auf klarzelligen RCCs als prognostisch ungünstig beschrieben.[134] Die Funktion dieser Proteine bei Nierenerkrankungen abseits von RCCs oder im Rahmen von Nierentransplantationen ist nicht erforscht.

Bei *Large Ribosomal Subunit Protein uL6* handelt es sich um ein Protein, das eine Rolle bei der Proteinbiosynthese spielt.[60] Plectin spielt eine wichtige Rolle in der Formation des Zytoskeletts.[59] Ein Zusammenhang dieser Proteine speziell mit renalen Pathologien ist nicht beschrieben.

Filamin A ist ein Marker für die Anpassung der Niere an mechanischen Stress

Filamin A (FLNA) ist ein Aktin-bindendes Protein, welches eine wichtige Rolle bei der Organisation des Zytoskeletts sowie der Zelladhäsion spielt. Es ist beteiligt an zahlreichen Prozessen wie Zelladhäsion, -Migration und auch Signaltransduktion. Primär ist die Bedeutung von FLNA im Kontext der neuronalen Entwicklung bekannt.[58]

Greiten et al. (2021) untersuchten die Rolle von Filamin A (FLNA) in Podozyten unter mechanischem Stress, insbesondere bei diabetischer Nephropathie. In Nierenbiopsien von Patienten zeigte sich eine deutliche Überexpression von FLNA gegenüber Kontrollen, vermutlich als adaptive Reaktion der Podozyten auf den durch Hyperglykämie und glomeruläre Hypertonie induzierten mechanischen Stress. Im murinen Modell führte ein podozytenspezifischer FLNA-Knockout unter diabetischen Bedingungen zu verstärkter Proteinurie, Podozytenverlust und glomerulärer Sklerose, was auf eine protektive Funktion von FLNA bei der Anpassung von Podozyten an mechanischen Stress hinweist. FLNA erwies sich

zudem als zentrale Komponente von Signalwegen zur Regulation von Zytoskelett und Zelladhäsion, also Mechanismen, die bei der Progression der diabetischen Nephropathie von entscheidender Bedeutung sind. Filamin B, welches im Rahmen unserer Untersuchungen ebenfalls als signifikant unterschiedlich exprimiertes Protein identifiziert und im Rahmen der Diskussion dieser Arbeit bereits besprochen wurde, war insgesamt schwächer exprimiert, aber unter mechanischem Stress moderat überexprimiert, was auf unterstützende Funktionen schließen lässt.[135]

Die Ergebnisse legen nahe, dass Filamin A als Vermittler von podozytären Signalwegen fungiert und somit eine wichtige Rolle bei der Anpassung von Zellen an verschiedene Belastungen spielt. Diese Erkenntnisse sind besonders relevant für Erkrankungen mit erhöhtem mechanischen Stress in der Niere, wie Hypertonie, diabetische Nephropathie und möglicherweise auch im Anschluss an eine erfolgte Nierentransplantation, bei denen Podozyten starken Belastungen ausgesetzt sind.[135] Daher könnte FLNA vor allem im Kontext unserer Ergebnisse besonders interessant sein und sollte im Zuge zukünftiger Studien im Hinblick auf seine Funktion als potenzieller Biomarker näher untersucht werden.

GSTK1 könnte Anpassungen des Nierentransplantats an oxidativen Stress aufzeigen

Darüber hinaus zeigte sich das Protein *Glutathione S-Transferase Kappa 1* (GSTK1) übereinstimmend in beiden Gruppen. Hierbei handelt es sich um ein mitochondriales Enzym, das eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der Redox-Homöostase in Peroxisomen spielt und somit zum Schutz des zellulären oxidativen Gleichgewichts beiträgt. Ein Verlust von GSTK1 führt zu erhöhtem oxidativem Stress und veränderter Expression antioxidativer Gene.[136]

Blackburn et al. (2011) untersuchten die Rolle von GSTK1 im Kontext der Nierenfunktion. Dazu wurden Gstk1^{-}/$^{-}$-Mäuse generiert, um die Auswirkungen eines Gstk1-1Mangels zu analysieren. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Nieren zeigten bereits im Alter von 3 Monaten Veränderungen der glomerulären Basalmembran bei männlichen Gstk1^{-}/$^{-}$-Mäusen, begleitet von einer nachweisbaren Mikroalbuminurie. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein Mangel an Gstk1 zu glomerulären Schädigungen führt, die mit dem nephrotischen Syndrom vergleichbar sind, ohne dass ein offensichtlicher oxidativer Stress vorliegt.[137]

Bezogen auf unsere Studie zeigt sich, dass GSTK1 im Kontext renaler Pathomechanismen einen Stellenwert einnimmt, und daher im Zuge zukünftiger Untersuchungen des Urinproteoms vor allem im Hinblick auf eine frühe Detektion möglicher renaler Schäden weiter untersucht werden sollte.

5.7 Limitationen unserer Arbeit

Im Rahmen unserer Pilotstudie konnten wir mehrere Proteine identifizieren, die sich differentiell exprimiert zeigten und daher in Zukunft eine potenzielle Rolle als nicht-invasive Biomarker aus dem Urin nierentransplantierter Patient*innen einnehmen könnten.

Obwohl diese Ergebnisse womöglich auf wichtige biologische Zusammenhänge und pathophysiologische Veränderungen hinweisen, ist es wichtig zu betonen, dass solche Assoziationen im Kontext von Studien stark durch Confounder beeinflusst sein können. Faktoren wie Alter, Geschlecht,[138] Immunsuppressionsregime, Abstand zur Transplantation, Komorbiditäten (z. B. Diabetes mellitus oder Bluthochdruck), vor allem bei den erwachsenen Kontrollproband*innen, Unterschiede in der Nierenfunktion (z. B. eGFR, Proteinurie) sowie mögliche subklinische akute Erkrankungen zum Zeitpunkt der Probenentnahme (z.B. virale Infekte) stellen potentielle Störgrößen dar, die die beobachteten Proteomveränderungen unabhängig von der untersuchten Hauptvariable beeinflussen[138] können.

Um dieser Problematik zu begegnen, sollten zukünftige Studien in diesem Gebiet daher methodisch robuster gestaltet werden. Dazu könnte insbesondere der Einsatz von *gematchten* bzw. angepassten Kohorten, bei denen Patienten anhand relevanter *Confounder* wie Alter, Geschlecht, Nierenfunktion oder immunsuppressiver Therapie paarweise zugeordnet werden, gehören. Diese Anpassungen können einerseits dabei helfen, strukturelle Unterschiede zwischen den Gruppen zu minimieren und die Aussagekraft der beobachteten Proteinexpressionsmuster unserer Pilotstudie zu erhöhen. Andererseits ist jedoch zu beachten, dass angepasste Kohorten in Fall-Kontroll-Studien auch zu einer *selection bias* bzw. einer Stichprobenverzerrung führen können. In Kombination mit dem *Confounding* kann daraus resultierend ein *net bias* bzw. Gesamtbias entstehen, das ebenso zur Verstärkung des *Confoundings* beitragen kann.[139]

Darüber hinaus ist der Einsatz multivariabler statistischer Modelle entscheidend, insbesondere Regressionsanalysen mit Adjustierung für mögliche Confounder. Hierdurch kann die unabhängige Assoziation einer Variablen mit der untersuchten Zielvariable unter Kontrolle anderer Einflussfaktoren ermittelt werden.[140]

Insbesondere ist auch eine ausreichende Stichprobengröße notwendig, um eine hohe statistische Power, also eine gute statistische Aussagekraft, zu gewährleisten.[41] Bei pädiatrischen nierentransplantierten Patient*innen stellt dies jedoch aufgrund des sehr kleinen und aufgrund des Alters sehr inhomogenen Patient*innenklientels eine sehr große Herausforderung dar.

Essentiell zur Beurteilung möglicher Veränderungen in der Proteinexpression ist darüber hinaus auch ein longitudinales Studiendesign, bei dem Urinproben zu verschiedenen Zeitpunkten ggfs. vor und nach Transplantation untersucht werden. In den Arbeiten von Braun

et al. (2019 und 2020) zeigten sich einerseits Veränderungen in der Expression bestimmter Proteine, einschließlich PCK2, zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transplantation. Andererseits zeigten sich auch Subcluster der Proteinexpressionen bezogen auf unterschiedliche Zeitpunkte der Probenabnahme. Somit können die Proteinexpressionsmuster unter anderem auf biologische Zustände, Anpassungsvorgänge oder auch

Abstoßungsreaktionen hinweisen. Wie bereits oben erläutert, führte man auch ergänzende immunhistochemische Untersuchungen für PCK2 an bioptisch gewonnenem Nierengewebe durch, um Korrelationen mit der Anreicherung von PCK2 in den suEVs nachzuweisen. Diese zeigten sich jedoch nicht signifikant. [33,34]

Zur besseren Interpretierbarkeit von Veränderungen in Proteinexpressionsmustern im klinischen Kontext und zur Validierung differentiell exprimierter Proteine könnten proteomische Untersuchungen von suEVs in Kombination mit zeitgleich entnommenen Nierenbiopsien dennoch maßgeblich beitragen. Turco et al. (2016) konnten zuvor bereits signifikante Korrelationen zwischen EV-Markern und Gewebeeigenschaften von Nierenbiopsien nachweisen. Hier zeigten sich auch Veränderungen, die mit dem Alter assoziiert sind.[141]

Folglich unterstreichen diese Überlegungen die Notwendigkeit, die differenzielle Proteinexpression sowie Veränderungen in Expressionsmustern stets im Kontext möglicher Störfaktoren und klinischer Einflüsse zu interpretieren und in zukünftigen Studien gezielt auf methodische Strategien zur Kontrolle von solchen zurückzugreifen, um robuste und klinisch relevante Aussagen treffen zu können.

Obwohl die begrenzte Stichprobengröße die Generalisierbarkeit unserer Ergebnisse einschränkt, liefert diese Pilotstudie dennoch wichtige Hinweise auf verschiedene Proteine, die in zukünftigen, umfangreicheren Studien weiter untersucht werden sollten.

Unsere Ergebnisse können hier möglicherweise als Grundlage für die Entwicklung spezifischerer und sensitiverer Nachweismethoden dienen, die langfristig dazu beitragen könnten, invasive diagnostische Methoden wie die Nierenbiopsie in bestimmten Fragestellungen zu ersetzen und die Nachsorge für nierentransplantierte Kinder zu verbessern.

Um *small urinary extracellular vesicles* in Zukunft als potenzielle, nicht-invasive Quelle für Biomarker im Rahmen der Nachsorge nach Nierentransplantation anwenden zu können, sollten weitere Studien mit einem homogenen Patient*innenkollektiv, ggfs. auch im Rahmen von multizentrischen Studien gemeinsam mit anderen großen Transplantationszentren, erfolgen. So kann gewährleistet werden, dass ausreichend pädiatrische Proband*innen eingeschlossen werden.

5.8 Zusammenfassung und Ausblick

Nierentransplantationen bei pädiatrischen Patient*innen sind noch immer eine Seltenheit und Studien zur Anwendbarkeit von Biomarkern aus *small urinary extracellular vesicles* als diagnostisches Mittel bei Kindern und Jugendlichen existieren bisher nicht. Ergebnisse von Studien mit erwachsenen Proband*innen sind nicht immer ohne Weiteres auf Kinder übertragbar. Aus diesem Grund ist es essenziell, Studien zur Untersuchung möglicher diagnostischer Methoden bei Kindern und Jugendlichen durchzuführen, um deren Anwendbarkeit im klinischen Kontext zu validieren.

In Rahmen unserer Pilotstudie präsentieren wir erste Daten zum Urinproteom von Kindern und Jugendlichen nach erfolgter Nierentransplantation und möchten somit einen Beitrag zur Erforschung nicht-invasiver diagnostischer Methoden bei pädiatrischen Patient*innen leisten. Unsere Arbeit soll einen Ausgangspunkt für weiterführende Forschung darstellen, um potenzielle Biomarker zu identifizieren, die für das Monitoring des Transplantatzustands und gegebenenfalls auch zur frühen Detektion von Abstoßungsreaktionen geeignet sind.

Die im Rahmen unserer Pilotstudie identifizierten Proteine könnten in diesem Sinne eine wichtige Rolle spielen und zur Überwachung der Transplantatfunktion bzw. zur Vorhersage potenzieller Komplikationen beitragen. Unsere Ergebnisse unterstreichen zudem die Bedeutung alters- und funktionsspezifischer Unterschiede im Proteom nach Nierentransplantationen, was relevant für die Therapie und Nachsorge von Kindern und Jugendlichen im Vergleich zu Erwachsenen nach Nierentransplantation sein könnte.

Weitere Studien sind notwendig, um den Stellenwert der im Rahmen unserer Studie identifizierten Proteine zu untersuchen und ihre mögliche Relevanz im klinischen Kontext zu bestätigen.

6 Literaturverzeichnis

1. Dharnidharka VR, Fiorina P, Harmon WE. Kidney transplantation in children. *N Engl J Med* 2014; **371**(6): 549-58.
2. Lange-Sperandio B, Dötsch J. Chronische Niereninsuffizienz im Kindesalter. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 2013; **161**(11): 988-94.
3. Mitsnefes M. Cardiovascular Disease in Children with Chronic Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 2012; **23**(4).
4. Büscher R, Lehnhardt A. Nierenersatztherapie im Kindesalter. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 2013; **161**(11): 995-1003.
5. Tönshoff B. Nierentransplantation bei Kindern und Jugendlichen. In: Hoffmann GF, Lentze MJ, Spranger J, Zepp F, Berner R, eds. Pädiatrie: Grundlagen und Praxis. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019: 1-5.
6. Mühlfeld A. Nierentransplantation: Rejektion. In: Lehnert H, Märker-Hermann E, Marx N, Meyhöfer SM, eds. DGIM Innere Medizin. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2025: 1-6.
7. Sellares J, de Freitas DG, Mengel M, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant* 2012; **12**(2): 388-99.
8. Pettit C, Kanagaratnam R, Coughlan F, Graf N, Hahn D, Durkan A. Kidney biopsy adequacy and complications in children - does technique matter? *Eur J Pediatr* 2022; **181**(7): 2677-84.
9. Lozano-Ramos SI, Bancu I, Carreras-Planella L, et al. Molecular profile of urine extracellular vesicles from normo-functional kidneys reveal minimal differences between living and deceased donors. *BMC Nephrol* 2018; **19**(1): 189.
10. Street J, Koritzinsky E, Glispie D, Star R, PST Y. Chapter Three - Urine Exosomes: An Emerging Trove of Biomarkers. Advances in Clinical Chemistry; 2017: 103-22.
11. Roach J, Bock M, Goebel J. Pediatric kidney transplantation. *Seminars in Pediatric Surgery* 2017; **26**(4).
12. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney International Supplements* 2013; **3**(1): 1-150.
13. Chen TK, Knicely DH, Grams ME. Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management: A Review. *JAMA* 2019; **322**(13): 1294-304.
14. Larsen R. Störungen des Wasser- und Elektrolythaushaltes. Anästhesie und Intensivmedizin für die Fachpflege; 2016: 832-9.
15. Aregger F, Kuhlmann M. Dialyseeinleitung. *Nephrologie* 2023; **18**: 51–9.
16. Greite R, Schmidt-Ott K. Was ist gesichert in der Therapie der chronischen Nierenerkrankung? . *Inn Med (Heidelb)* 2022; **63**(12): 1237-43.
17. Lonnemann G. Technik der Hämodialyse. *Der Nephrologe* 2007; **2**(4): 252-60.
18. Andreoli MCC, Totoli C. Peritoneal Dialysis. *Rev Assoc Med Bras (1992)* 2020; **66**(Suppl 1): s37-s44.
19. Mettang T. Der PD-Katheter – Welcher, wann und wie? *Dialyse aktuell* 2014; **18**(07): 366-75.
20. Querfeld U, Schaefer F. Cardiovascular risk factors in children on dialysis: an update. *Pediatr Nephrol* 2020; **35**(1): 41-57.
21. Thaiss F. Langfristige körperliche und psychische Folgen chronischer Nierenerkrankungen. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2022; **65**(4): 488-97.
22. Rieger S, Schemmer B, Bethe D, et al. Universitätsklinikum Heidelberg: Nierentransplantation bei Kindern und Jugendlichen. 2015. https://www.klinikum.uni-heidelberg.de/fileadmin/Chirurgie/AllgemeineChirurgie/PDFs/Nierentransplantation_bei_Kindern_und_Jugendlichen.pdf (zuletzt abgerufen am 05.12.2025)

23. Böhler J. Transplantationsimmunologie. In: Kuhlmann U, D. W, Böhler J, Luft F, eds. Nephrologie: Pathophysiologie – Klinik – Nierenersatzverfahren. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2008: 619-21.
24. Cruz-Tapias P, Castiblanco J, Anaya J. Major histocompatibility complex: Antigen processing and presentation. In: JM A, Y S, A R-V, al. e, eds. Autoimmunity: From Bench to Bedside [Internet]: El Rosario University Press; 2013.
25. Coens F, Knops N, Tieken I, et al. Time-Varying Determinants of Graft Failure in Pediatric Kidney Transplantation in Europe. *Clin J Am Soc Nephrol* 2024; **19**(3): 345-54.
26. Mühlfeld A. Nierentransplantation: Chronische Transplantatschädigung. In: Lehnert H, ed. SpringerReference Innere Medizin. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014: 1-9.
27. S. G. Banff Classification from 1991 to 2019. A Significant Contribution to Our Understanding and Reporting of Allograft Renal Biopsies. *Indian J Nephrol* 2022.
28. Ehrsam J, Rossler F, Horisberger K, Hubel K, Nilsson J, de Rougemont O. Kidney Retransplantation after Graft Failure: Variables Influencing Long-Term Survival. *J Transplant* 2022; **2022**: 3397751.
29. Al-Amrani S, Al-Jabri Z, Al-Zaabi A, Alshekaili J, Al-Khabori M. Proteomics: Concepts and applications in human medicine. *World J Biol Chem* 2021; **12**(5): 57-69.
30. Birhanu AG. Mass spectrometry-based proteomics as an emerging tool in clinical laboratories. *Clin Proteomics* 2023; **20**(1): 32.
31. Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells* 2019; **8**(7).
32. Thery C, Witwer KW, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 2018; **7**(1): 1535750.
33. Braun F, Rinschen M, Buchner D, et al. The proteomic landscape of small urinary extracellular vesicles during kidney transplantation. *J Extracell Vesicles* 2020; **10**(1): e12026.
34. Braun F, Rinschen M, Buchner D, et al. The proteome of small urinary extracellular vesicles after kidney transplantation as an indicator of renal cellular biology and a source for markers predicting outcome. *bioRxiv* 2019: 845941.
35. Universitätsklinikum Köln, Institut für Klinische Chemie. Leistungsverzeichnis Klinische Chemie: Kreatinin-Clearance-Bestimmung. https://leistungsverzeichnis-klinische-chemie-ukkoeln.de/ (zuletzt abgerufen am 05.12.2025)
36. Pottel H, Hoste L, Dubourg L, et al. An estimated glomerular filtration rate equation for the full age spectrum. *Nephrol Dial Transplant* 2016; **31**(5): 798-806.
37. Merchant ML, Rood IM, Deegens JKJ, Klein JB. Isolation and characterization of urinary extracellular vesicles: implications for biomarker discovery. *Nat Rev Nephrol* 2017; **13**(12): 731-49.
38. Güssregen B. LC-MS. In: Gressner AM, Arndt T, eds. Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018: 1-2.
39. UniProt Consortium. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Research* 2025; **53**(D1): D609-D17.
40. Esri. Box-Cox, Arkussinus- und Log-Transformationen. https://pro.arcgis.com/de/pro-app/latest/help/analysis/geostatistical-analyst/box-cox-arcsine-and-log-transformations.htm (zuletzt abgerufen am 05.12.2025)
41. Schork K, Podwojski K, Turewicz M, Stephan C, Eisenacher M. Important Issues in Planning a Proteomics Experiment: Statistical Considerations of Quantitative Proteomic Data. In: Marcus K, Eisenacher M, Sitek B, eds. Quantitative Methods in Proteomics. New York, NY: Springer US; 2021: 1-20.
42. Schork K, Podwojski K, Turewicz M, Stephan C, Eisenacher M. Important Issues in Planning a Proteomics Experiment: Statistical Considerations of Quantitative Proteomic Data. *Methods Mol Biol* 2021; **2228**: 1-20.
43 Key M. A tutorial in displaying mass spectrometry-based proteomic data using heat maps. *BMC Bioinformatics 2012* 2012; **13**(16).
44. Cheadle C, Vawter MP, Freed WJ, Becker KG. Analysis of Microarray Data Using Z Score Transformation. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2003; **5**(2): 73-81.

45. Schessner JP, Voytik E, Bludau I. A practical guide to interpreting and generating bottom-up proteomics data visualizations. *Proteomics* 2022; **22**(8): e2100103.
46. Li W, Freudenberg J, Suh YJ, Yang Y. Using volcano plots and regularized-chi statistics in genetic association studies. *Computational Biology and Chemistry* 2014; **48**: 77-83.
47. Jolliffe IT, Cadima J. Principal component analysis: a review and recent developments. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 2016; **374**(2065): 20150202.
48. Poonia S, Chawla S, Kaushik S, Sengupta D. Pathway Informatics. In: Ranganathan S, Gribskov M, Nakai K, Schönbach C, eds. Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: Oxford: Academic Press; 2019: 796-804.
49. Simillion C, Liechti R, Lischer HEL, Ioannidis V, Bruggmann R. Avoiding the pitfalls of gene set enrichment analysis with SetRank. *BMC Bioinformatics 2012* 2017; **18**(1).
50. Novogene. Tools (GO & KEGG) for Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). https://www.novogene.com/eu-en/resources/blog/tools-go-kegg-for-gene-set-enrichment-analysis-gsea/ (zuletzt abgerufen am 05.12.2025)
51. Balakrishnan R, Harris MA, Huntley R, Van Auken K, Cherry JM. A guide to best practices for Gene Ontology (GO) manual annotation. *Database (Oxford)* 2013; **2013**: bat054.
52. McBeth P, Cepoiu-Martin M. Chapter 14 - Categorical variable analyses: Chi-square, Fisher's exact, and Mantel–Haenszel. In: Eltorai AEM, Bakal JA, Ahmad M, eds. Translational Neurosurgery: Academic Press; 2026: 91-3.
53. Hilgers RD, Heussen N, Stanzel S. Korrelationskoeffizient nach Pearson. In: Gressner AM, Arndt T, eds. Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019: 1389-.
54. Winterberg PD, Garro R. Long-Term Outcomes of Kidney Transplantation in Children. *Pediatr Clin North Am* 2019; **66**(1): 269-80.
55. Wu L, Boer K, Woud WW, Udomkarnjananun S, Hesselink DA, Baan CC. Urinary Extracellular Vesicles Are a Novel Tool to Monitor Allograft Function in Kidney Transplantation: A Systematic Review. *Int J Mol Sci* 2021; **22**(19).
56. Yu S, Meng S, Xiang M, Ma H. Phosphoenolpyruvate carboxykinase in cell metabolism: Roles and mechanisms beyond gluconeogenesis. *Mol Metab* 2021; **53**: 101257.
57. Weidmann L, Laux C, Castrezana Lopez K, et al. Immunosuppression and transplantation-related characteristics affect the difference between eGFR equations based on creatinine compared to cystatin C in kidney transplant recipients. *Clinical Kidney Journal* 2024; **17**(11).
58. Zhou J, Kang X, An H, Lv Y, Liu X. The function and pathogenic mechanism of filamin A. *Gene* 2021; **784**: 145575.
59. Prechova M, Adamova Z, Schweizer AL, et al. Plectin-mediated cytoskeletal crosstalk controls cell tension and cohesion in epithelial sheets. *J Cell Biol* 2022; **221**(3).
60. Odintsova TI, Müller E-C, Ivanov AV, et al. Characterization and Analysis of Posttranslational Modifications of the Human Large Cytoplasmic Ribosomal Subunit Proteins by Mass Spectrometry and Edman Sequencing. *Journal of Protein Chemistry* 2003; **22**(3): 249-58.
61. Ankenbauer KE, Rao TC, Mattheyses AL, Bellis SL. Sialylation of EGFR by ST6GAL1 induces receptor activation and modulates trafficking dynamics. *J Biol Chem* 2023; **299**(10): 105217.
62. Gutknecht MF, Seaman ME, Ning B, et al. Identification of the S100 fused-type protein hornerin as a regulator of tumor vascularity. *Nat Commun* 2017; **8**(1): 552.
63. Schaenman JM, Rossetti M, Lum E, et al. Differences in Gene Expression in Older Compared With Younger Kidney Transplant Recipients. *Transplant Direct* 2019; **5**(4): e436.
64. Garcia NH, Gaivin RJ, Khan S, et al. Fatty acids and albumin are transported by distinct mechanisms in the proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 2025; **329**(4): F444-f51.
65. Erkan E, Zhao X, Setchell K, Devarajan P. Distinct urinary lipid profile in children with focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol* 2016; **31**(4): 581-8.
66. Ranawaka R, Dayasiri K, Sandamali E, Gamage M. Management strategies for common viral infections in pediatric renal transplant recipients. *World J Transplant* 2024; **14**(1): 89978.

67. Carreras-Planella L, Juega J, Taco O, et al. Proteomic Characterization of Urinary Extracellular Vesicles from Kidney-Transplanted Patients Treated with Calcineurin Inhibitors. *Int J Mol Sci* 2020; **21**(20): 7569.
68. Harita Y. Urinary extracellular vesicles in childhood kidney diseases. *Pediatr Nephrol* 2024; **39**(8): 2293-300.
69. Lv LL, Feng Y, Tang TT, Liu BC. New insight into the role of extracellular vesicles in kidney disease. *J Cell Mol Med* 2019; **23**(2): 731-9.
70. Bai Y, Wei C, Li P, et al. Primary cilium in kidney development, function and disease. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022; **13**: 952055.
71. Baranovicova E, Vnucak M, Granak K, et al. Circulating Metabolites in Relation to the Kidney Allograft Function in Posttransplant Patients. *Metabolites* 2022; **12**(7).
72. In 't Veld AE, Eveleens Maarse BC, Juachon MJ, et al. Immune responsiveness in stable kidney transplantation patients: Complete inhibition of T-cell proliferation but residual Tcell activity during maintenance immunosuppressive treatment. *Clin Transl Sci* 2024; **17**(6): e13860.
73. Garcia C, Andersen CJ, Blesso CN. The Role of Lipids in the Regulation of Immune Responses. *Nutrients* 2023; **15**(18).
74. Nüsken E, Voggel J, Saschin L, et al. Kidney lipid metabolism: impact on pediatric kidney diseases and modulation by early-life nutrition. *Pediatr Nephrol* 2025; **40**(6): 1839-52.
75. Fang Y, Park IH, Wu AL, et al. PLD1 regulates mTOR signaling and mediates Cdc42 activation of S6K1. *Curr Biol* 2003; **13**(23): 2037-44.
76. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* 2009; **122**(Pt 20): 3589-94.
77. Bruntz RC, Lindsley CW, Brown HA. Phospholipase D signaling pathways and phosphatidic acid as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol Rev* 2014; **66**(4): 1033-79.
78. Bennett V, Healy J. Membrane domains based on ankyrin and spectrin associated with cell-cell interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; **1**(6): a003012.
79. Hediger MA, Clémençon B, Burrier RE, Bruford EA. The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction. *Mol Aspects Med* 2013; **34**(2-3): 95-107.
80. Vianello E, Beltrami AP, Aleksova A, et al. The Advanced Glycation End-Products (AGE)-Receptor for AGE System (RAGE): An Inflammatory Pathway Linking Obesity and Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci* 2025; **26**(8).
81. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 2010; **11**(9): 785-97.
82. Taguchi K, Fukami K. RAGE signaling regulates the progression of diabetic complications. *Front Pharmacol* 2023; **14**: 1128872.
83. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 2017; **168**(6): 960-76.
84. Shihab F, Christians U, Smith L, Wellen J, Kaplan B. Focus on mTOR inhibitors and tacrolimus in renal transplantation: Pharmacokinetics, exposure,Äìresponse relationships, and clinical outcomes. *Transplant Immunology* 2014; **31**(1).
85. Wasik AA, Dash SN, Lehtonen S. Septins in kidney: A territory little explored. *Cytoskeleton (Hoboken)* 2019; **76**(1): 154-62.
86. Wasik AA, Polianskyte-Prause Z, Dong MQ, et al. Septin 7 forms a complex with CD2AP and nephrin and regulates glucose transporter trafficking. *Mol Biol Cell* 2012; **23**(17): 3370-9.
87. Ivanov A, Le H, Naydenov N, Rieder F. Novel Functions of the Septin Cytoskeleton: Shaping Up Tissue Inflammation and Fibrosis. *The American Journal of Pathology* 2021; **191**(1).
88. Heidari A, Tongsook C, Najafipour R, et al. Mutations in the histamine Nmethyltransferase gene, HNMT, are associated with nonsyndromic autosomal recessive intellectual disability. *Hum Mol Genet* 2015; **24**(20): 5697-710.
89. Spires DR, Schibalski RS, Domondon M, et al. Renal histaminergic system and acute effects of histamine receptor 2 blockade on renal damage in the Dahl salt-sensitive rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 2023; **325**(1): F105-f20.

90. Li J, Sun C, Cai W, Li J, Rosen B, Chen J. Insights into S-adenosyl-l-methionine (SAM)dependent methyltransferase related diseases and genetic polymorphisms. *Mutat Res Rev Mutat Res* 2021; **788**: 108396.
91. Smith TM, Willardson BM. Mechanistic insights into protein folding by the eukaryotic chaperonin complex CCT. *Biochem Soc Trans* 2022; **50**(5): 1403-14.
92. Dekker C, Stirling PC, McCormack EA, et al. The interaction network of the chaperonin CCT. *Embo j* 2008; **27**(13): 1827-39.
93. Yi W, Clark PM, Mason DE, et al. Phosphofructokinase 1 glycosylation regulates cell growth and metabolism. *Science* 2012; **337**(6097): 975-80.
94. Mathieu C, Li de la Sierra-Gallay I, Duval R, et al. Insights into Brain Glycogen Metabolism: THE STRUCTURE OF HUMAN BRAIN GLYCOGEN PHOSPHORYLASE. *J Biol Chem* 2016; **291**(35): 18072-83.
95. Oikari S, Makkonen K, Deen AJ, et al. Hexosamine biosynthesis in keratinocytes: roles of GFAT and GNPDA enzymes in the maintenance of UDP-GlcNAc content and hyaluronan synthesis. *Glycobiology* 2016; **26**(7): 710-22.
96. Gururaj A, Barnes CJ, Vadlamudi RK, Kumar R. Regulation of phosphoglucomutase 1 phosphorylation and activity by a signaling kinase. *Oncogene* 2004; **23**(49): 8118-27.
97. Ma Z, Chu CH, Cheng D. A novel direct homogeneous assay for ATP citrate lyase. *J Lipid Res* 2009; **50**(10): 2131-5.
98. Günenc AN, Graf B, Stark H, Chari A. Fatty Acid Synthase: Structure, Function, and Regulation. *Subcell Biochem* 2022; **99**: 1-33.
99. Welter H, Herrmann C, Fröhlich T, et al. Filamin A Orchestrates Cytoskeletal Structure, Cell Migration and Stem Cell Characteristics in Human Seminoma TCam-2 Cells. *Cells* 2020; **9**(12).
100. Chan KT, Creed SJ, Bear JE. Unraveling the enigma: progress towards understanding the coronin family of actin regulators. *Trends Cell Biol* 2011; **21**(8): 481-8.
101. Zhou X, Tian F, Sandzén J, et al. Filamin B deficiency in mice results in skeletal malformations and impaired microvascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**(10): 3919-24.
102. Wang XJ, Yan ZJ, Luo GC, Chen YY, Bai PM. miR-26 suppresses renal cell cancer via down-regulating coronin-3. *Mol Cell Biochem* 2020; **463**(1-2): 137-46.
103. Lepelley A, Martin-Niclós MJ, Le Bihan M, et al. Mutations in COPA lead to abnormal trafficking of STING to the Golgi and interferon signaling. *J Exp Med* 2020; **217**(11).
104. Malovan G, Hierzberger B, Suraci S, et al. The emerging role of dipeptidyl peptidase 3 in pathophysiology. *Febs j* 2023; **290**(9): 2246-62.
105. Wang DW, Tang JY, Zhang GQ, Chang XT. ARHGEF10L expression regulates cell proliferation and migration in gastric tumorigenesis. *Biosci Biotechnol Biochem* 2020; **84**(7): 1362-72.
106. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 2009; **30**(1-2): 42-59.
107. Chen CH, Yang WC, Hsiao YH, Huang SC, Huang YC. High homocysteine, low vitamin B-6, and increased oxidative stress are independently associated with the risk of chronic kidney disease. *Nutrition* 2016; **32**(2): 236-41.
108. Huang YC, Huang SC, Chung PS, Chen CH. Plasma Homocysteine and Glutathione Are Independently Associated With Estimated Glomerular Filtration Rates in Patients With Renal Transplants. *Transplant Proc* 2019; **51**(8): 2667-70.
109. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother* 2003; **57**(3-4): 145-55.
110. Sekhar RV, Patel SG, Guthikonda AP, et al. Deficient synthesis of glutathione underlies oxidative stress in aging and can be corrected by dietary cysteine and glycine supplementation. *Am J Clin Nutr* 2011; **94**(3): 847-53.
111. Li W, Yue H. Thymidine phosphorylase: A potential new target for treating cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 2018; **28**(3): 157-71.
112. Lindskog EB, Wettergren Y, Odin E, Gustavsson B, Derwinger K. Thymidine Phosphorylase Gene Expression in Stage III Colorectal Cancer. *Clin Med Insights Oncol* 2012; **6**: 347-53.

113. Chen SA, Zhang JP, Wang N, Chen J. Identifying TYMP as an Immune Prognostic Marker in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Technol Cancer Res Treat* 2023; **22**: 15330338231194555.
114. Napoleon MA, Yang X, Zhang Y, et al. Activation and targetability of TYMP-IL-6-TF signaling in the skin microenvironment in uremic calciphylaxis. *Sci Transl Med* 2025; **17**(795): eadn5772.
115. Lennartz M, Csomós H, Chirico V, et al. Cadherin-16 (CDH16) immunohistochemistry: a useful diagnostic tool for renal cell carcinoma and papillary carcinomas of the thyroid. *Sci Rep* 2023; **13**(1): 12917.
116. Li N, Gu HF. Genetic and Biological Effects of SLC12A3, a Sodium-Chloride Cotransporter, in Gitelman Syndrome and Diabetic Kidney Disease. *Front Genet* 2022; **13**: 799224.
117. Dong B, Chen Y, Liu X, et al. Identification of compound mutations of SLC12A3 gene in a Chinese pedigree with Gitelman syndrome exhibiting Bartter syndrome-liked phenotypes. *BMC Nephrol* 2020; **21**(1): 328.
118. Koehl B, Vrignaud C, Mikdar M, et al. Lack of the human choline transporter-like protein SLC44A2 causes hearing impairment and a rare red blood phenotype. *EMBO Mol Med* 2023; **15**(3): e16320.
119. Pelletier MF, Marcil A, Sevigny G, et al. The heterodimeric structure of glucosidase II is required for its activity, solubility, and localization in vivo. *Glycobiology* 2000; **10**(8): 815-27.
120. Grant GA. D-3-Phosphoglycerate Dehydrogenase. *Front Mol Biosci* 2018; **5**: 110.
121. Argyropoulos CP, Chen SS, Ng YH, et al. Rediscovering Beta-2 Microglobulin As a Biomarker across the Spectrum of Kidney Diseases. *Front Med (Lausanne)* 2017; **4**: 73.
122. Sedighi O, Abediankenari S, Omranifar B. Association between plasma Beta-2 microglobulin level and cardiac performance in patients with chronic kidney disease. *Nephrourol Mon* 2015; **7**(1): e23563.
123. Rainey A, McKay GJ, English J, Thakkinstian A, Maxwell AP, Corr M. Proteomic analysis investigating kidney transplantation outcomes- a scoping review. *BMC Nephrol* 2023; **24**(1): 346.
124. Kanzelmeyer NK, Zürbig P, Mischak H, et al. Urinary proteomics to diagnose chronic active antibody-mediated rejection in pediatric kidney transplantation - a pilot study. *Transpl Int* 2019; **32**(1): 28-37.
125. Zhu T, Wang T, Feng Z, et al. Glia Maturation Factor β as a Novel Independent Prognostic Biomarker and Potential Therapeutic Target of Kidney Renal Clear Cell Carcinoma. *Front Oncol* 2022; **12**: 880100.
126. Elias BC, Das A, Parekh DV, et al. Cdc42 regulates epithelial cell polarity and cytoskeletal function during kidney tubule development. *J Cell Sci* 2015; **128**(23): 4293-305.
127. Choi SY, Chacon-Heszele MF, Huang L, et al. Cdc42 deficiency causes ciliary abnormalities and cystic kidneys. *J Am Soc Nephrol* 2013; **24**(9): 1435-50.
128. Liu Y, Yu H, Wu S, et al. Plasma ST6GAL1 regulates IgG sialylation to control IgA nephropathy progression. *Ther Adv Chronic Dis* 2021; **12**: 20406223211048644.
129. Fu D, Zhong Z, Shi D, et al. ST6GAL1 polymorphisms influence susceptibility and progression of IgA nephropathy in a Chinese Han population. *Immunobiology* 2020; **225**(4): 151973.
130. Musayev FN, di Salvo ML, Ko TP, et al. Crystal Structure of human pyridoxal kinase: structural basis of M(+) and M(2+) activation. *Protein Sci* 2007; **16**(10): 2184-94.
131. Mandal AK, Zhang Z, Ray R, et al. Uteroglobin represses allergen-induced inflammatory response by blocking PGD2 receptor-mediated functions. *J Exp Med* 2004; **199**(10): 1317-30.
132. Long Q, Sun J, Lv J, Liang Y, Li H, Li X. PTPN13 acts as a tumor suppressor in clear cell renal cell carcinoma by inactivating Akt signaling. *Exp Cell Res* 2020; **396**(1): 112286.
133. Guan Y, Xu F, Wang Y, et al. Identification of key genes and functions of circulating tumor cells in multiple cancers through bioinformatic analysis. *BMC Med Genomics* 2020; **13**(1): 140.

134. An Z, Bo W, Qin J, Jiang L, Jiang J. Auxiliary Diagnosis and Prognostic Value of Dehydrogenase/Reductase 2 (DHRS2) in Various Tumors. *Iran J Public Health* 2023; **52**(6): 1150-60.
135. Greiten JK, Kliewe F, Schnarre A, et al. The role of filamins in mechanically stressed podocytes. *Faseb j* 2021; **35**(5): e21560.
136. Costa CF, Lismont C, Chornyi S, et al. Functional Analysis of GSTK1 in Peroxisomal Redox Homeostasis in HEK-293 Cells. *Antioxidants (Basel)* 2023; **12**(6).
137. Blackburn AC, Coggan M, Shield AJ, et al. Glutathione transferase kappa deficiency causes glomerular nephropathy without overt oxidative stress. *Lab Invest* 2011; **91**(11): 157283.
138. Mapelli A, Cadiou S, Di Angelantonio E, Ieva F. Robust Differential Network Analysis in Proteomics: Confounder Adjustment, Biologically Informed Thresholding, and Bootstrap Inference. 2025; Cham: Springer Nature Switzerland; 2025. p. 445-50.
139. Mansournia MA, Poole C. Case–control matching on confounders revisited. *European Journal of Epidemiology* 2023; **38**(10): 1025-34.
140. Pourhoseingholi MA, Baghestani AR, Vahedi M. How to control confounding effects by statistical analysis. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2012; **5**(2): 79-83.
141. Turco AE, Lam W, Rule AD, et al. Specific renal parenchymal-derived urinary extracellular vesicles identify age-associated structural changes in living donor kidneys. *J Extracell Vesicles* 2016; **5**: 29642.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: CKD-Stadien nach den KDIGO 2012-Kriterien 18
Abbildung 2a: Heatmap mit den rohen Proteinintensitäten in KNTx vs. NTx 45
Abbildung 2b: Heatmap mit den Z-Scores der Proteinintensitäten in KNTx vs. NTx 46
Abbildung 3a: PCA ohne Einfärbung der eGFR (KNTx vs. NTx) 47
Abbildung 3b: PCA mit Einfärbung der eGFR (KNTx vs. NTx) 48
Abbildung 4a: Pearson-Korrelationsanalyse von PC1 mit der eGFR 49
Abbildung 4b: Pearson-Korrelationsanalyse von PC2 mit der eGFR 49
Abbildung 5: Volcano Plot der differentiell exprimierten Proteine in KNTx vs. NTx 50
Abbildung 6a: Balkendiagramm der *Enrichment* Analyse mittels GO (KNTx vs. NTx) 52
Abbildung 6b: Punktdiagramm der *Enrichment* Analyse mittels GO (KNTx vs. NTx) 53
Abbildung 6c: Balkendiagramm der *Enrichment* Analyse mittels KEGG (KNTx vs. NTx) 54
Abbildung 7a: Balkendiagramm des GO-*Enrichments* aller Proteine mit Nachweis vermehrter Expression (KNTx vs. NTx) 55
Abbildung 7b: Balkendiagramm des GO-*Enrichments* aller Proteine mit Nachweis verminderter Expression (KNTx vs. NTx) 55
Abbildung 8a: PCA von KNTx vs. NTX <1 Monat post-OP 56
Abbildung 8b: PCA von KNTx vs. NTX >1 Jahr post-OP 57
Abbildung 9: Volcano Plot von KNTx vs. NTX <1 Monat post-OP 59
Abbildung 10: Volcano Plot von KNTx vs. NTX >1 Jahr post-OP 61
Abbildung 11a: Scatterplot für Histamin-N-Methyltransferase 63
Abbildung 11b: Scatterplot für Septin-7 63
Abbildungen 12a: Scatterplots für positive Korrelationen von KNTx vs. Alter 67
Abbildung 12b: Scatterplot für Thymidine phosphorylase (TYMP) 68
Abbildung 13a: Scatterplots für positive Korrelationen von KNTx vs. eGFR 69
Abbildung 13b: Scatterplots für negative Korrelationen von KNTx vs. eGFR 71
Abbildung 14: Venn-Diagramm von COPA als Protein-Match 72
Abbildung 15: Venn-Diagramm von ST6GAL1 als Protein-Match 73
Abbildung 16: Venn-Diagramm der Protein-Matches zwischen Gesamt- (KNTx vs. NTx) und Subgruppenanalyse (KNTx vs. NTx <1 Monat) 74

7.2 Tabellenverzeichnis

***T*abelle 1:** Klinische Charakteristika der pädiatrischen Proband*innen (KNTx) 41
Tabelle 2: Klinische Charakteristika der adulten KontrollProband*innen (NTx) 42
Tabelle 3: Signifikant unterschiedlich exprimierte Proteine in der differentiellen Analyse von KNTx vs. NTx 51
Tabelle 4: Signifikant unterscheidlich exprimierte Proteine in der Analyse von KNTx vs. NTx <1 Monat (mit adjustiertem p-Wert <0,01) 58
Tabelle 5: Signifikant angereicherte Signalwege/Terms im GO-Enrichment KNTx vs. NTx <1 Monat post-OP 60
Tabelle 6: Signifikant angereicherte Signalwege im KEGG-Enrichment KNTx vs. NTx <1 Monat post-OP 60
Tabelle 7: Korrelationen der Proteinintensitäten von KNTx vs. Abstand zur Tx 62
Tabelle 8: Korrelationen der Proteinintensitäten von KNTx vs. Alter 65
Tabelle 9: Korrelationen der Proteinintensitäten von KNTx vs. eGFR 68
Tabelle 10: Protein-Match signifikanter Proteine (KNTx vs. NTx) verglichen mit signifikanten Korrelationen der Proteinintensitäten von KNTx vs. Alter 72
Tabelle 11: Protein-Match signifikanter Proteine (KNTx vs. NTx) verglichen mit signifikanten Korrelationen der Proteinintensitäten von KNTx vs. eGFR 73
Tabelle 12: Protein-Match signifikanter Proteine in der Gesamtanalyse (KNTx vs. NTx) versus signifikanter Proteine in der Subgruppenanalyse (KNTx vs. NTx <1 Monat) 74