

Aus der Abteilung für Nephrologie  
Prof. Dr. med. Bernhard Banas  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

**Anti-BAFF-Behandlung verringert Transplantatfibrose und  
DKK3-Expression im Modell der Nonadhärenz bei  
experimenteller Nierentransplantation in der Ratte**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

Vorgelegt von  
Adrian Preiß

2024



Aus der Abteilung für Nephrologie  
Prof. Dr. med. Bernhard Banas  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

**Anti-BAFF-Behandlung verringert Transplantatfibrose und  
DKK3-Expression im Modell der Nonadhärenz bei  
experimenteller Nierentransplantation in der Ratte**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

Vorgelegt von  
Adrian Preiß

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Tobias Bergler

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Christina Hackl

Datum der mündlichen Prüfung: 02.10.2024

# Inhalt

1. Einführung.....	3
1.1. Chronische Nierenerkrankung und Dialyse .....	3
1.1.1. Dialysemodalitäten.....	4
1.1.1.1. Hämodialyse, Hämofiltration, Hämodiafiltration .....	4
1.1.1.2. Peritonealdialyse .....	4
1.2. Nierentransplantation .....	5
1.2.1. Grundlagen und Epidemiologie.....	5
1.2.2. Allokation.....	7
1.2.3. Geschichte und operationstechnische Grundlagen.....	9
1.2.4. Immunologische Grundlagen .....	10
1.2.4.1. HLA-Merkmale.....	10
1.2.4.2. Abstoßung .....	11
1.2.4.2.1. Antikörpervermittelte Anstoßung ( <i>antibody mediated rejection, AMR</i> ).....	12
1.2.4.2.2. T-Zell-vermittelte Abstoßung ( <i>T-cell-mediated rejection, TCMR</i> ) .....	12
1.2.4.2.3. Histologie und BANFF-Klassifikation.....	14
1.3. Immunsuppression .....	17
1.3.1. Induktionstherapie .....	17
1.3.1.1. IL-2-Rezeptor (CD 25) - Antikörper .....	17
1.3.1.2. Anti-Thymozyten-Globulin (ATG).....	17
1.3.2. Erhaltungstherapie .....	18
1.3.2.1. Calcineurininhibitoren (CNI): Tacrolimus (TAC, FK-506) und Cyclosporin A (CyA).....	18
1.3.2.2. Antimetaboliten: Mycophenolat/Azathioprin .....	19
1.3.2.3. Corticosteroide .....	20
1.4. Renale Fibrose.....	21
1.5. B-Cell Activating Factor (BAFF).....	21
1.6. Dickkopf-3 (DKK3) .....	22
1.7. Hypothesen.....	23
2. Material & Methoden .....	24
2.1. Versuchstiere, Nierentransplantation und immunsuppressive Behandlung.....	24
2.2. Histologie und Immunhistochemie.....	26
2.3. Real-Time Polymerase Chain Reaction (rtPCR).....	27
2.4. Statistik .....	27
3. Ergebnisse .....	28
3.1. Zellmigration .....	28
3.1.1. B-Zellen.....	28

3.1.2.	T-Zellen .....	29
3.1.3.	Makrophagen .....	31
3.2.	Abstoßung.....	32
3.3.	Intragraft-Fibrose.....	33
3.3.1.	Trichrom-Färbung .....	33
3.3.2.	Alpha-SMA.....	34
3.4.	DKK3-Expression.....	35
3.4.1.	Immunhistochemie.....	35
3.4.2.	Real-Time Polymerase Chain Reaction (rtPCR).....	39
4.	Diskussion.....	40
	Literature Cited.....	55
	Appendix .....	45

# 1. Einführung

## 1.1. Chronische Nierenerkrankung und Dialyse

Chronische Nierenerkrankung betraf 2017 in einer weltweiten Untersuchung 698 Millionen Patienten mit 20 Millionen Neuerkrankungen jährlich, somit fast 10 Prozent der Weltbevölkerung und stellt als zwölft häufigste Todesursache weltweit (1,4 Millionen Todesfälle zwischen 1990 und 2017) ein substantielles Mortalitätsrisiko dar (1).

Die chronische Nierenerkrankung wird nach der „Kidney Disease: Improving Global Outcomes“-Organisation (KDIGO) entsprechend der GFR und der Albuminurie in fünf Stadien aufgeteilt. Diese stratifizieren die Nierenerkrankung eines Patienten nach Ursache, Schwere und Progressionswahrscheinlichkeit (2). Von terminaler Niereninsuffizienz, dem Stadium G5 nach KDIGO, (im Englischen end stage kidney disease, ESKD) spricht man ab dem Unterschreiten einer eGFR von 15ml/min, was im Regelfall mit der Notwendigkeit eines Nierenersatzverfahrens (Hämodialyse, Peritonealdialyse oder Nierentransplantation, s. Kapitel 1.1.1.) einhergeht. Dies betraf 2016 in einer weiteren großen, weltweiten Registerarbeit mit knapp 7 Millionen Patienten 0,1% der Bevölkerung (3).

Terminale Niereninsuffizienz (Stadium G5D nach KDIGO) mit Dialysepflichtigkeit betraf 2020 nach einem für den gemeinsamen Bundesausschuss erstellten Bericht des Instituts für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen (IQTIG) in Deutschland über 84000 Patienten, passend zu den o.g. weltweiten Zahlen.

Neben der erhöhten Sterblichkeit entsteht durch Niereninsuffizienz eine relevante sozioökonomische Belastung. So betragen beispielsweise die in Deutschland alleine durch Dialysebehandlung entstehenden Kosten 32000 – 58000 Euro jährlich pro

Dialysepatient zusätzlich zu schlecht kalkulierbaren volkswirtschaftlichen Kosten durch reduzierte oder ausfallende Erwerbstätigkeit (4–6).

### 1.1.1. Dialysemodalitäten

Im Falle terminaler Niereninsuffizienz sind Patienten auf ein Nierenersatzverfahren angewiesen. Hier stehen verschiedene Dialyseverfahren oder die Nierentransplantation zur Verfügung.

#### 1.1.1.1. Hämodialyse, Hämofiltration, Hämodiafiltration

Die häufigste Form der Dialyse ist die Hämodialyse (HD), bei der über einen großlumigen Zugang (Hämodialysehunt, Gefäßkatheter) zum Gefäßsystem des Patienten und mittels einem an eine semipermeable Membran angeschlossenen Pumpensystem unter Zuhilfenahme osmotischer (Hauptmechanismus der Hämodialyse) und Druckgradienten (Hauptmechanismus der Hämofiltration) in eine gegenläufig gepumpte, an die Bedürfnisse des Patienten anpassbare Flüssigkeit (Dialysat) harnpflichtige Toxine entfernt werden. Die Hämodiafiltration ist eine Kombination der beiden o.g. Verfahren.

Der Behandlungsumfang beträgt in aller Regel je drei bis fünf Stunden an drei Tagen pro Woche. (7, 8)

#### 1.1.1.2. Peritonealdialyse

Alternativ steht die Peritonealdialyse (PD) zur Verfügung, bei der das Bauchfell (Peritoneum) als Dialysemembran verwendet wird, indem über einen operativ implantierten Katheter Dialysatflüssigkeit in den Bauchraum des Patienten eingefüllt und nach einigen Stunden Osmose wieder abgelassen wird. (7, 8).

Es existieren weitere, spezielle Dialysemodalitäten, auf die allerdings aufgrund des deutlich selteneren Einsatzes hier nicht gesondert eingegangen wird.

## 1.2. Nierentransplantation

### 1.2.1. Grundlagen und Epidemiologie

Die Nierentransplantation als alternatives Nierenersatzverfahren weist im Vergleich zur chronischen Dialysetherapie für nahezu alle Patientengruppen, insbesondere aber für jüngere Patienten und Patientinnen eine bessere Gesamtmorbidität und -mortalität (9–12) auf. Desweiteren wurde im Vergleich zur Dialysebehandlung nicht zuletzt durch gesteigerte Selbstbestimmung und Unabhängigkeit von zeitaufwändigen Behandlungen ein höheres Empfinden von Lebensqualität gezeigt (13, 14).

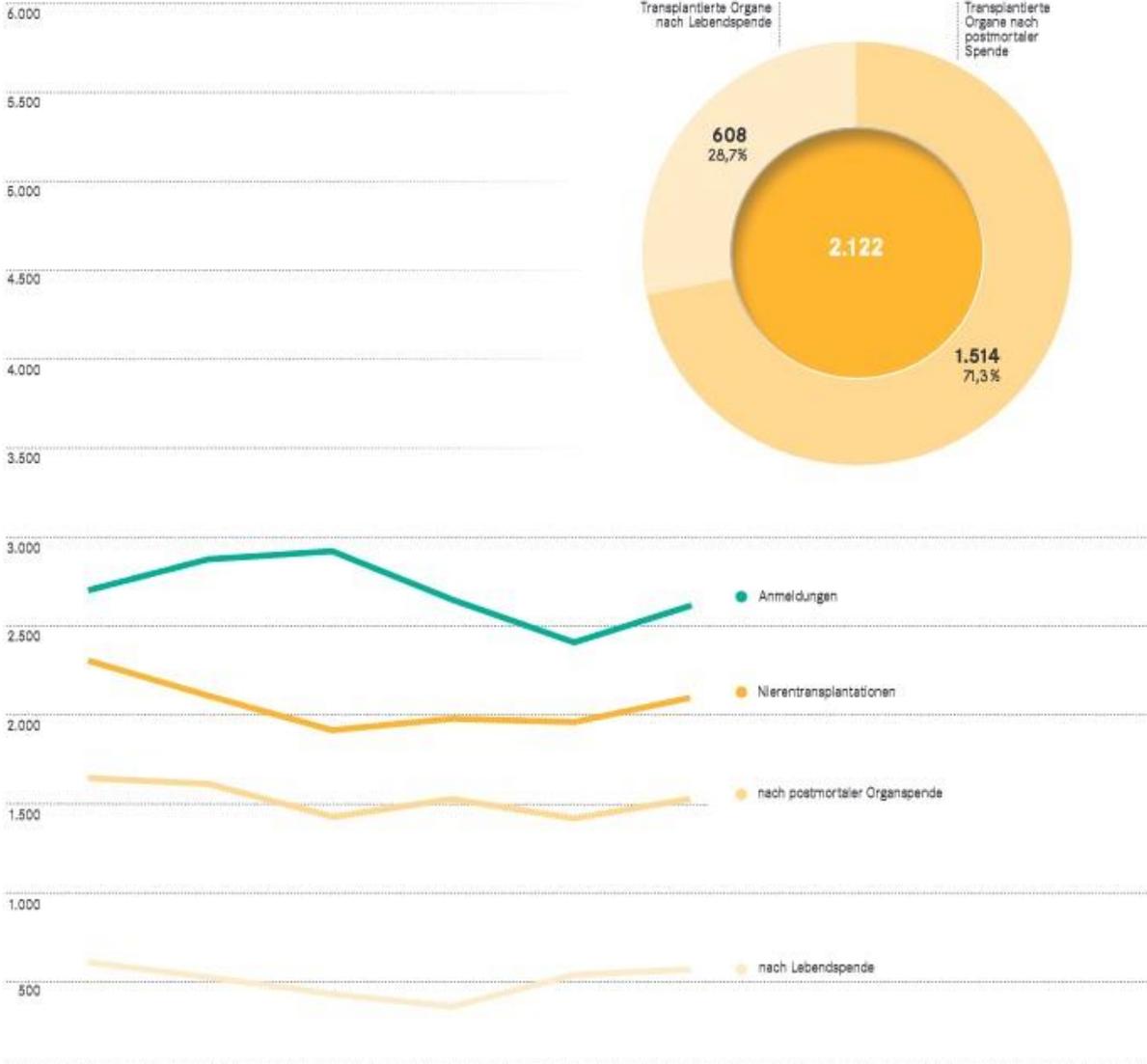
Die durchschnittliche dialysefreie Zeit („Transplantatüberleben“) nach einer Nierentransplantation betrug in einer 2021 durchgeführten US-amerikanischen Registerstudie 11,7 Jahre (15) und wird wesentlich durch abstoßungsbedingte entzündliche Prozesse begrenzt, die zu einer Transplantatfibrose führen (16–18).

Die mangelnde Verfügbarkeit postmortalen Spenderorgane stellt weltweit, aber insbesondere in Regionen mit niedriger Spendebereitschaft wie Deutschland, ein fortwährendes Problem dar. (19)

So wurden 2023 in Deutschland bei 10454 Patienten auf der Warteliste 2122 Patienten erfolgreich nierentransplantiert, wobei 2299 Neuanmeldungen erfolgten und 289 Patienten auf der Warteliste verstarben. Der Anteil der transplantierten Nieren nach Lebendspende belief sich 2023 deutschlandweit auf 28,7% (siehe Abb. 1) (20).

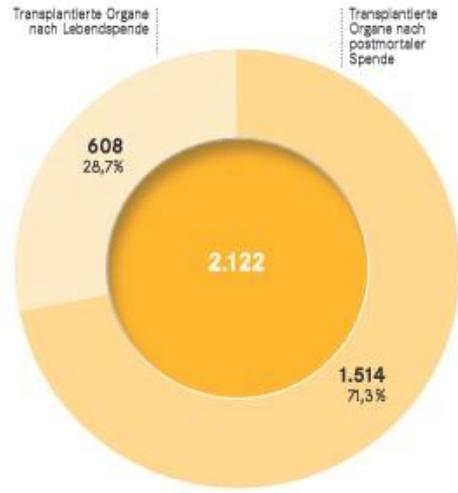
### Anmeldungen und Nierentransplantationen

Deutschland 2018 bis 2023 | Anzahl  
DSO 270



### Nierentransplantationen

Deutschland 2023 | Anzahl und prozentualer Anteil  
DSO 280



Jahr	2018	2019	2020	2021	2022	2023
Anmeldungen	2.692	2.797	2.926	2.683	2.407	2.617
davon Neuanmeldungen	2.347	2.449	2.555	2.336	2.142	2.299
davon Wiederholungsanmeldungen	345	348	371	317	265	318
Nierentransplantationen	2.291	2.132	1.910	1.992	1.966	2.122
davon nach postmortaler Organspende	1.653	1.612	1.459	1.517	1.431	1.514
davon nach Lebendspende	638	520	451	475	535	608

Abbildung 1: Anwendungs- und Transplantationszahlen zur Nierentransplantation in Deutschland 2023 nach dem Jahresbericht der Deutschen Stiftung für Organtransplantation DSO (20)

### 1.2.2. Allokation

Die Verteilung (Allokation) postmortaler Spenderorgane erfolgt in Deutschland innerhalb eines knapp 140 Millionen Menschen umfassenden Staatenverbundes mit Österreich, Belgien, den Niederlanden, Luxemburg, Ungarn, Slowenien und Kroatien über *Eurotransplant*, eine in Leiden in den Niederlanden ansässige Organisation, die in Deutschland der Kontrolle einer nationalen Prüfungskommission unterliegt (§12 TPG) (21).

Die Allokation von Spenderorganen über Eurotransplant erfolgt im Standardallokationsprogramm *ETKAS* anhand einer für jedes Organangebot neu auf Boden einer Punktzahl erstellten Rangliste. Die Punktzahl setzt sich bei der Allokation von Nieren maßgeblich aus der Wartezeit seit Beginn der chronischen Dialysebehandlung, lokalem Punktebonus (regionaler Korrekturfaktor für gespendete Organe und geografische Nähe des Organs zum potenziellen Empfänger), Punkte für die Übereinstimmung der *HLA*-Gewebeemerkmale -A, -B und -DR (siehe Absatz 1.2.4), welche die immunologische Kompatibilität abschätzen lassen sollen, sowie Bonuspunkten für die Prätestwahrscheinlichkeit eines passenden Organangebotes (*mismatch probability*) zusammen. (22)

Abseits des Standardallokationsprogrammes *ETKAS* existieren Sonderprogramme für Kinder, über 65-Jährige (*Eurotransplant Senior Program*, ESP), hochimmunisierte Patienten (*Accepted Mismatch Program*, AM), Patienten, bei denen eine hochdringliche (*High Urgency Program*, HU)-Indikation für eine Nierentransplantation festgestellt wurde, sowie für Patienten, die eine Nierentransplantation nach einer anderen Organtransplantation bei vorbestehender Dialysepflichtigkeit benötigen (*Kidney After Other Organ Program*, KAOO), für die andere Allokationsregeln gelten. (22)

FROM ONE HUMAN TO ANOTHER

# THE JOURNEY OF A DONATED ORGAN

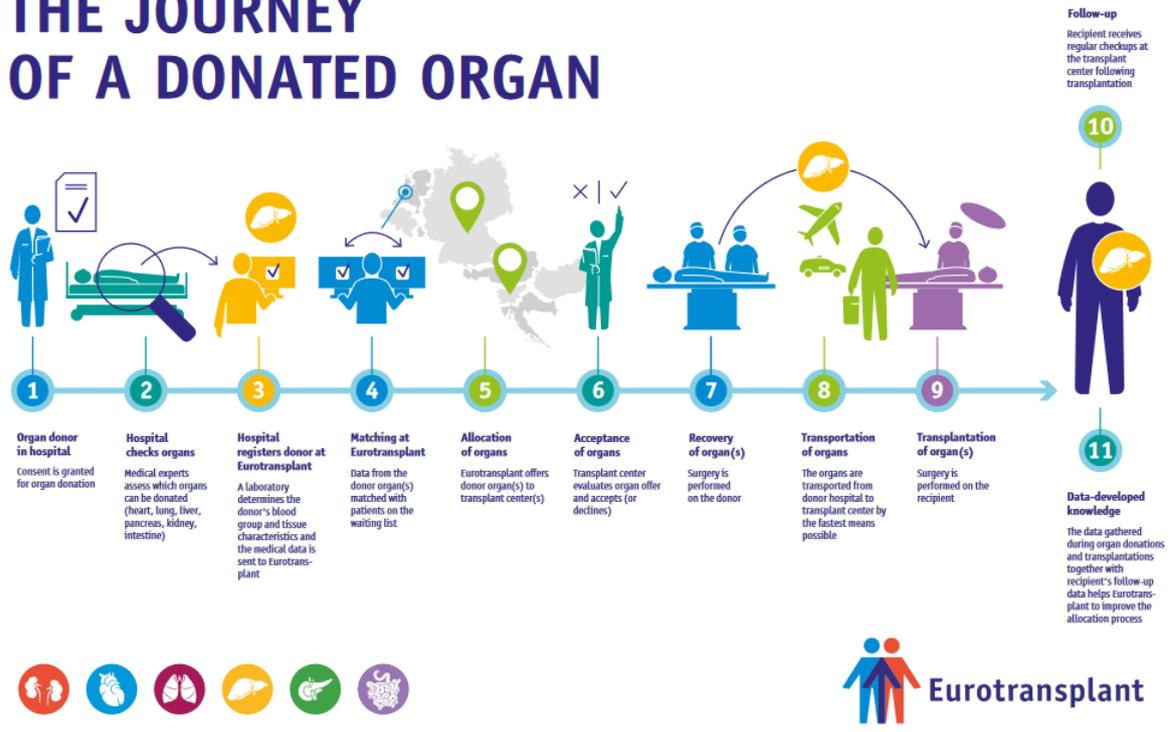


Abbildung 2: Grafische Darstellung des logistischen Prozesses um Organallokation und -transplantation. (23)



Bei letzterer Anastomose werden verschiedene Techniken zur Minderung des vesikoureteralen Refluxes eingesetzt, beispielsweise nach Lich-Gregoire (27).

#### Open Technique

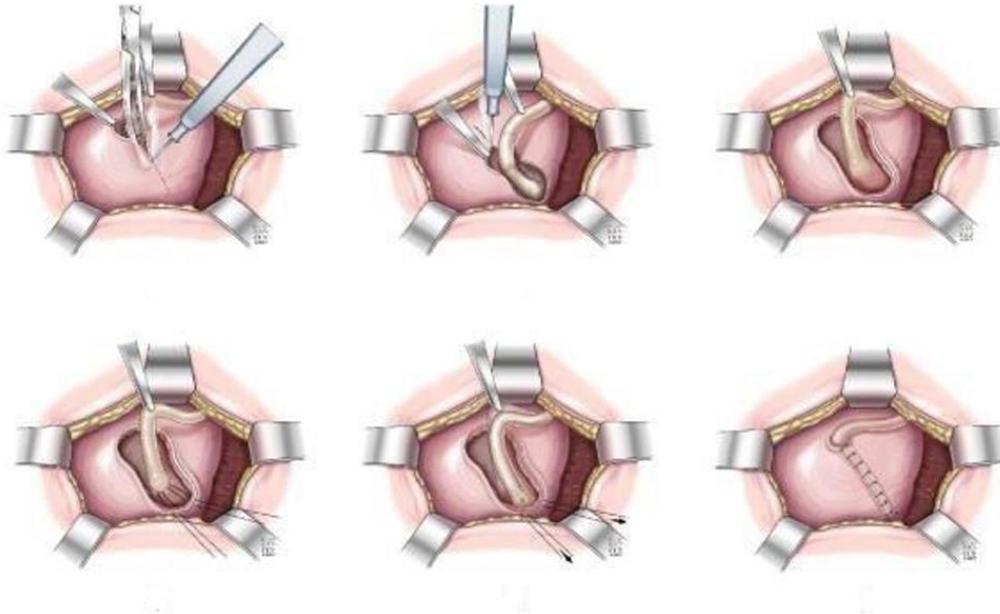


Abbildung 4: Verbildlichung der offenen Lich-Gregoireshen Antirefluxplastik dargestellt nach Bustangi et al. (28). Hierbei wird die Muskelschicht mittels Längsschnitt eröffnet, der Spenderureter in ein am Ende der Inzision erschaffenes Neoostium implantiert und der Ureter über einige Zentimeter in der Muskelschicht geführt, um längerstreckige Kompression und Refluxprävention zu erreichen, da das Neoostium keinen muskulären Sphinkter besitzt.

### 1.2.4. Immunologische Grundlagen

#### 1.2.4.1. HLA-Merkmale

Das Humane Leukozytenantigen-System (HLA-System) ist eine Gruppe von Proteinen, die - mit einer einzigen Ausnahme - von Genen des p-Armes auf dem 6. Chromosom kodiert werden. HLA-Moleküle werden auf der Oberfläche nahezu aller kernhaltiger Zellen exprimiert, dienen der Antigenpräsentation, und beeinflussen maßgeblich die Leukozytenfunktion (29).

HLA-Proteine werden in Klasse I-Antigene (HLA-A, HLA-B, HLA-C) und Klasse II-Antigene (HLA-DM, HLA-DO, HLA-DP, HLA-DQ und HLA-DR) eingeteilt (30).

In der Nierentransplantation konnte in den 1990er Jahren im UNOS Renal Transplant Registry und in der Collaborative Transplant Study gezeigt werden, dass das 1-Jahres-Transplantatüberleben postmortaler Nierenspenden bei 1386 Patienten mit vollständig identischen Merkmalen in den HLA-Loci -A, -B und -DR (*HLA-gematched*) mit 88% vs. 79% signifikant wahrscheinlicher war als das von nicht -A, -B und -DR gematchten Transplantationen (31). Ebenso konnte gezeigt werden, dass das 10-Jahres-Überleben mit einer mismatch-Konstellation von 0:0:0 (keine mismatches) 17% höher war als mit einer mismatch-Konstellation von 2:2:2. (32).

In Zeiten modernerer Immunsuppressiva und genauerer Untersuchungsmethoden der Empfängerseren auf HLA-spezifische Antikörper hat die Bedeutung des klassischen HLA-matchings abgenommen. (33)

In einer 7440 Patienten umfassenden Registerstudie in Neuseeland konnte allerdings weiterhin ein statistisch signifikanter Vorteil HLA-gemachter Nierentransplantationen im Langzeittransplantatüberleben (15,9 vs. 12,7 Jahre) bei statistisch signifikant höherer, wenn auch klinisch möglicherweise nicht bedeutsam höherer eGFR gezeigt werden, wobei in der gematchten Gruppe auch eine geringere Wartezeit vorlag. (34)

#### 1.2.4.2. Abstoßung

Als Abstoßung wird im Allgemeinen eine Alloreaktivität des Immunsystems des Empfängers gegen das Transplantat bezeichnet, die aus Histoinkompatibilität zwischen Spender- und Empfängergewebe entsteht und das Transplantat schädigt oder gar zerstört.

Unter dem Überbegriff Abstoßung wird eine Mehrzahl verschiedener Mechanismen subsummiert, die im Folgenden beleuchtet werden sollen.

#### 1.2.4.2.1. Antikörpervermittelte Anstoßung (*antibody mediated rejection, AMR*)

Bei der AMR haften gegen Spenderantigene gerichtete (*donorspezifische Antikörper, DSA*) zirkulierende Antikörper aus dem Empfängerserum – vornehmlich Antikörper gegen HLA-Antigene, aber auch gegen Blutgruppen- oder andere Antigene wie AT1-Rezeptor (35) – an der Endotheloberfläche des Transplantats an, wodurch Stressmoleküle mit Zytokineigenschaften wie IL-1, IL-6 oder CCL2 freigesetzt werden, wodurch zirkulierende Leukozyten angelockt und aktiviert werden, woraus eine gefäßassoziierte Inflammation und hierdurch eine Transplantatschädigung entsteht. (36, 37)

Desweiteren erfolgt die Aktivierung des Komplementsystems, wodurch durch den *membrane-attack complex* (MAC, C5b-9) weiterer direkter Endothelschaden mit Aktivierung von Thrombozyten durch freigesetzten von-Willebrandt-Faktor (vWF) und andere prokoagulatorische Mechanismen mit als Maximalvariante subsequentem thrombotischem Verschluss der Kapillaren entsteht, eine Form der sog. thrombotischen Mikroangiopathie (TMA). (37)

Die konkreten, typischen histopathologischen Veränderungen wie Glomerulitis, peritubuläre Kapillaritis und C4d-Ablagerung in den Glomeruli und den peritubulären Kapillaren werden in Kapitel 1.2.4.2.3. behandelt und veranschaulicht.

Typisches klinisches Korrelat des glomerulär-vaskulären Schädigungsmusters ist neben einer labrochemischen Nierenfunktionsverschlechterung und typischerweise dem Nachweis zirkulierender donorspezifischer HLA-Antikörper eine ansteigende Proteinurie/Albuminurie als Ausdruck der gestörten glomerulären Barriere. (38)

#### 1.2.4.2.2. T-Zell-vermittelte Abstoßung (*T-cell-mediated rejection, TCMR*)

Eine T-zelluläre Alloreaktion beginnt in der Regel durch Rekrutierung von Empfänger-T-Zellen in Lymphknoten und der Milz, indem antigenpräsentierende Zellen (APC) wie dendritische Zellen (DC) aus dem Transplantat (spenderseitige DC) oder ins Transplantat migrierte APC des Empfängers (DC, Makrophagen, B-Zellen) dort

Spenderantigene präsentieren. (39, 36). Auch können Empfänger-T-Zellen durch direkte Antigenpräsentation tubulärer Epithelzellen oder renaler Endothelzellen aktiviert werden (40).

Analog zu chronischer Entzündung bei chronischer Autoimmunität konnte im Kontext der Herztransplantation (41) wie auch der Nierentransplantation (42) die Ausbildung tertiärer Lymphorgane (TLO) im Spenderorgan gezeigt werden, die in Protokollbiopsien von Nierentransplantatempfängern mit fortwährender Transplantatverschlechterung in Verbindung gebracht wurden (43). Hierüber besteht in der Literatur allerdings keine abschließende Einigkeit (44). Im Tiermodell allotoleranter Empfängermäuse konnte die Formation von TLO-ähnlichen Lymphozytenaggregaten beobachtet und mit verbesserter Transplantatfunktion und verbessertem Transplantatüberleben korreliert werden (45).

Im Kontext der Nierentransplantation mit zellulärer Abstoßung konnte neben T-zellulärer auch B-zelluläre Infiltration charakterisiert werden (46). Wie auch bei der Formation der TLO gibt es hinsichtlich der prospektiven Bedeutung von CD20 und CD38 positiven Infiltraten in Spenderorganen mit zellulärer Abstoßung widersprüchliche Daten (47–50).

Die konkreten, typischen histopathologischen Veränderungen wie Tubulitis, interstitielle Entzündung oder Endothelialitis werden in Kapitel 1.2.4.2.3. behandelt und veranschaulicht.

#### 1.2.4.2.3. Histologie und BANFF-Klassifikation

Als BANFF-Klassifikation bezeichnet man eine von einem internationalen Gremium von Nephrohistopathologen etablierte Sammlung histologischer „Läsionen“, die jeweils in einem „*lesion score*“ graduiert werden und anhand deren Konstellation die Einteilung von Transplantatschädigung und im speziellen gegen das Transplantat gerichteter Entzündungsprozesse („Abstoßungsreaktionen“) in ihrer Ätiologie eingeteilt werden können. Dies beinhaltet u.a. eine Einteilung in T-Zell-vermittelte Abstoßungsreaktionen (T-cell-mediated rejection, TCMR) und B-Zell-vermittelte bzw. antikörpervermittelte Abstoßungsreaktionen (antibody mediated rejection, AMR), deren Schweregrad und eine Unterscheidung hinsichtlich des Alters der Schädigung (akut vs. chronisch) sowie weitere, beispielsweise viropathische Veränderungen. (51)

Passend zur Pathophysiologie sind mikrovaskuläre Schädigungsmuster (Glomerulitis *g*, peritubuläre Kapillaritis *ptc*, thrombotische Mikroangiopathie ohne weitere Ursache) sowie Ablagerungen von Fragmenten des Komplementfaktors C4 *C4d* mit AMR (im Blut zirkulierende, in der Regel gegen HLA-Antigene gerichtete Antikörper) assoziiert. (38)

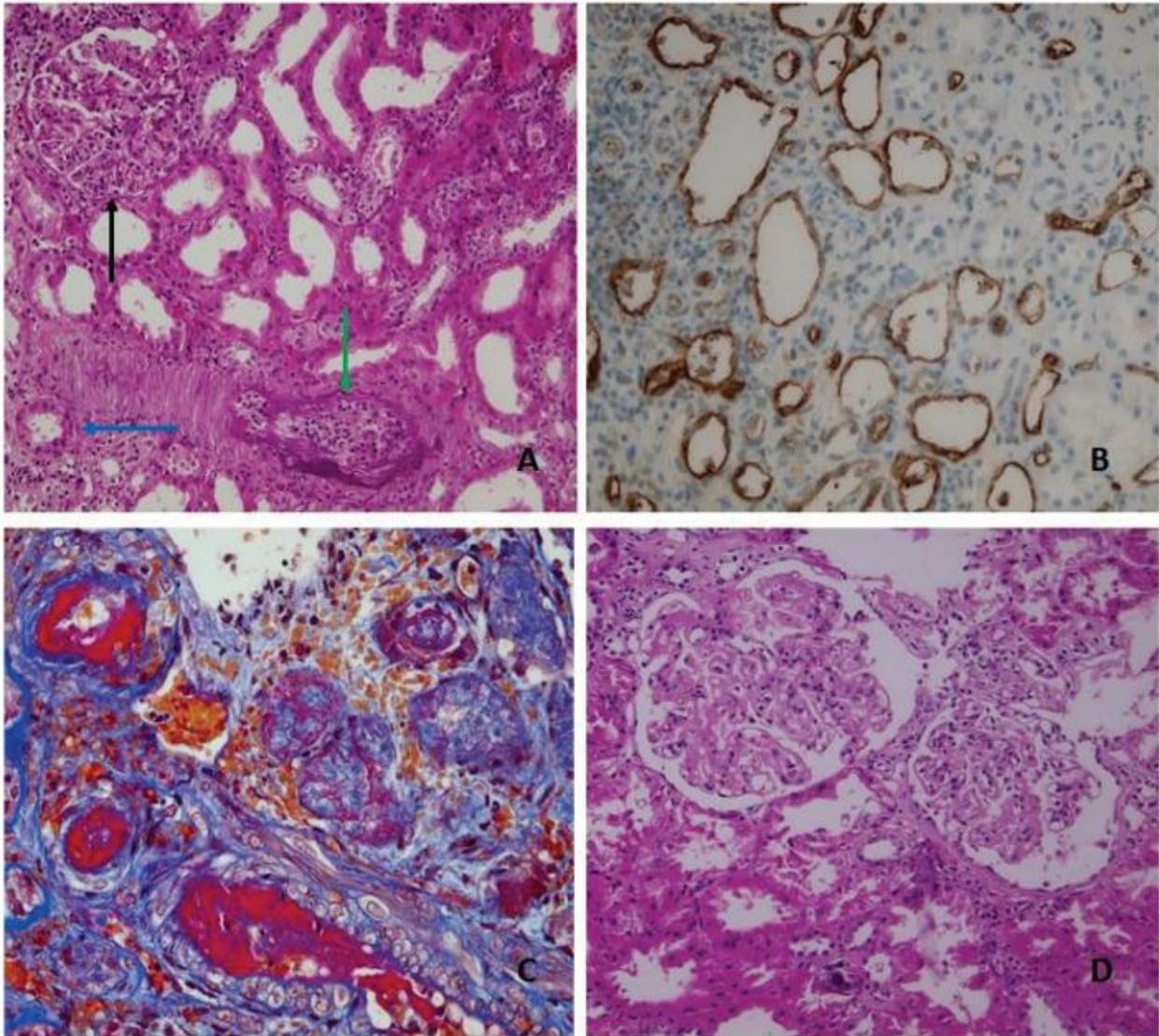


Abbildung 5: Typische histologische Veränderungen der antikörpervermittelten Abstoßung nach Novotný et al. (38). Oben links (Bildabschnitt A): Glomerulitis (schwarzer Pfeil) der BANFF-Stufe g3 (Vollständiger oder teilweiser Verschluss einer oder mehrerer glomerulärer Kapillaren durch Leukozyteninfiltration und endotheliale Schwellung in mehr als 75% der Glomeruli in einer repräsentativen Biopsie nach BANFF-Klassifikation (51). Oben rechts (Bildabschnitt B): kräftige C4d-Positivität der peritubulären Kapillaren in der Immunhistochemie. Unten links (Bildabschnitt C): Kräftig homogen rote Intimale Arteriitis der BANFF-Stufe v3 (transmurale Arteriitis und/oder fibrinoide arterielle Veränderungen mit Nekrose der glatten Mediamuskulatur und lymphozytischen Infiltraten im Gefäß nach BANFF-Klassifikation (51). Unten rechts (Bildabschnitt D): chronisch-sklerotisch obliterierte Glomeruli als Folge einer chronischen glomerulären Entzündung und Ausdruck einer chronischen Transplantatschädigung.

TCMR hingegen ist gekennzeichnet durch interstitiell-zelluläre Schädigungsmuster bzw. Läsionen (Tubulitis *t*, interstitielle Entzündung *i*).

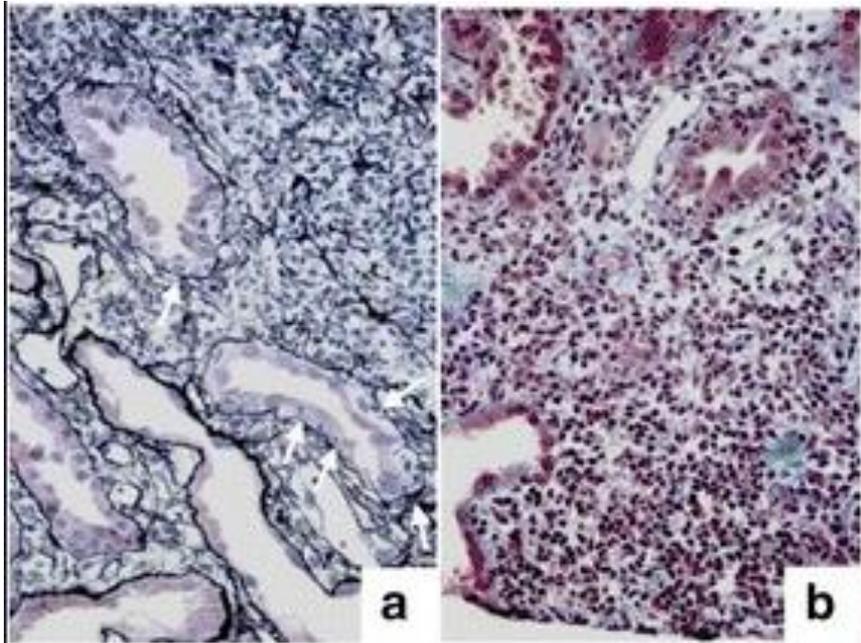


Abbildung 6: Typische histologische Veränderungen der T-zellulären Abstoßung dargestellt nach Katsuma et al. (52). Links (Bildabschnitt a): interstitielle und tubuläre Entzündung entsprechend BANFF lesion score *i3*, *t1* dargestellt durch „entzündliches [d.h. leukozytäres] Infiltrat in nicht vernarbten Kortexarealen, ausgenommen unmittelbar subkapsulären und adventitalen [d.h. um die großen venösen und lymphatischen Gefäße liegenden] Bereichen in mehr als 50% des Interstitiums“ – *i3* und „2 oder mehr Foci von 1-4 intratubulär gelegenen (weiße Pfeile) Entzündungszellen pro Tubulusquerschnitt oder 10 Tubuluszellen“ – *t1*. (51)

Rechts (Bildabschnitt b): ausgedehnte, diffuse und aggressive tubulointertitielle Entzündung entsprechend BANFF-lesion score *i3* (Wortensprechung s.o.) *t3* („2 oder mehr Foci von Tubulitis mit mehr als 10 Entzündungszellen pro Tubulusquerschnitt oder 10 Tubuluszellen oder mindestens 2 Foci mit Zerstörung der tubulären Basalmembran“) (51). Exemplarisch fokale Auflösung der tubulären Basalmembran im Tubulus oben links im Bildabschnitt.

Intimale Arteriitis (*v*) (siehe Abbildung 4, Bildabschnitt C) kann sowohl bei höhergradiger TCMR als auch bei AMR gefunden werden. Gemischte Abstoßungsreaktionen sind nicht ungewöhnlich (53–55).

Für die Einteilung in akute oder chronische Abstoßungsreaktion sind mitunter klinische und/oder serologische Faktoren ausschlaggebend, da allein auf Boden der Histologie eine eindeutige Zuordnung oft nicht möglich ist.

### 1.3. Immunsuppression

Zur Abstoßungsprävention ist nach solider Organtransplantation sowohl eine Induktion mit Immunsuppressiva als auch eine fortwährende (erhaltende) immunsuppressive Therapie nötig. Induktionstherapie bezeichnet eine unmittelbar vor der Transplantation gegebene, hochdosierte immunsuppressive Therapie, die sofortige (hyperakute) Abstoßungsreaktionen verhindern soll. Die Erhaltungstherapie beinhaltet in aller Regel eine Kombination verschiedener Substanzklassen (s.u.), die über Jahre eingenommen wird und über die Zeit in ihrer Intensität in aller Regel verringert werden kann.

#### 1.3.1. Induktionstherapie

##### 1.3.1.1. IL-2-Rezeptor (CD 25) - Antikörper

Als eine von zwei von der KDIGO empfohlenen Substanzen für die Induktion steht in Deutschland seit 1998 der IL-2-Rezeptorantikörper Basiliximab zur Verfügung (56). Er ist ein chimärer Antikörper, der spezifisch an die alpha-Untereinheit des IL2-Rezeptors bindet und die Bindung von IL2 verhindert, so dass Stimulation und Proliferation von T-Zellen verhindert wird. (57, 58).

##### 1.3.1.2. Anti-Thymozyten-Globulin (ATG)

Die zweite der empfohlenen Substanzen ist ATG (56). Es ist ein polyklonales IgG-Gemisch aus Sera von mit humanen T-Zellen immunisierten Tieren wie Kaninchen (bspw. beim Präparat Thymoglobuline). Es bindet an multiple Oberflächenstrukturen humaner T-Zellen und induziert T-Zell-Depletion unter anderem über komplementvermittelte Mechanismen und rezeptorvermittelte Apoptose (59, 60).

Bei immunologischer Hochrisikokonstellation konnten für ATG gegenüber Basiliximab geringere Abstoßungsraten, allerdings auch eine erhöhte Infektgefahr, insbesondere für CMV-Infektion, gezeigt werden (61).

### 1.3.2. Erhaltungstherapie

#### 1.3.2.1. Calcineurininhibitoren (CNI): Tacrolimus (TAC, FK-506) und Cyclosporin A (CyA)

Das Enzym Calcineurin dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor NFAT, wodurch dieser in den Zellkern eindringen kann und die Transkription von Interleukin 2 (IL-2) durch Bindung an den IL-2-Promoter fördert. Hierdurch erfolgt die verstärkte T-Zell-Aktivierung. (62)

Tacrolimus und Cyclosporin A binden in Komplexen an Calcineurin (63) und hemmen dessen Aktivität und damit die o.g. IL-2 induzierte T-Zell-Aktivierung (64).

Es konnte in vitro allerdings auch eine hemmende Wirkung von CNI auf naive B-Zellen gezeigt werden, wodurch ggf. zusätzlich humorale Immunität verringert wird (65).

Spätestens seit der Veröffentlichung der ELITE-Symphony-Studie 2007, in der ein etwas besseres 12-Monats-Transplantatüberleben und geringere akute Abstoßungsrate (66) gegenüber sirolimus- und cyclosporinbasierter Immunsuppression gezeigt werden konnte, ist die Verwendung von Tacrolimus in den Vordergrund der CNI-Therapie gerückt, wobei tendenziell geringere akute Rejektionsrate auch schon in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte (67, 68).

Etwa 90% der nierentransplantierten Patienten in den Vereinigten Staaten 2022 erhielten Tacrolimus als Kern ihrer immunsuppressiven Erhaltungstherapie (69).

Vor allem CyA, aber auch TAC besitzen nephrotoxische Eigenschaften (70), die akute Nierenschädigung unmittelbar nach Transplantation insbesondere bei erhöhten Tacrolimusspiegeln (71), aber auch akute Nierenschädigung im Verlauf durch

Tacrolimus-induzierte Vasokonstriktion afferenter Arteriolen, direkte Tubulustoxizität und ischämische Endothelschädigung mit sekundärer thrombotischen Mikroangiopathie (TMA) (72) beinhalten. In 60% der Fälle konnten in einer Registerstudie nach Nierentransplantation unabhängig von klinischer Relevanz Zeichen von CNI-Toxizität nachgewiesen werden (73).

Auch chronische und progrediente Transplantatschädigung wird mit CNI-Therapie in Verbindung gebracht. So konnte bereits 1984 in einer Studie von 32 Nierenbiopsien herztransplanterter Patienten unter CyA-Therapie tubuläre Atrophie und interstitielle Fibrose (IFTA) und fokal-segmentale Sklerose (FSGS) gezeigt werden. (74)

Auch wenn Tacrolimus eine, verglichen mit CyA, tendenziell geringere Nephrotoxizität besitzt (75), was sich im Rattentiermodell auch in geringerer renaler Fibrose manifestiert (76), scheinen insbesondere Nieren älterer Organspender eine höhere Suszeptibilität gegenüber CNI-abhängiger Nierenschädigung mit entsprechenden histologischen Schädigungsmustern zu haben (77), die sich zwischen den Substanzen prinzipiell kaum unterscheiden (78).

#### 1.3.2.2. Antimetaboliten: Mycophenolat/Azathioprin

Durch Interferenz mit der Nukleinsäuresynthese hemmen die Antimetabolite Mycophenolat-Natrium (MMF) und Mycophenolsäure (MPA) unspezifisch die Proliferation von T- und B-Zellen und sind hierdurch immunsuppressiv wirksam. (79)

Die meistverwendeten Präparate sind MMF/MPA und Azathioprin (AZA) (69), die im Hinblick auf Transplantatfunktion und Gesamtüberleben gleichwertig sind und in über 90% der Nierentransplantierten in den Vereinigten Staaten eingesetzt werden. (69)

Wegen latent besserer Langzeitergebnisse und besserem Nebenwirkungsprofil wird MMF/MPA heutzutage AZA vorgezogen (80). Letzteres stellt allerdings vorbehaltlich einer regelrechten TMPT-Aktivität eine wertvolle Therapiealternative bei Kontraindikation gegen MMF/MPA dar. Hervorzuheben ist hier insbesondere die Behandlung bei Kinderwunsch und Schwangerschaft, da AZA im Gegensatz zu MMF/MPA keine teratogenen Eigenschaften besitzt (81).

### 1.3.2.3. Corticosteroide

Eine weitere wichtige und häufige Säule der sowohl Induktions- als auch erhaltenden immunsuppressiven Therapie ist die Gabe von Corticosteroiden, die von mehr als 70% der Nierentransplantierten eingenommen werden. (69)

Für Patienten mit Kontraindikationen für Steroidtherapie und niedrigem immunologischen Risiko besteht die Möglichkeit einer steroidfreien Immunsuppression, für die in der HARMONY-Studie für Patienten mit niedrigem immunologischen Risiko kein Nachteil gezeigt werden konnte (82).

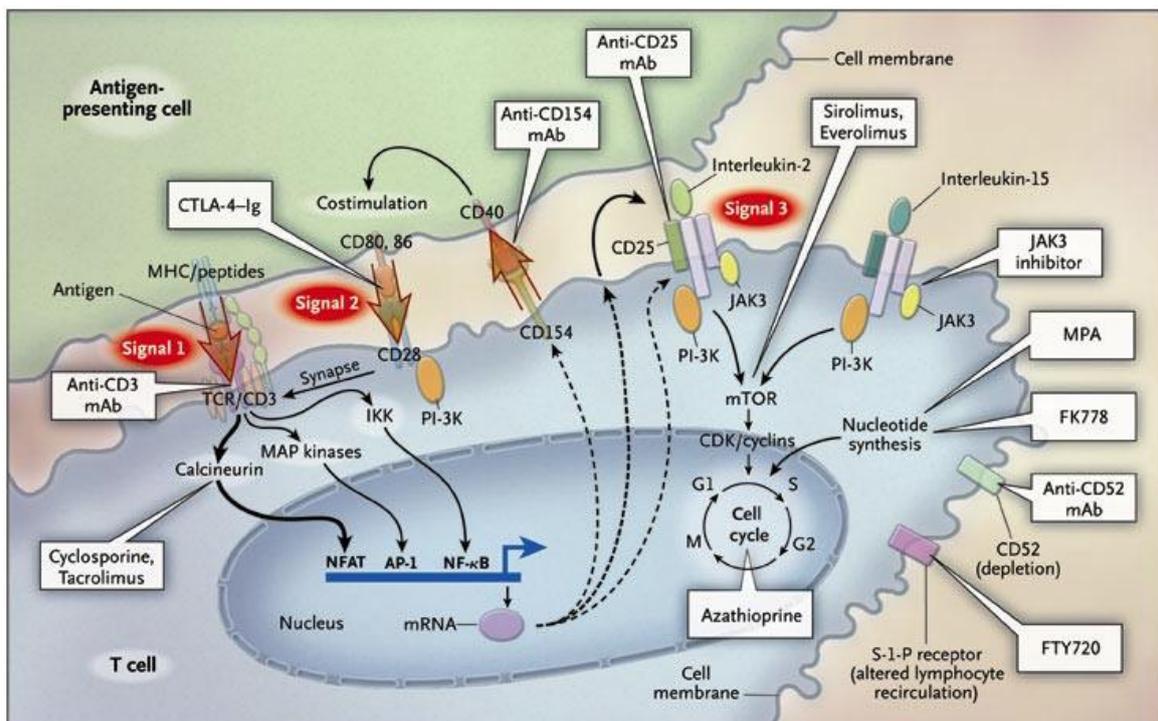


Abbildung 7: Übersicht über molekulare Mechanismen immunsuppressiver Therapeutika dargestellt nach Halloran et al. (83)

## 1.4. Renale Fibrose

Interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie (IFTA) ist die histopathologische Endmanifestation vieler verschiedener Nierenerkrankungen. Sie stellt sowohl in der nativen Niere wie auch im Nierentransplantat die Endstrecke einer komplexen, miteinander verbundenen Kaskade zellulärer Schädigungs- und Reparaturmechanismen dar. Dies ist gekennzeichnet durch die Aktivierung ortsansässiger Zellen mit Ausschüttung proinflammatorischer Moleküle, durch die epithelial-mesenchymale Transition von Tubulusepithelzellen zu Myofibroblasten sowie durch die subsequente Einwanderung von wichtiger Entzündungszellen, insbesondere Makrophagen und Lymphozyten, die die Zerstörung funktionaler Nierenstrukturen zur Folge hat. Das Ergebnis ist die übermäßige Ablagerung von Extrazellulärmatrix (EZM)-Komponenten, welche funktionale Nierenstrukturen ersetzen. Dies wird als Fibrose bezeichnet (84–87).

Im klinischen Kontext ist IFTA ein starker Prädiktor für eine schlechte Prognose sowohl bei CKD von Nativnieren als auch bei Transplantaten, insbesondere wenn sie von Entzündungszeichen als Hinweis auf anhaltende floride entzündliche Prozesse begleitet wird (88). Sie tritt in mindestens 25% der 1-Jahres-Kontrollbiopsien von Nierentransplantaten auf, obwohl gleichzeitig noch keine Verschlechterung der Nierenfunktion vorliegt (89).

## 1.5. B-Cell Activating Factor (BAFF)

Der B-Zell-aktivierende Faktor (BAFF), der von hämatopoetischen Zellen sezerniert wird, ist ein Mitglied der TNF-Proteinfamilie und spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Überlebensfähigkeit von B-Zellen (90). Erhöhte BAFF-Spiegel wurden u.a. bei Patienten mit systemischem Lupus Erythematoses (SLE) festgestellt und hier mit einer verstärkten Krankheitsaktivität in Verbindung gebracht (91). Zusätzlich weiß man, dass BAFF von tubulären Epithelzellen (TEC) sezerniert wird und mit der Aktivität von Lupusnephritis Klassen II-IV korreliert (92). BAFF hat nicht nur Auswirkungen auf die Reifung und das Überleben von B-Zellen, sondern wurde

auch auf der Oberfläche von Th17-Zellen identifiziert (90). Letztere sind eine Subklasse IL-17 sezernierender proinflammatorischer T-Helferzellen (93), für die eine proinflammatorische Rolle im klinischen Kontext des SLE (94) nachgewiesen wurde. Zudem werden höhere Infiltrationsdichten von Th17 im Kontext humaner Nierentransplantation in einigen Arbeiten mit TCMR und erhöhter Abstoßungsschwere in Verbindung gebracht. (95, 96)

Bei systemischem Lupus erythematodes sowie bei Lupusnephritis ist der anti-BAFF-Antikörper Belimumab zur Behandlung zugelassen und hat in den letzten Jahren an therapeutischer Bedeutung gewonnen. Es konnte gezeigt werden, dass Belimumab den Verlust von eGFR und das Fortschreiten von Albuminurie bei bioptisch nachgewiesener LN verlangsamt (97, 98).

Im Transplantationssetting konnte gezeigt werden, dass BAFF-Spiegel das individuelle immunologische Risiko der Patienten für die de-novo-Bildung von HLA-Antikörpern (99) , Abstoßungen (100), insbesondere die durch Antikörper vermittelte Abstoßung (101, 102), widerspiegeln und als Risikostratifizierungsinstrument (103) des immunologischen Risikoprofils der Patienten verwendet werden können. Eine Anti-BAFF-Behandlung konnte das Risiko für ABMR bei Ratten senken (104) und wurde bei stark immunisierten Dialysepatienten, die auf eine Nierentransplantation warten, zur Senkung ihres *virtual Panel Reactive Antibody Index* (vPRA) (105) sowie in einer Phase-2-Studie zur *add-on* Induktionstherapie (106) eingesetzt.

## 1.6. Dickkopf-3 (DKK3)

Dickkopf-3 (DDK3) ist ein Mitglied der Dickkopf-Glykoprotein-Familie, die aus 4 Mitgliedern (DKK 1-4) besteht. Für DKK3 konnten immunmodulatorische Eigenschaften gezeigt werden.

In murinen Nierenschädigungsmodellen, konkret der unilateralen Ureterobstruktion (UUO) und der Adenninephropathie konnte gezeigt werden, dass DKK3 von gestressten tubulären Epithelzellen (TEC) sezerniert (107), hierdurch lokale T-Zell-

Antwort beeinflusst und renale Fibrose über den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Weg gefördert wird (108). Die Tatsache, dass der genetische Knockout oder die pharmazeutische Blockade von DKK3 die renale Fibrose in diesen Modellen verringert, macht sie zu einem potenziellen therapeutischen Ziel.

Im Kontext humaner, klinischer Anwendung wurde gezeigt, dass die Urin-DKK3-Konzentration zusätzliche akute Nierenschädigung bei CKD (109), perioperative akute Nierenschädigung bei Patienten mit Herz-Thorax-chirurgischen Eingriffen (110) und in anderen spezifischen Umständen wie COPD und kontrastmittelassoziierter akuter Nierenschädigung (111, 112) vorhersagen kann. Zudem besitzt sie prädiktive Eigenschaften für die perspektivische Transplantatfunktion beim Menschen (113).

Dies hat zur Etablierung von DKK3 als kommerziell routinemäßig bestimmbarer Marker geführt (114).

## 1.7. Hypothesen

Wir hypothesierten, dass die Anti-BAFF-Behandlung

1) Migrationsmuster von Immunzellen, insbesondere T- und B-Zellen, ins und im Transplantat beeinflussen.

Darüber hinaus fragten wir uns, ob

2) dies zu einer Verminderung der intragraft-Fibrose führt und ob sich dies in

3) unterschiedlicher DKK3-Expressionsstärke widerspiegelt.

## 2. Material & Methoden

### 2.1. Versuchstiere, Nierentransplantation und immunsuppressive Behandlung

Um unsere Hypothesen zu testen, griffen wir auf ein bei uns etabliertes Nierentransplantationsmodell in der Ratte zurück. Tierversuche wurden von den lokalen Behörden genehmigt und gemäß den Tierschutzgesetzen durchgeführt. Die Nierentransplantation (NTx) wurde anhand eines etablierten Protokolls wie folgt durchgeführt (115):

42 männliche Brown Norway-Ratten dienten als Spender und männliche Lewis (LEW)-Ratten als Empfänger (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland). Die linke Niere der Brown-Norway-Ratten wurde orthotop in LEW-Ratten transplantiert. Rechte Nieren der Empfängertiere wurden entfernt. (115) Zudem erfolgte als Kontrollgruppe eine syngene Transplantation (LEW auf LEW) in 5 Versuchstieren.

Zur Beurteilung der Auswirkung verschiedener Dosen von CNI, um z.B. Nonadhärenz zu verbildlichen, ein möglicherweise CNI-sparendes Regime zu etablieren und den zusätzlichen Einfluss einer anti-BAFF-Behandlung zu bewerten, wurden verschiedene immunsuppressive Schemata - ohne Einsatz einer dezidierten Induktionstherapie mit gesonderten Präparaten - angewandt:

Die Standardimmunsuppression betrug täglich 10 mg Cyclosporin A (CyA)/kg (*highCNI*, n = 10).

Um eine chronische Abstoßung (CR) und die Entwicklung von DSA zu ermöglichen und untersuchen zu können, erhielt eine Versuchsgruppe (*lowCNI*, n = 10) eine diskontinuierliche, reduzierte Dosis Cyclosporin A (5 mg/kg/Tag an den Tagen 0–7 nach NTx i.S.e. abgemilderten Induktionstherapie und ab Tag 7 5mg/kg/Tag alle zwei Tage).

Eine weitere Versuchsgruppe (*lowCNI+aBAFF*, n = 9) erhielt zusätzlich zu o.g. *lowCNI*-Regime einen monoklonalen BAFF-Antikörper (Hamster-Anti-Maus-BLYS-Antikörper 10F4, GSK, Hamburg) intraperitoneal in einer Dosis von 10 mg/kg an den Tagen 3, 17, 31 und 45 nach der NTx.

Eine letzte Versuchsgruppe von Ratten (*medCNI*, n = 8), erhielt täglich eine reduzierte CyA-Dosis (5 mg/kg/Tag).

Die Ratten wurden je zur Hälfte an Tag 28 oder Tag 56 nach der NTx euthanasiert. Als zusätzliche Kontrolle für den Einfluss des operativen Verfahrens und der Immunsuppression unter Ausschluss immunologischer Komponente wurde eine syngene Transplantation durchgeführt und an Tag 56 euthanasiert (n = 5). Diese Gruppe erhielt keine immunsuppressive Medikation. Die experimentellen Gruppen waren damit wie folgt:

	Erhaltungs- immunsuppression	Abkürzung	Behandlungsdauer	Gruppengröße
allogen	CyA (10mg/kg/d) täglich	highCNI	28 Tage	n = 5
			56 Tage	n = 5
	CyA (5mg/kg/d) täglich	medCNI	28 Tage	n = 5
			56 Tage	n = 3
	CyA (5mg/kg/d) an alternierenden Tagen	lowCNI	28 Tage	n = 5
			56 Tage	n = 5
CyA (5mg/kg/d) an alternierenden Tagen + anti-BAFF-antibody (10mg/kg i.p.) an Tag 3,17,31,45	lowCNI+aBAFF	28 Tage	n = 5	
		56 Tage	n = 4	
syngen	syngene Transplantation ohne Immunsuppression	syngen	56 Tage	n = 5

Tabelle 1: Übersicht über die experimentellen Gruppen.

In keinem der untersuchten Items unterschied sich die Gruppe der *lowCNI* und *medCNI*-behandelten Tiere statistisch signifikant voneinander, so dass im Folgenden der Übersichtlichkeit halber nur die Ergebnisse von *lowCNI* dargestellt werden.

## 2.2. Histologie und Immunhistochemie

Paraffinschnitte der entnommenen Transplantate wurden mit Hämatoxylin und Eosin sowie Periodic-Acid-Schiff gefärbt und von einem unabhängigen Nephrologen gemäß den Banff-Kriterien ausgewertet (51).

Drei Mikrometer dicke formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Milzabschnitte wurden mit Anti-DKK3 (bei Invitrogen, PA5-102626), Anti-CD68 (Serotec, MCA341GA), Anti-CD3 (Abcam, ab5690), Anti-CD4 (CellSignaling # 25229-S), Anti-CD8 (Santa Cruz sc-70802), Anti-CD20 (Abcam ab64088) gefärbt. Die Färbung erfolgte gemäß einem aus unserer Arbeitsgruppe bereits veröffentlichten standardisierten Immunhistochemieprotokoll (116).

Unter Verwendung dieser Färbungen wurden T-Lymphozyten (CD3+, CD4+, CD8+), Makrophagen (CD68+) und B-Zellen (CD20+) gezählt. Ihre Anzahl wurde dann proportional zur Gesamtzahl der kernhaltigen Zellen auf jedem Schnitt berechnet.

Weitere Färbungen wurden mit Alpha-SMA-Antikörpern und Trichrom durchgeführt, um histologisch die Fibrose zu bewerten. Die Fläche der Alpha-SMA- und Trichrom-positiven Fläche wurde proportional zur Gesamtfläche analysiert. Eine erhöhte Expression von Alpha-SMA durch Myofibroblasten ist einer der Hauptbefunde bei der anhaltenden übermäßigen Ablagerung von extrazellulären Matrixkomponenten wie Kollagen und Fibronectin (117).

### 2.3. Real-Time Polymerase Chain Reaction (rtPCR)

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurde in vorbeschriebener Weise (118) durchgeführt.

Die Kopienzahl der Zielgene wurden auf die Expression des *housekeeping*-Gens Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase normiert und als Deltazyklusschwellenwerte angegeben.

Die Sequenzen der Primer waren:

rHPRTneu forw: 5'-GCA GAC TTT GCT TTC CTT GG-3'

rHPRTneu rev: 5'-TCC ACT TTC GCT GAT GAC AC-3'

rDKK3 forw1: 5'-AAG GCA AGA AGA GCC ATG AA-3' rDKK3

rDKK3 rev1: 5'-CTC ACT GTC TCG GGT GCA TA-3'.

### 2.4. Statistik

Die Daten wurden mit IBMs SPSS Statistics-Viewer analysiert. Werte innerhalb der Gruppen wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft (s. Tabellen A1-A10 in der Appendix). Waren die Werte innerhalb der Gruppen normalverteilt, wurde zur Prüfung signifikanter Unterschiede der Students-t-Test, andernfalls der nonparametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Zellmigration

##### 3.1.1. B-Zellen

Der Anteil CD 20-positiver Zellen war bei Gruppen mit *highCNI* (Mittelwert 0,04%) und *lowCNI+aBAFF*-Behandlung (Mittelwert 0,14%) am Tag 28 signifikant niedriger als bei Ratten, die ausschließlich mit *lowCNI* behandelt wurden (Mittelwert 0,55%) ( $p=0,026$  bzw. 0,05).

Diese Beobachtung konnte am Tag 56 mit mittleren Anteilen von 0,02% (*highCNI*) und 0,018% (*low-CNI+aBAFF*) bestätigt werden, wobei auch hier der Anteil signifikant niedriger war als bei *lowCNI*-behandelten Ratten (0,23%) ( $p=0,014$  bzw. 0,016).

Syngen transplantierte Tiere hatten auf den analysierten Schnitten im Mittel 0,014% B-Zellen, was sich statistisch am Tag 56 nicht signifikant von *lowCNI+aBAFF* oder *highCNI* unterschied. (Abb. 1)

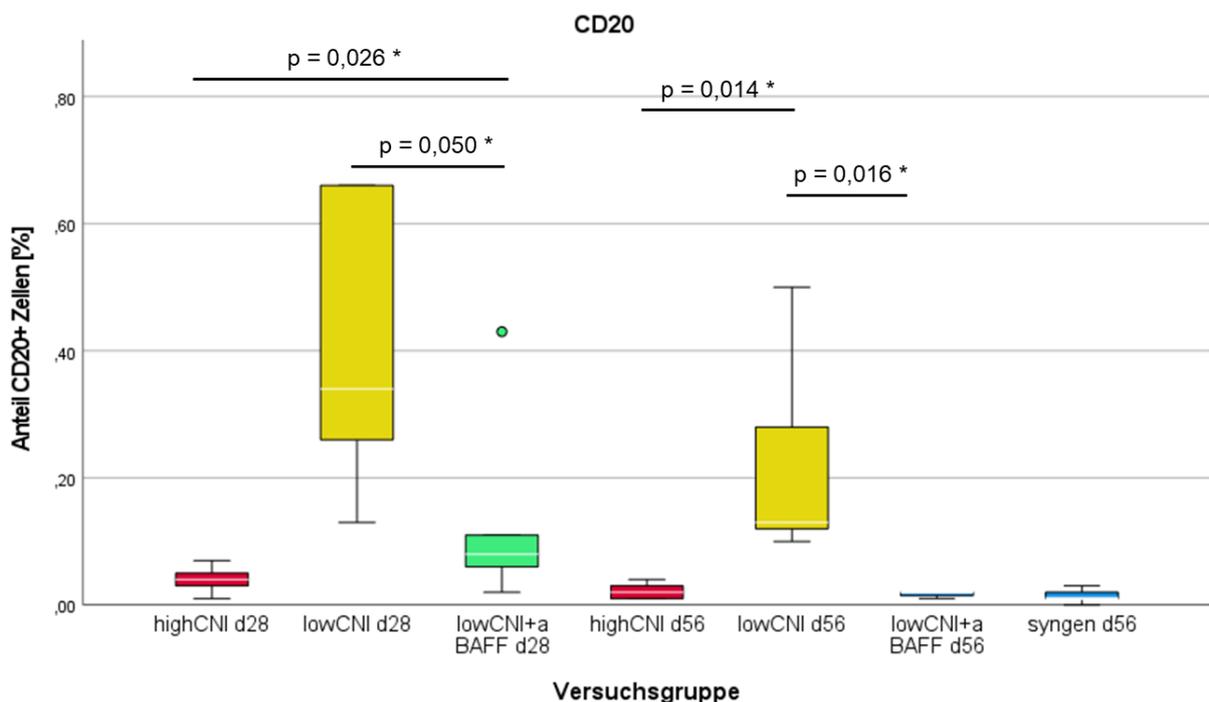


Abbildung 8: Boxplot des Anteils immunhistochemisch CD20+ Zellen (B-Zellen) in Nierenquerschnitten bezogen auf die Versuchsgruppen.

### 3.1.2. T-Zellen

Die Ergebnisse für alle T-Zell-Marker (CD4, CD8, CD3) waren nahezu identisch, so dass hier die Ergebnisse für den pan-T-Zell-Marker CD3 (Abb. 2) exemplarisch diskutiert, die Ergebnisse für CD4 und CD8 in Abbildungen (Abb. 3 und 4) visuell dargestellt werden.

An Tag 28 wiesen Proben der Tiere mit *highCNI* signifikant weniger T-Zellen (0,67%) auf als *lowCNI* (2,87%) und *lowCNI+aBAFF* (3,3%) ( $p=0,009$  bzw.  $<0,001$ ), während die beiden letzten Gruppen (*lowCNI* vs. *lowCNI+aBAFF*) keinen statistisch signifikanten Unterschied aufwiesen.

An Tag 56 wurde dieser Effekt so abgeschwächt, dass zwischen *highCNI* (0,40%), *lowCNI+aBAFF* (0,58%) und syngen transplantierten Tieren (0,37%) kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte, während alle drei signifikant niedriger waren als bei *lowCNI* (1,9%) mit  $p=0,001$ ,  $p=0,006$  bzw.  $p=0,002$ . (Abb. 2)

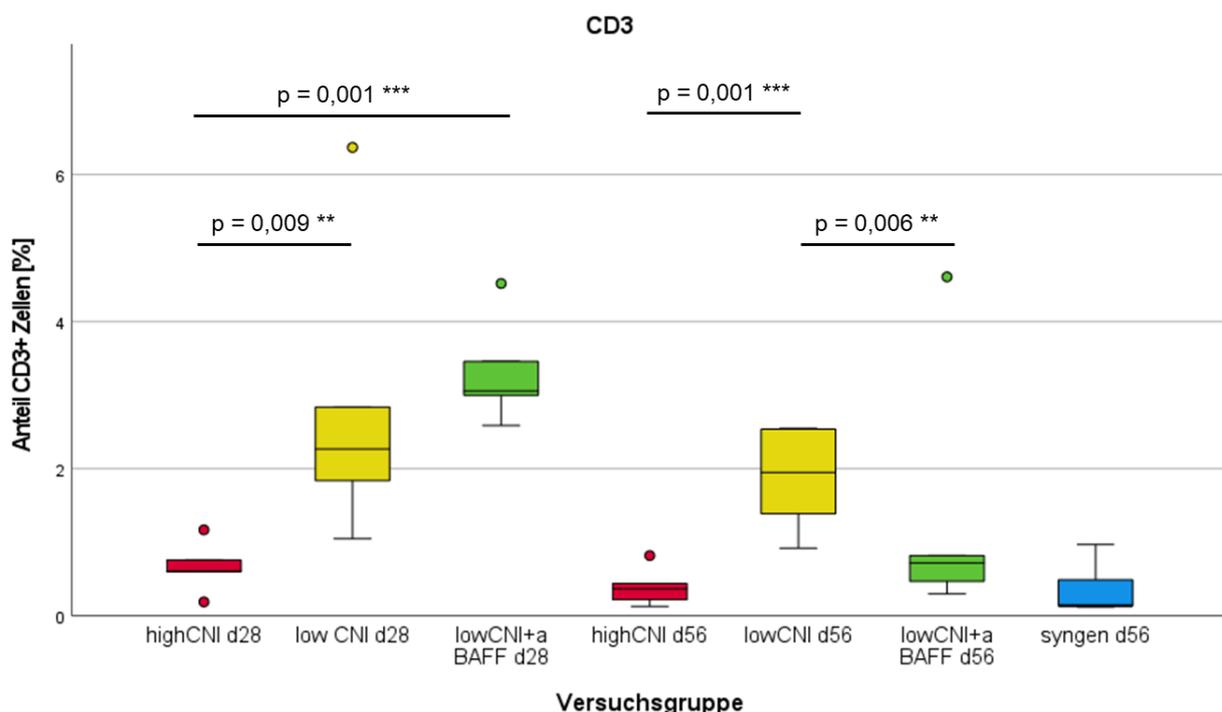


Abbildung 9: Boxplot des Anteils immunhistochemisch CD3+ Zellen (T-Zellen) in Nierenquerschnitten bezogen auf die Versuchsgruppen.

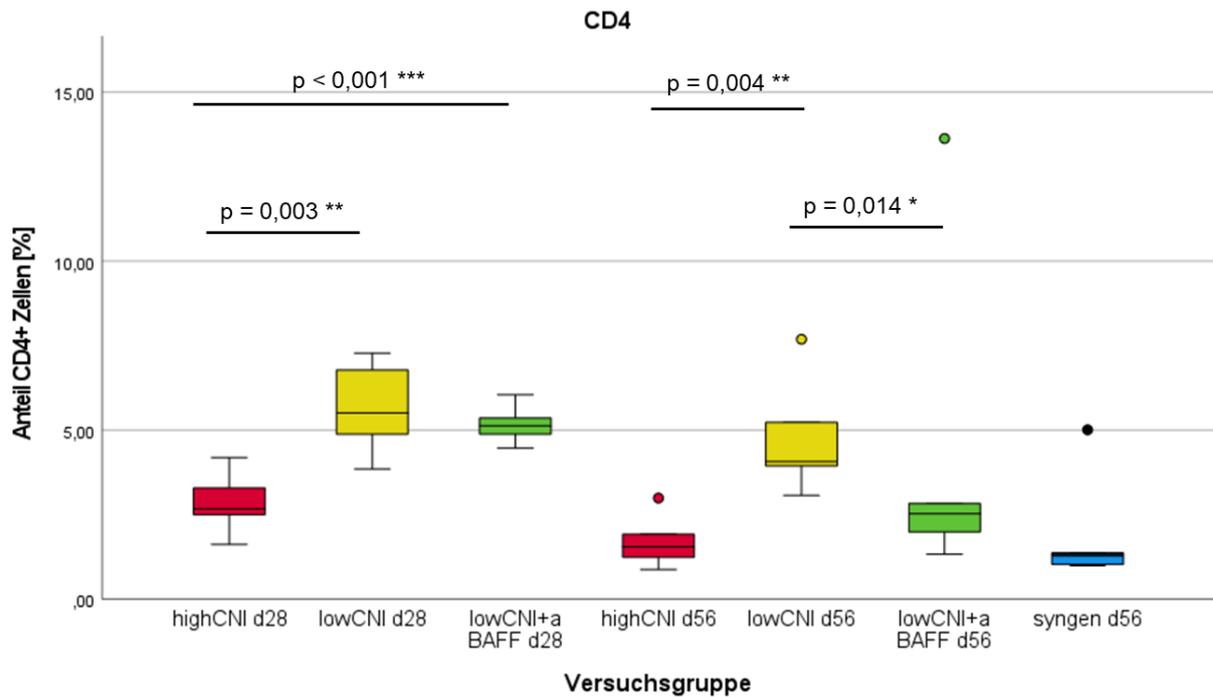


Abbildung 10: Boxplot des Anteils immunhistochemisch CD4+ Zellen (T-Helferzellen) in Nierenquerschnitten bezogen auf die Versuchsgruppen.

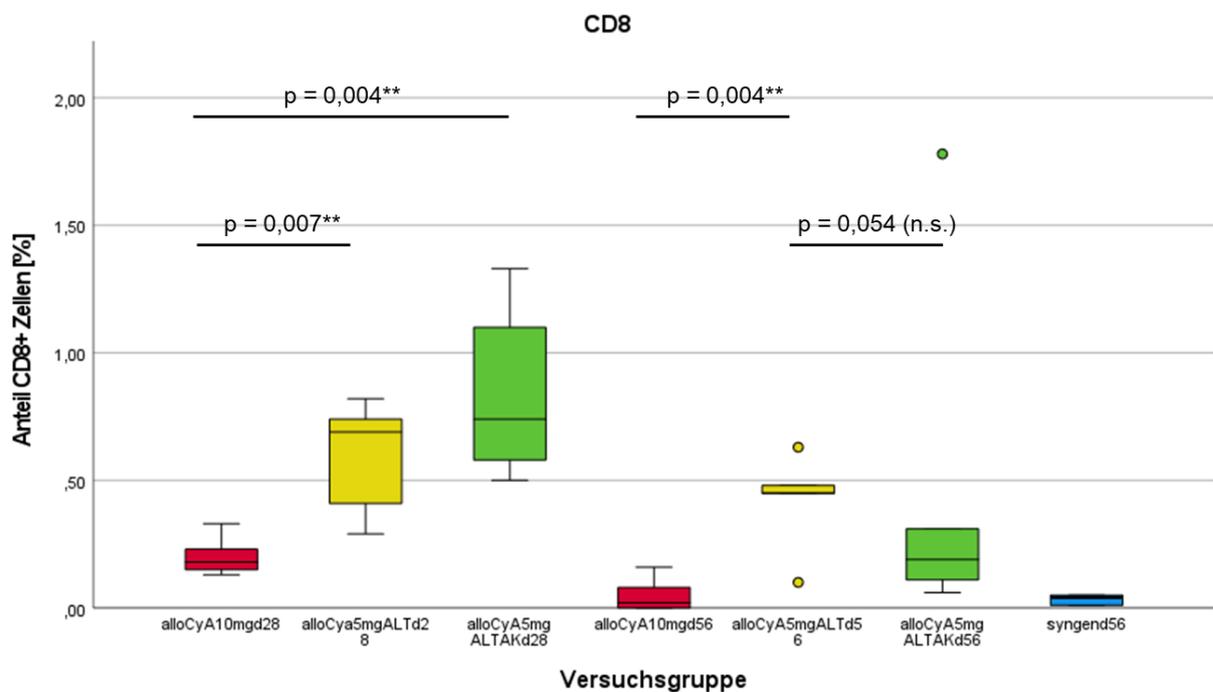


Abbildung 11: Boxplot des Anteils immunhistochemisch CD8+ Zellen (zytotoxische T-Zellen) in Nierenquerschnitten bezogen auf die Versuchsgruppen.

### 3.1.3. Makrophagen

Die Makrophagenfärbung (CD68) zeigte vergleichbare Ergebnisse wie die T-Zell-Analyse.

An Tag 28 war die Makrophageninfiltration in der Gruppe mit *highCNI* am geringsten (1,02% der kernhaltigen Zellen), signifikant niedriger als bei *lowCNI* (2,31%) ( $p = 0,006$ ) und *lowCNI+aBAFF* (2,43%) ( $p=0,023$ ).

An Tag 56 blieben die Werte der syngen transplantierten Tieren (0,35%) gefolgt von der *highCNI*-Gruppe (0,49%) am niedrigsten, während die Tiere mit *lowCNI+aBAFF* ähnlich niedrige Werte aufwiesen (0,68%). Sowohl syngen transplantierte, *highCNI*-behandelte, als auch *lowCNI+aBAFF*-behandelte Tiere wiesen Infiltrationsraten auf, die signifikant niedriger waren als bei *lowCNI*-behandelten Ratten (2,04%,  $p=0,010$ , 0,007 bzw. 0,033), während keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen syngen transplantierten, *highCNI*-behandelten und *lowCNI+aBAFF*-behandelten Tieren nachgewiesen werden konnten.

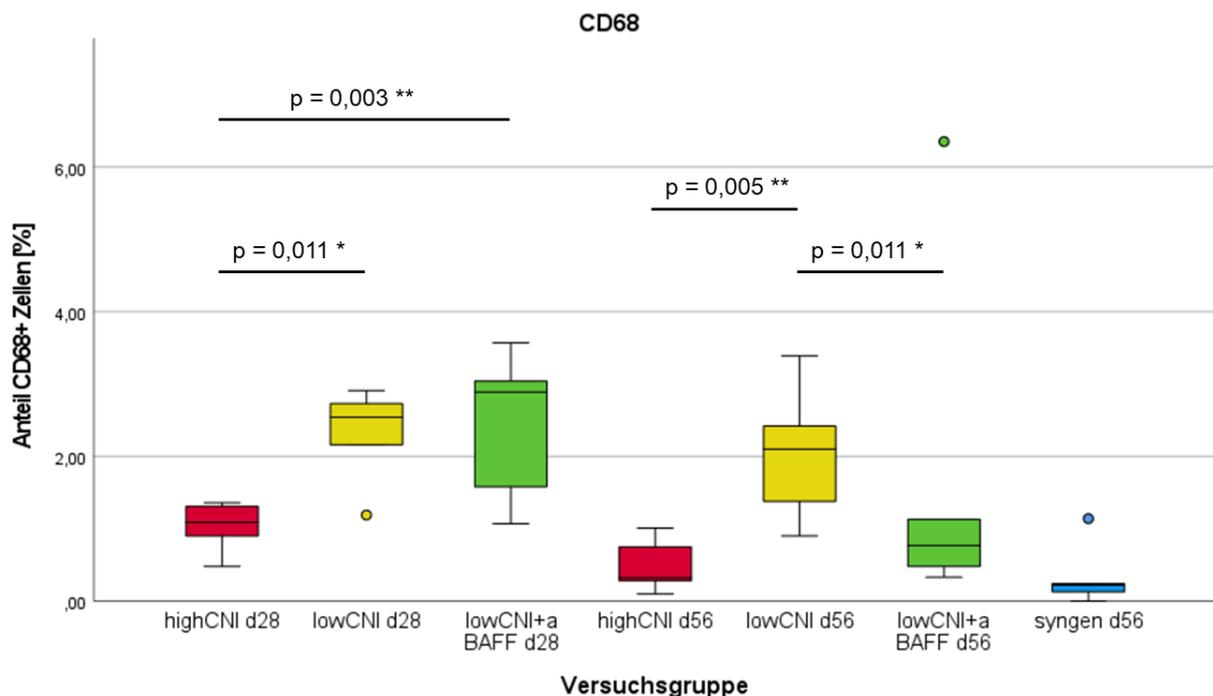


Abbildung 12: Boxplot des Anteils immunhistochemisch CD68+ Zellen (Makrophagen) in Nierenquerschnitten bezogen auf die Versuchsgruppen.

### 3.2. Abstoßung

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen in der Immunhistochemie, die die Immigration von Immunzellen charakterisierte, war die T-Zell-vermittelte Abstoßung gemäß der BANFF-2017-Klassifikation ein häufiges Merkmal in den Gruppen mit reduzierter CyA-Dosierung an Tag 28:

*lowCNI* (n=5, 3x IA, 2x borderline), *medCNI* (n=5, 3x borderline, 1x IB) und am deutlichsten in *lowCNI+aBAFF* (n=5, 5x IA). Bei *highCNI*-behandelten Tieren (n=5) fand sich keine TCMR.

An Tag 56 hielt die TCMR bei *lowCNI* behandelten Ratten (n=5, 3x borderline, 2x IA) an, verschwand aber vollständig bei *lowCNI+aBAFF* behandelten Ratten (n=4, keine Abstoßung); bei Ratten mit *highCNI* und syngen transplantierten Tieren wurde ebenfalls keine Abstoßung festgestellt.

Hinweise für eine AMR fanden sich in keinem der Versuchstiere.

Gruppe	Abstoßungsklassifikation nach BANFF 2017
highCNI (10mg CyA täglich) d28 (n=5)	keine
midCNI (5mg CyA täglich) d28 (n=5)	3x borderline, 1x IB
lowCNI (5mg CyA q2d) d28 (n=5)	3x IA, 2x borderline
lowCNI + aBAFF d28 (n=5)	5x IA
highCNI (10mg CyA täglich) d56 (n=5)	keine
midCNI (5mgCyA täglich) d56 (n=3)	N.T.
lowCNI (5mgCyA q2d) d56 (n=5)	3x borderline, 2x IA
lowCNI + aBAFF d56 (n=4)	keine
syngen (n=5)	keine

Tabelle 2: Abstoßungsgraduierung nach BANFF 2017 - Die Zahl der Ratten mit klinisch manifester Abstoßung waren in der low-CNI-Gruppe hoch. Dies konnte an Tag 56 durch zusätzliche Verabreichung von anti-BAFF, analog zu den Ergebnissen der Zellinfiltration, in der Histologie supprimiert werden.

### 3.3. Intragraft-Fibrose

#### 3.3.1. Trichrom-Färbung

An Tag 28 unterschied sich die Trichrom-positive Fläche nicht signifikant zwischen allen Gruppen, alle zeigten etwa 1% Trichrom-positive Fläche.

An Tag 56 zeigten *lowCNI* behandelte Ratten die meiste Trichrom-positive Fläche (Flächenanteil 2,8%), signifikant mehr als bei *highCNI* (Flächenanteil 1,05%) behandelten Ratten ( $p=0,028$ ). Ein Vergleich zwischen Ratten, die mit *lowCNI+aBAFF* (Flächenanteil 1,69%) und syngenen Transplantaten (Flächenanteil 1,25%) behandelt wurden, erreichte trotz einem klaren Trend zu höheren Werten in *lowCNI* keine statistische Signifikanz ( $p=0,175$  bzw.  $p=0,102$ ).

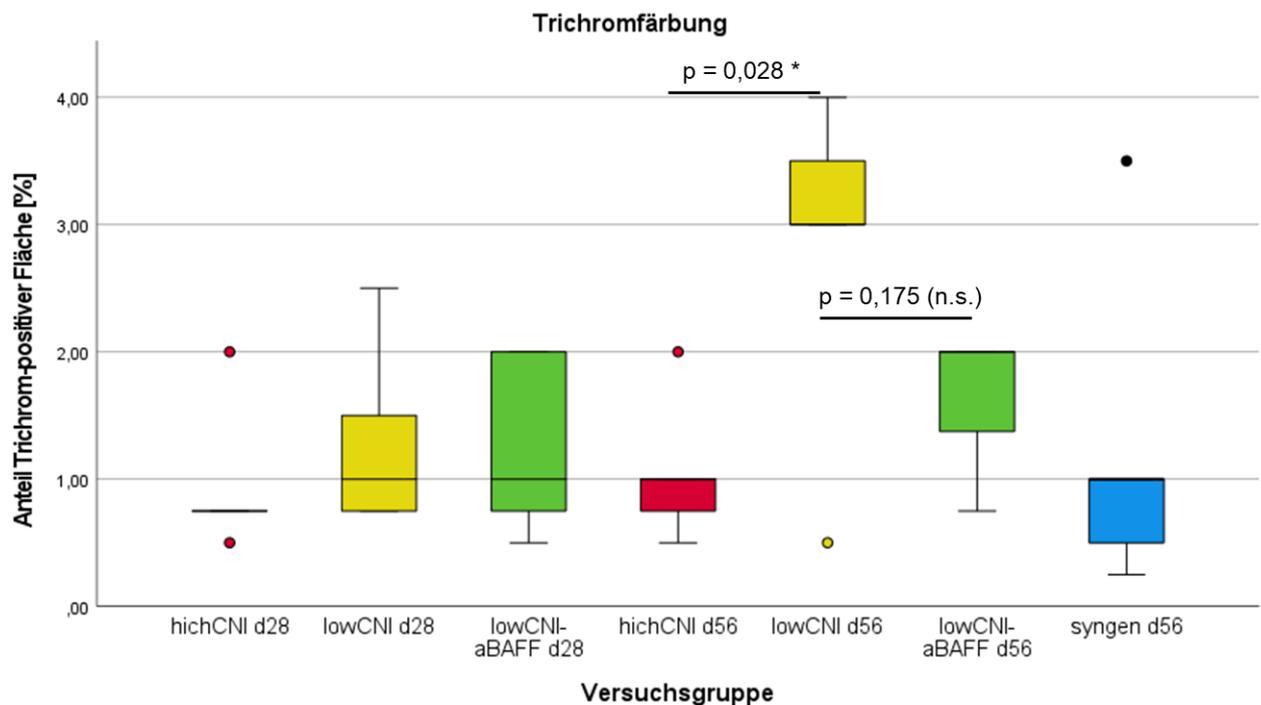


Abbildung 13: Boxplot des Anteils Trichrom-positiver Fläche in Bezug auf die Versuchsgruppen

### 3.3.2. Alpha-SMA

Diese Befunde wurden durch die alpha-SMA-Färbung bestätigt.

Entsprechend den Ergebnissen der Trichromfärbung unterschieden sich die Werte am Tag 28 nicht.

An Tag 56 wiesen sowohl *highCNI* (2,2%) als auch *lowCNI+aBAFF*-behandelte Tiere (3,07%) statistisch signifikant weniger alpha-SMA-positive Fläche als *lowCNI*-behandelte Tiere (5,8%,  $p=0,004$  bzw.  $p=0,004$ ) auf.

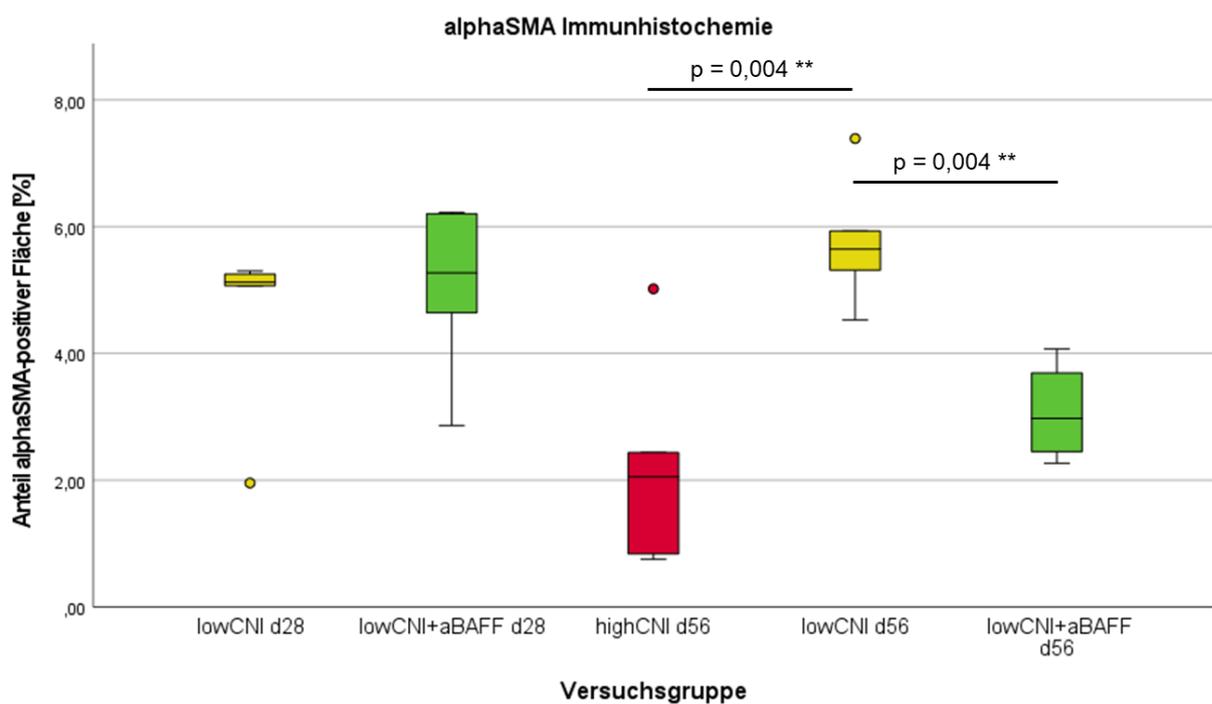


Abbildung 14: Boxplot der alphaSMA-positiven Fläche in Bezug auf die Versuchsgruppen. An Tag 28 wurden für *highCNI*-behandelte Tiere keine Schnitte für alpha-SMA gefärbt.

### 3.4. DKK3-Expression

#### 3.4.1. Immunhistochemie

Auch für die DKK3-Expression wurde Immunhistochemie durchgeführt, um einen möglichen profibrotischen Faktor zu analysieren. Hierfür wurde die DKK3-positive Fläche der Schnitte sowohl manuell als auch korrelierend automatisiert (HistoQuest, TissueGnostics) bestimmt.

Sowohl an Tag 28 als auch an Tag 56 hatten mit *lowCNI+aBAFF* behandelte Ratten die im Mittel niedrigste DKK3-positive Fläche (0,77% bzw. 0,85%) mit geringer Varianz.

An Tag 28 wies die Gruppe *lowCNI* (mittlerer Flächenanteil 0,96%) gegenüber *lowCNI+aBAFF* (mittlerer Flächenanteil 0,77%) ein etwas höheres DKK3-Expressionsniveau auf, während bei *highCNI* (1,67%) behandelten Ratten die höchste DKK3-Expression vorlag, die die statistische Signifikanz gegenüber *lowCNI+aBAFF* ( $p=0,055$ ) nur knapp verfehlte. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zu *lowCNI*-behandelten Transplantaten zeigten.

An Tag 56 blieb nur ein Trend zu niedrigeren DKK3-positiven Flächen in der *lowCNI+aBAFF*-Gruppe (0,85%) im Vergleich zu *lowCNI* (1,12%) und *highCNI* (0,91%) sowie syngenen Transplantaten (1,12%) insgesamt ohne statistische Signifikanz.

Auffällig erscheint hierbei die sehr niedrige Varianz der Werte in der aBAFF-behandelten Gruppe.

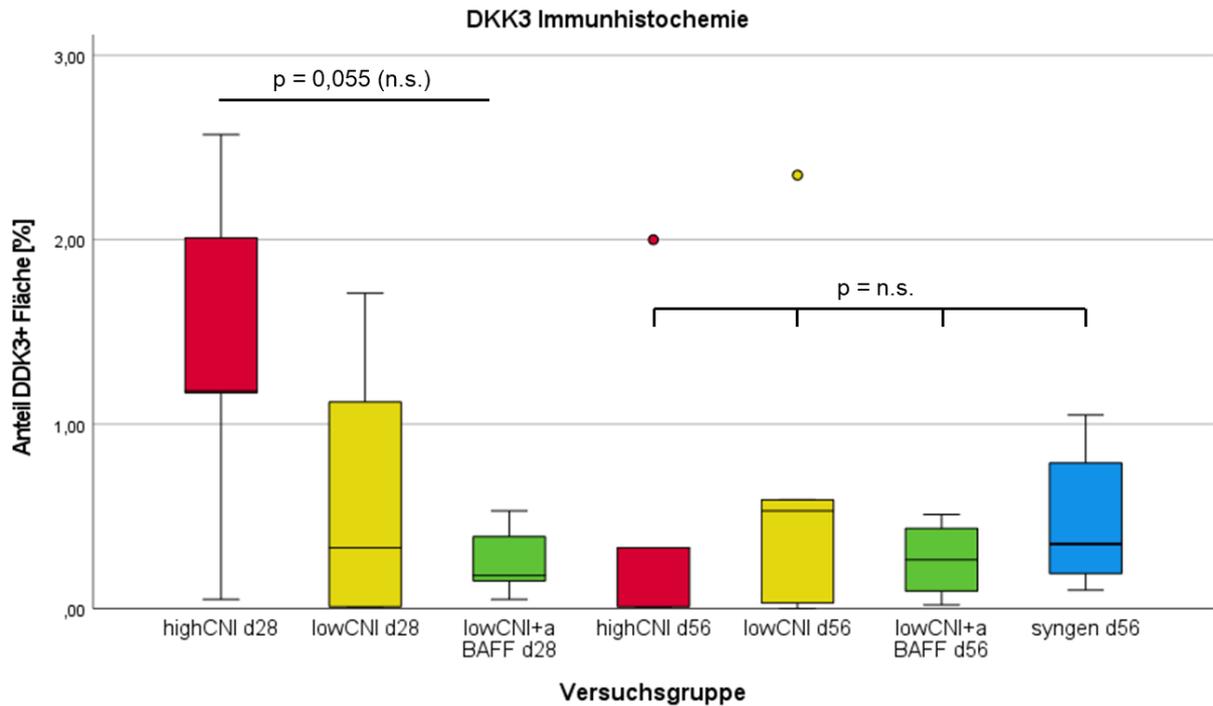


Abbildung 15: Boxplot der automatisiert bestimmten DKK3 positiven Fläche in Bezug auf die Versuchsgruppe. Hier zeichnet sich ein klarer Trend zu niedrigeren Werten in aBAFF-behandelten Tieren an Tag 28 ab.

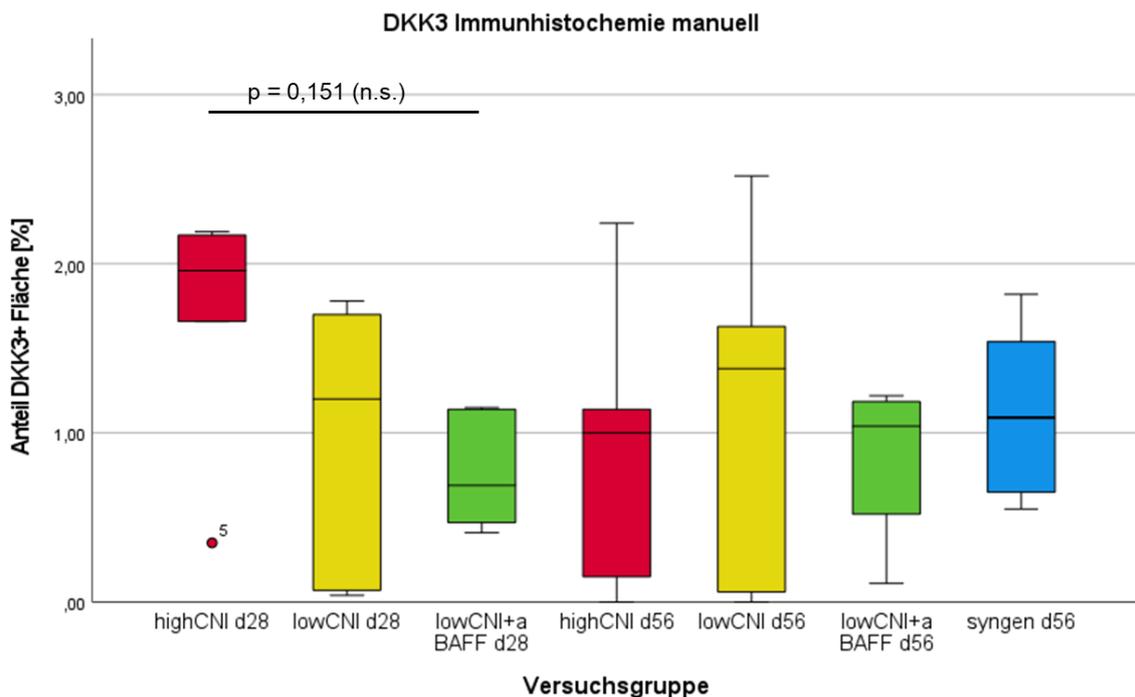


Abbildung 16: Boxplot des manuell bestimmten DKK positiven Flächenanteils in der Immunhistochemie. Bei etwas höheren Werten für die Gruppen an Tag 56 verbleibt der Trend zu niedrigeren Werten in der lowCNI+antiBAFF-Gruppe an Tag 28.

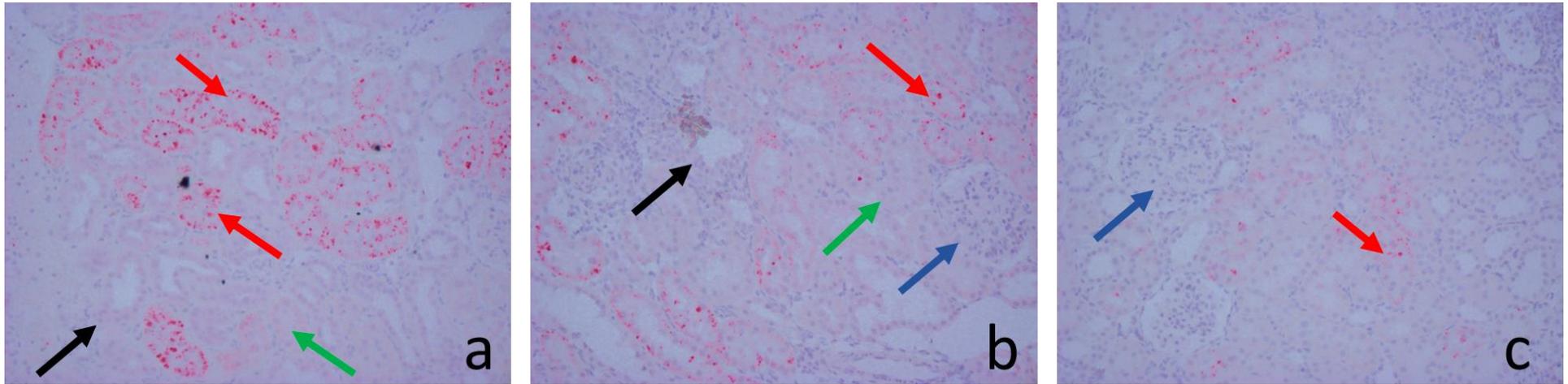


Abbildung 17: Exemplarische Auswahl immunhistochemischer Färbungen von DKK3 in Schnitten explantierter Transplantatnieren der entsprechenden Versuchsgruppen an Tag 28. Links (Bildabschnitt a): *highCNI* d28. Mittig (Bildabschnitt b): *lowCNI* d28. Rechts (Bildabschnitt c) *lowCNI+aBAFF* d28.

Durch grüne Pfeile markiert: erhaltene proximale Tubuli. Durch schwarze Pfeile markiert: Tubuli mit Zeichen akuter Schädigung (abgeflachtes Tubulusepithel, erweiterte Lichtungen). Durch blaue Pfeile markiert: Glomeruli. Durch rote Pfeile markiert: Tubuli mit hellrot angefarbter DKK3-Expression.

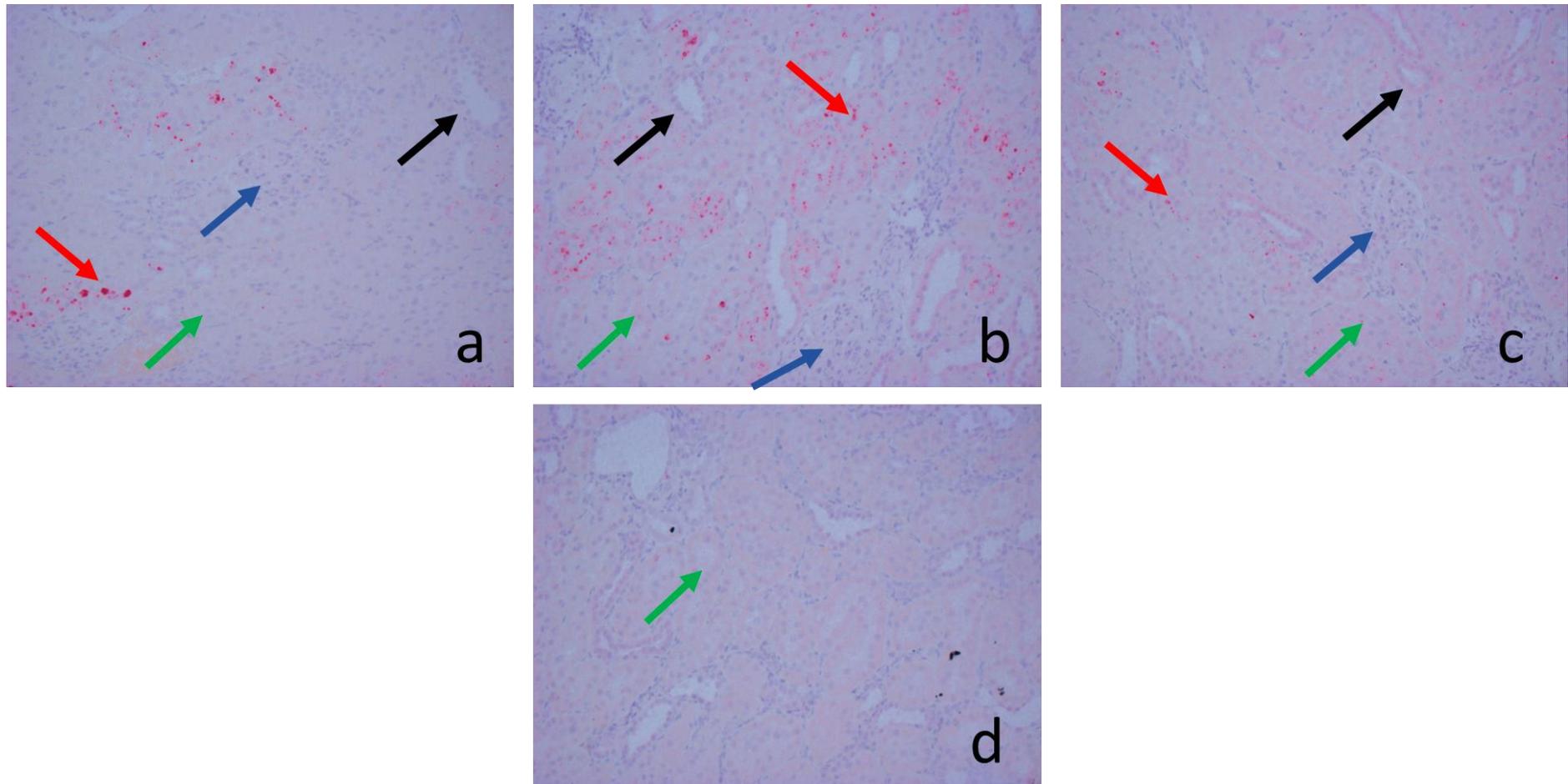


Abbildung 18: Exemplarische Auswahl immunhistochemischer Färbungen von DKK3 in Schnitten explantierter Transplantatnieren der entsprechenden Versuchsgruppen an Tag 56. Oben links (Bildabschnitt a): *highCNI* d56. Oben mittig (Bildabschnitt b): *lowCNI* d56. Oben rechts (Bildabschnitt c) *lowCNI+aBAFF* d56. Unten mittig (Bildabschnitt d) *syngen* d56.

Durch grüne Pfeile markiert: erhaltene proximale Tubuli. Durch schwarze Pfeile markiert: Tubuli mit Zeichen akuter Schädigung (abgeflachtes Tubulusepithel, erweiterte Lichtungen). Durch blaue Pfeile markiert: Glomeruli. Durch rote Pfeile markiert: Tubuli mit hellrot angefärbter DKK3-Expression.

### 3.4.2. Real-Time Polymerase Chain Reaction (rtPCR)

Um dies weiter zu untermauern, führten wir eine rtPCR für DKK3-mRNA durch, die auf Werte eines Hauskeepergens (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase, HPRT1) normiert war.

Auch hier zeigten *lowCNI+aBAFF*-behandelte Tiere durchweg niedrige Werte an Tag 28 (0,00074) und Tag 56 (Mittelwert 0,00068), die nur bei syngenen Transplantaten (Mittelwert 0,0002) niedriger waren.

Der Trend zu (in einzelnen Versuchstieren bis zu 10fach) höheren mRNA-Konzentrationen bei *highCNI* (Mittelwert 0,002) und *lowCNI* (Mittelwert 0,009) erreichte bei Vergleich mit *lowCNI+aBAFF* keine statistische Signifikanz ( $p=0,286$ ).

Wie auch in der DKK3-Immunfluoreszenzanalyse zeigten die Werte der Versuchstiere aus der *lowCNI+aBAFF*-Gruppe eine sehr niedrige Varianz.

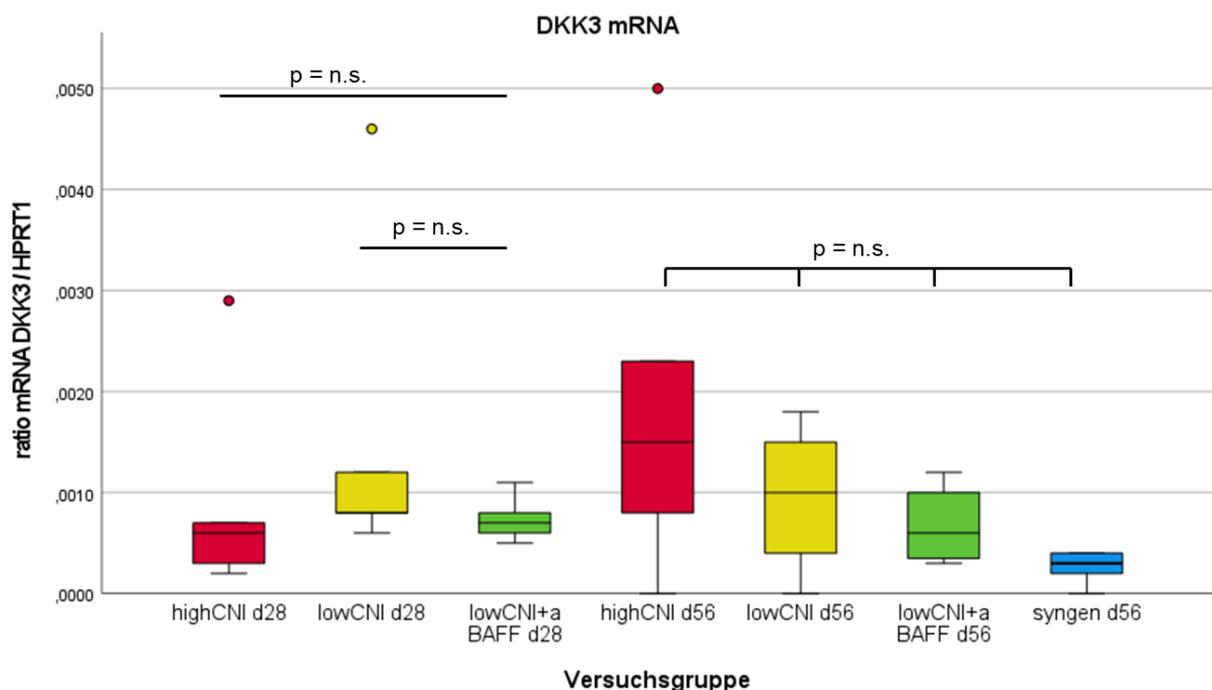


Abbildung 19: Boxplot der auf die mRNA des Housekeeping-Gens HPRT1 normierte mRNA-Konzentration von DKK3 in der rtPCR. Parallel zur Immunhistochemie zeigt sich hier in den antiBAFF-behandelten Gruppen der Trend zu niedrigeren Werten ohne statistische Signifikanz.

## 4. Diskussion

In unserem Rattenmodell der Nierentransplantation zu versuchten wir, sowohl den Effekt verringerter und diskontinuierlicher CNI-Dosen als auch den zusätzlichen Einfluss einer pharmakologischen B-Zell-Intervention auf Zellmigration, Fibrose und DKK3-Expression zu verbildlichen.

Für dieses Modell konnte in der Vergangenheit bereits eine Zunahme der *de-novo*-Bildung von HLA-Antikörpern in der Gruppe der Nonadhärenz (diskontinuierliche Einnahme, *lowCNI*) nachgewiesen werden. Pathomechanistisch zeigten sich hier deutlich erhöhte Zytokinspiegel, insbesondere für CCL19, CCL20, CCL21 und BAFF. Hier konnten sowohl erhöhte B-Zell-Infiltration als auch intrarenale IgG-Produktion gezeigt werden. (118) Dies steht im Einklang mit Erkenntnissen, dass B-Zellen in Anwesenheit hoher BAFF-Spiegel stärkeren chemotaktischen Einflüssen durch CCL21 und CCL13 unterliegen (119). Angesichts der Tatsache, dass im Setting humaner Nierenbiopsien eine Assoziation von vermehrter B-Zell-Infiltration in subklinischer Rejektion mit schlechterer Transplantatfunktion und vermehrter IFTA gezeigt werden konnte (120), schien eine anti-BAFF-Therapie konzeptionell interessant.

In der hier vorliegenden Arbeit war die Infiltration von Entzündungszellen, insbesondere auch die Einwanderung von T-Zellen und Makrophagen, ein Schlüsselereignis in der komplexen Kaskade von Mechanismen, die zur Nierenfibrose führen (121, 84), erwartungsgemäß in denjenigen Gruppen am geringsten, die syngene transplantiert wurden und denjenigen, die die höchsten Dosen Cyclosporin A erhielten.

Bei den Ratten, die niedrige CyA-Dosen (*lowCNI* und *lowCNI+aBAFF*) erhielten, zeigte sich eine stärkere T-Zell- und makrophagenabhängige tubulointerstitielle Entzündungsaktivität zum ersten Untersuchungszeitpunkt am Tag 28 nach Transplantation. Dieser Effekt konnte bis zum zweiten Untersuchungszeitpunkt an Tag 56 nach Transplantation durch die zusätzliche Verabreichung des anti-BAFF-Antikörpers als Ausdruck einer verzögerten, aber schließlich doch effektiven Migrationshemmung, vollständig ausgeglichen werden. Die B-Zell-Migration wurde

bereits zum ersten Untersuchungszeitpunkt und durchweg in der Gruppe mit *lowCNI+aBAFF*-Behandlung effektiv unterdrückt.

Auch in anderem Kontext von Nierenerkrankung außerhalb der Transplantation spielt BAFF eine Rolle: Bei Lupusnephritis (LN) zeigte eine Studie an menschlichen Nierenbiopsien eine deutlich erhöhte tubulointerstitielle Expression von BAFF in CD20+-Entzündungsinfiltraten (122), während in einer Studie über LN bei Mäusen die Verringerung von BAFF auch die glomeruläre Infiltration von T-Zellen sowie die Bildung tertiärer lymphoider Strukturen (123) abschwächte, ohne die Gesamtzahl der infiltrierenden hämatopoetischen Zellen zu verringern.

Analog dazu wurden in unserem Modell sowohl die B-Zell- als auch die T-Zell-Infiltration durch eine anti-BAFF-Strategie zusätzlich zur niedrig dosierten CNI-Immunsuppression abgeschwächt.

Die erste Hypothese, dass anti-BAFF-Behandlung die zellulären Migrationsmuster beeinflusst, konnten wir somit bestätigen. Dies traf auf alle untersuchten Zelllinien (Makrophagen, T-Zellen und B-Zellen) zu. Auch die referenzpathologische Untersuchung der Abstoßungsschwere nach BANFF 2017 bestätigte diese Ergebnisse.

Die aus der Infiltration durch Immunzellen resultierende Fibrose, die mittels Trichrom-Färbung und alpha-SMA-Assays untersucht wurde, war an Tag 56 in der Gruppe mit *lowCNI+aBAFF*-Therapie signifikant geringer als in der mit *lowCNI*-Therapie allein, so dass auch unsere zweite Hypothese einer verminderten Intragraftfibrose bestätigt werden konnte, auch wenn in der *highCNI*-Gruppe Trends zu noch geringerer Fibrose bestehen.

Ob diese Trends langfristig statistische Signifikanz zwischen *highCNI* und *lowCNI+aBAFF* erreichen würden, kann anhand der vorliegenden Daten nicht beurteilt werden.

Es existieren folgende Daten, die auf eine direkte Beteiligung von BAFF an fibrotischen Prozessen hinweisen: Durch BAFF-Knockout konnte die Fibrose in einem Mausmodell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose abgeschwächt werden (124). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass mit Fibrose assoziierte Signalwege, insbesondere der TGF- $\beta$ -Signalweg und Teile von Integrin-Signalwegen wie Syndecan-1, von dem auch bekannt ist, dass es, wie DKK3 auch, den profibrotischen wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg aktiviert (125), durch die Verabreichung von Belimumab in einer Doppelblindstudie an menschlichen Patienten mit systemischer Sklerose unterdrückt werden konnten. (126)

Auch für die epithelial-mesenchymale Transition in Tubuluszellen und nachfolgende Ausbildung renaler Fibrose konnte für Syndecan-1 eine tragende Bedeutung gezeigt werden (127).

Nachdem auch DKK-3 ein Aktivator des wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges ist (107, 108) könnten diese Daten auf einen möglichen Zusammenhang bzw. synergistische Effekte zwischen der DKK3-assoziierten profibrotischen Signalübertragung und BAFF/BAFF-R hindeuten. Ob diese Zusammenhänge wie Regulation von Syndecan-1 und dessen Unterdrückung durch BAFF-Intervention für die Nierenfibrose eine Rolle spielen, könnte in zukünftigen Arbeiten untersucht werden.

Die DKK3-Expressionsstärken unterschieden sich nicht statistisch signifikant zwischen den Versuchssarmen, wobei die Tendenz zu niedrigerer DKK3-Expression mit geringer Varianz in den *lowCNI+aBAFF*-behandelten Tieren zu beiden Analysezeitpunkten auffällig ist und im Vergleich mit *highCNI* an Tag 28 in der Immunhistochemie und an Tag 56 in der rtPCR die statistische Signifikanz nur knapp verfehlt.

Die Trends zu niedrigen DDK3-Werten mit geringer Varianz in den *lowCNI+aBAFF*-behandelten Tieren zu beiden Analysezeitpunkten zeigen auffällige Parallelen zu den Werten der B-Zell-Infiltration. Es ist bekannt, dass DKK3 modulatorische Eigenschaften auf periphere B-Zellen besitzt. Ludwig et al. konnten im Mausmodell zeigen, dass in DKK3-defizienten Mäusen die Ausreifung von B2-Zellen beeinträchtigt war, wohingegen die Proliferation und das Überleben von B1-Zellen gestärkt wurden.

Auch wurde durch DKK3-Knockout im SLE-Mausmodell Autoimmunität verstärkt (128). So kann vermutet werden, dass neben der BAFF-Intervention möglicherweise auch die tendenziell niedrigeren DKK3-Spiegel zur niedrigen B-Zell-Infiltration beitragen, wobei keine Charakterisierung der infiltrierenden B-Zellen in Subgruppen in den einzelnen Versuchsarmen durchgeführt wurde. Ob erhöhte BAFF-Spiegel bzw. B-Zell-Aktivität umgekehrt direkten Einfluss auf DKK3-Expression haben, ist nicht bekannt, so dass hier über einen direkt-mechanistischen Einfluss der BAFF-Intervention auf die DKK3-Expression nur spekuliert werden kann.

In einem MHC-inkompatiblen Rattenmodell der Nierentransplantation von Nankivell et al. zeigte sich, dass niedrigere Dosen von Cyclosporin A, die Lymphozyteninfiltration und die Expression von Chemokinen wie BAFF und BAFF-Rezeptor erhöhen. (36) Der Verzicht auf CNI oder die Kombination von niedrigdosierten CNI mit mTOR-Inhibitoren konnte in einer großen Metaanalyse transplantierten Menschen von Karpe et al. mit vermehrten Episoden von Transplantatabstoßung in Zusammenhang gebracht werden (129).

In einer experimentellen Arbeit von Labes et al. an Mäusen zur Verbidlichung CyA-induzierter Nierenschädigung konnte bei Verabreichung von 80mg/kg Cyclosporin A für vier respektive acht Wochen signifikant höhere DKK-3-Konzentrationen im Blut der Versuchstiere im Vergleich zu Placebo gezeigt werden (130). Auch in diesem Modell der CNI-Toxizität nahmen die Marker akuter Tubulusschädigung (NGAL, KIM-1, DKK3) von vier zu acht Wochen, passend zu unseren immunhistochemischen Ergebnissen, tendenziell ab.

So könnten die latent höheren Signale für DKK3 in Immunhistochemie und rtPCR in den *highCNI*-behandelten Tieren an Tag 28 (ICH) und Tag 56 (rtPCR) bei geringerer zellulär-alloinflammatorischer Aktivität als Ausdruck einer latenten CNI-Toxizität gedeutet werden, auch wenn konkrete histologische Hinweise hierauf mangels gezielter Untersuchung nicht nachgewiesen wurden und die CyA-Dosen bei Labes et al. ungleich höher waren. In der genannten Arbeit zeigte sich bereits nach 4 Wochen exemplarisch gezeigte, nicht quantifizierte IFTA. Das Fehlen relevanter Fibrose in unseren *highCNI*-Gruppen könnte ein Dosiseffekt sein, nachdem zumindest die vasokonstriktiven Eigenschaften von CyA dosisabhängig sind. (131)

Konträr zu den human-klinischen Daten von Zewinger et al., in denen ein erhöhtes DKK3/Kreatinin-Verhältnis im Urin bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung verschiedener Ätiologie kurzfristigen GFR-Verlust anzeigte und gut mit höherer Fibrose korrelierte (109), kann diese unmittelbare Korrelation in unserer Arbeit nicht gezeigt werden. Möglicherweise liegen bei den Patienten in der Studie von Zewinger et al. andere Pathomechanismen zugrunde oder fibrotische Prozesse in der *highCNI*-Gruppe wegen des begrenzten Untersuchungszeitraums noch nicht sichtbar waren, nachdem akute (v.a. subklinische) CNI-Toxizität im Kontext humaner Patientendaten zu großen Teilen reversibel (132), aber in 2-Jahres Biopsien häufig ist (73).

Dementsprechend könnten die gefundenen Ergebnisse dieser Arbeit mit geringer Entzündungszellinfiltration und Remission klassischer Abstoßungsstigmata von 4 zu 8 Wochen Untersuchungszeitraum und subsequent geringerer Fibrose sowie geringer DKK-3-Expression, mutmaßlich durch Einsparung von CNI-Dosis, die Untersuchung einer ergänzenden anti-BAFF-Behandlung involvierenden immunsupprimierenden Strategie zur Einsparung von Calcineurininhibitoren rechtfertigen, auch wenn die Zahlen der Versuchstiere in der vorliegenden Arbeit klein sind. Ob die gefundenen Ergebnisse im Modell einer „*mono*“-Immunsuppression auf die Behandlungssituation nierentransplantierte Patienten mit drei immunsuppressiv wirksamen Substanzen ebenso Gültigkeit besitzen, kann zum aktuellen Zeitpunkt nur spekuliert werden; auch das könnte Gegenstand folgender Arbeiten sein.

Insgesamt scheint die weitere Erforschung einer aBAFF-basierten immunsuppressiven Behandlungsstrategie nach Nierentransplantation jedoch vielversprechend.

## Appendix

### CD 20

Tabelle A1: Explorative Datenanalyse und statistische Verteilung des Zelloberflächenmarkers CD20

	Immunsuppression	Abkürzung	Behandlungsdauer	Gruppengröße	normalverteilt	P (Shapiro-Wilk)
allogen	CyA (10mg/kg/d) daily	highCNI	28 days	n = 5	Y	1
			56 days	n = 5	Y	0,42
	CyA (5mg/kg/d) daily	medCNI	28 days	n = 5	Y	0,365
			56 days	n = 3	Y	0,291
	CyA (5mg/kg/d) on alternate days	lowCNI	28 days	n = 5	Y	0,212
			56 days	n = 5	Y	0,1
CyA (5mg/kg/d) on alternate days + anti-BAFF-antibody (10mg/kg i.p.) days 3,17,31,45	lowCNI+aBAFF	28 days	n = 5	N	0,024	
		56 days	n = 4	N	0,001	
syngen	syngeneic transplant with no immunosuppressive treatment	syngen	56 days	n = 5	Y	0,814

CD 3

	Immusuppression	Abkürzung	Behandlungsdauer	Gruppengröße	normalverteilt	p (Shapiro-Wilk)
allogen	CyA (10mg/kg/d) daily	highCNI	28 days	n = 5	Y	0,794
			56 days	n = 5	Y	0,540
	CyA (5mg/kg/d) daily	medCNI	28 days	n = 5	Y	0,47
			56 days	n = 3	Y	0,24
	CyA (5mg/kg/d) on alternate days	lowCNI	28 days	n = 5	Y	0,165
			56 days	n = 5	Y	0,428
CyA (5mg/kg/d) on alternate days + anti-BAFF-antibody (10mg/kg i.p.) days 3,17,31,45	lowCNI+aBAFF	28 days	n = 5	Y	0,401	
		56 days	n = 4	Y	0,712	
syngen	syngeneic transplant with no immunosuppressive treatment	syngen	56 days	n = 5	Y	0,052

Tabelle A2: Explorative Datenanalyse und statistische Verteilung des Zelloberflächenmarkers CD3

# CD4

	Immusuppression	Abkürzung	Behandlungsdauer	Gruppengröße	normalverteilt	P (Shapiro-Wilk)
allogen	CyA (10mg/kg/d) daily	highCNI	28 days	n = 5	Y	0,964
			56 days	n = 5	Y	0,648
	CyA (5mg/kg/d) daily	medCNI	28 days	n = 5	N	0,014
			56 days	n = 3	Y	0,794
	CyA (5mg/kg/d) on alternate days	lowCNI	28 days	n = 5	Y	0,165
			56 days	n = 5	Y	0,428
	CyA (5mg/kg/d) on alternate days + anti-BAFF-antibody (10mg/kg i.p.) days 3,17,31,45	lowCNI+aBAFF	28 days	n = 5	Y	0,94
			56 days	n = 4	Y	0,803
syngen	syngeneic transplant with no immunosuppressive treatment	syngen	56 days	n = 5	N	0,002

Tabelle A3: Explorative Datenanalyse und statistische Verteilung des Zelloberflächenmarkers CD4

# CD8

	Immunsuppression	Abkürzung	Behandlungsdauer	Gruppengröße	normalverteilt	P (Shapiro-Wilk)	
allogen	CyA (10mg/kg/d) daily	highCNI	28 days	n = 5	Y	0,456	
			56 days	n = 5	Y	0,155	
	CyA (5mg/kg/d) daily	medCNI	28 days	n = 5	Y	0,059	
			56 days	n = 3	Y	0,363	
	CyA (5mg/kg/d) on alternate days	lowCNI	28 days	n = 5	Y	0,397	
			56 days	n = 5	Y	0,197	
	CyA (5mg/kg/d) on alternate days + anti-BAFF-antibody (10mg/kg i.p.) days 3,17,31,45	lowCNI+aBAFF	28 days	n = 5	Y	0,507	
			56 days	n = 4	Y	0,783	
	syngen	syngeneic transplant with no immunosuppressive treatment	syngen	56 days	n = 5	Y	0,057

Tabelle A4: Explorative Datenanalyse und statistische Verteilung des Zelloberflächenmarkers CD8; y=yes/ja N=no/nein

## DKK3 IF (HistoQuest)

	Immusuppression	Abkürzung	Behandlungsdauer	Gruppengröße	normalverteilt	P (Shapiro-Wilk)
allogen	CyA (10mg/kg/d) daily	highCNI	28 days	n = 5	Y	0,822
			56 days	n = 5	N	0,011
	CyA (5mg/kg/d) daily	medCNI	28 days	n = 5	N	0,009
			56 days	n = 3	Y	0,06
	CyA (5mg/kg/d) on alternate days	lowCNI	28 days	n = 5	Y	0,238
			56 days	n = 5	Y	0,053
CyA (5mg/kg/d) on alternate days + anti-BAFF-antibody (10mg/kg i.p.) days 3,17,31,45	lowCNI+aBAFF	28 days	n = 5	Y	0,613	
		56 days	n = 4	Y	0,913	
syngen	syngeneic transplant with no immunosuppressive treatment	syngen	56 days	n = 5	Y	0,443

Tabelle A5: Explorative Datenanalyse und statistische Verteilung des automatisiert gemessenen Flächenanteils von DKK3 in der Immunfluoreszenz; Y: yes/ja  
N:no/nein

## DKK3 IF manuell

	Immupression	Abkürzung	Behandlungsdauer	Gruppengröße	normalverteilt	P (Shapiro-Wilk)
Allogen	CyA (10mg/kg/d) daily	highCNI	28 days	n = 5	N	0,047
			56 days	n = 5	Y	0,565
	CyA (5mg/kg/d) daily	medCNI	28 days	n = 5	Y	0,565
			56 days	n = 3	Y	0,345
	CyA (5mg/kg/d) on alternate days	lowCNI	28 days	n = 5	Y	0,125
			56 days	n = 5	Y	0,433
	CyA (5mg/kg/d) on alternate days + anti-BAFF-antibody (10mg/kg i.p.) days 3,17,31,45	lowCNI+aBAFF	28 days	n = 5	Y	0,170
			56 days	n = 4	Y	0,140
Syngen	syngeneic transplant with no immunosuppressive treatment	syngen	56 days	n = 5	Y	0,561

Tabelle A6: Explorative Datenanalyse und statistische Verteilung des manuell bestimmten Flächenanteils von DKK3 in der Immunfluoreszenz; Y: yes/ja  
N:no/nein

## DKK3 mRNA

	Immusuppression	Abkürzung	Behandlungsdauer	Gruppengröße	normalverteilt	P (Shapiro-Wilk)
allogen	CyA (10mg/kg/d) daily	highCNI	28 days	n = 5	N	0,015
			56 days	n = 5	Y	0,536
	CyA (5mg/kg/d) daily	medCNI	28 days	n = 5	Y	0,859
			56 days	n = 0		
	CyA (5mg/kg/d) on alternate days	lowCNI	28 days	n = 5	N	0,004
			56 days	n = 5	Y	0,79
CyA (5mg/kg/d) on alternate days + anti-BAFF-antibody (10mg/kg i.p.) days 3,17,31,45	lowCNI+aBAFF	28 days	n = 5	Y	0,685	
		56 days	n = 4	Y	0,568	
syngen	syngeneic transplant with no immunosuppressive treatment	syngen	56 days	n = 5	Y	0,314

Tabelle A7: Explorative Datenanalyse und statistische Verteilung der gemessenen Konzentration der DKK3-mRNA normiert für das Housekeepergen HPRT1 in der rtPCR; Y: yes/ja N:no/nein

## Trichrom MM

	Immusuppression	Abkürzung	Behandlungsdauer	Gruppengröße	normalverteilt	P (Shapiro-Wilk)
allogen	CyA (10mg/kg/d) daily	highCNI	28 days	n = 5	N	0,009
			56 days	n = 5	Y	0,228
	CyA (5mg/kg/d) daily	medCNI	28 days	n = 5	Y	0,747
			56 days	n = 3	N	<0,001
	CyA (5mg/kg/d) on alternate days	lowCNI	28 days	n = 5	Y	0,141
			56 days	n = 5	Y	0,117
CyA (5mg/kg/d) on alternate days + anti-BAFF-antibody (10mg/kg i.p.) days 3,17,31,45	lowCNI+aBAFF	28 days	n = 5	Y	0,174	
		56 days	n = 4	N	0,001	
syngen	syngeneic transplant with no immunosuppressive treatment	syngen	56 days	n = 5	N	0,046

Tabelle A8: Explorative Datenanalyse und statistische Verteilung des automatisiert gemessenen Trichrom-positiven Flächenanteils in der konventionellen Histologie; Y: yes/ja N:no/nein

# Trichrom manuell

	Immusuppression	Abkürzung	Behandlungsdauer	Gruppengröße	normalverteilt	P (Shapiro-Wilk)
allogen	CyA (10mg/kg/d) daily	highCNI	28 days	n = 5	Y	0,952
			56 days	n = 5	Y	0,615
	CyA (5mg/kg/d) daily	medCNI	28 days	n = 5	Y	0,406
			56 days	n = 3	Y	0,08
	CyA (5mg/kg/d) on alternate days	lowCNI	28 days	n = 5	Y	0,578
			56 days	n = 5	Y	0,707
	CyA (5mg/kg/d) on alternate days + anti-BAFF-antibody (10mg/kg i.p.) days 3,17,31,45	lowCNI+aBAFF	28 days	n = 5	Y	0,137
			56 days	n = 4	Y	0,672
syngen	syngeneic transplant with no immunosuppressive treatment	syngen	56 days	n = 5	Y	0,836

Tabelle A9: Explorative Datenanalyse und statistische Verteilung des manuell bestimmten Trichrom-positiven Flächenanteils in der konventionellen Histologie; Y: yes/ja N:no/nein

# alphaSMA

	Immusuppression	Abkürzung	Behandlungsdauer	Gruppengröße	normalverteilt	P (Shapiro-Wilk)
allogen	CyA (10mg/kg/d) daily	highCNI	28 days	n = 0		
			56 days	n = 5	Y	0,253
	CyA (5mg/kg/d) daily	medCNI	28 days	n = 0		
			56 days	n = 0		
	CyA (5mg/kg/d) on alternate days	lowCNI	28 days	n = 5	N	<0,001
			56 days	n = 5	Y	0,756
CyA (5mg/kg/d) on alternate days + anti-BAFF-antibody (10mg/kg i.p.) days 3,17,31,45	lowCNI+aBAFF	28 days	n = 5	Y	0,33	
		56 days	n = 4	Y	0,813	
syngen	syngeneic transplant with no immunosuppressive treatment	syngen	56 days	n = 0		

Tabelle A10: Explorative Datenanalyse und statistische Verteilung des manuell bestimmten alpha-SMA-positiven Flächenanteils in der konventionellen Histologie; Y: yes/ja N:no/nein

## Literature Cited

1. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2020; 395(10225):709–33.
2. Levey AS, Eckardt K-U, Dorman NM, Christiansen SL, Hoorn EJ, Ingelfinger JR et al. Nomenclature for kidney function and disease: report of a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Consensus Conference. *Kidney Int* 2020; 97(6):1117–29.
3. Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, Hirst JA, O'Callaghan CA, Lasserson DS et al. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 2016; 11(7):e0158765.
4. Icks A, Haastert B, Gandjour A, Chernyak N, Rathmann W, Giani G et al. Costs of dialysis--a regional population-based analysis. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25(5):1647–52.
5. Kleophas W, Reichel H. International study of health care organization and financing: development of renal replacement therapy in Germany. *Int J Health Care Finance Econ* 2007; 7(2-3):185–200.
6. Vanholder R, Davenport A, Hannedouche T, Kooman J, Kribben A, Lameire N et al. Reimbursement of dialysis: a comparison of seven countries. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23(8):1291–8.
7. Murdeshwar HN, Anjum F. *StatPearls: Hemodialysis*. Treasure Island (FL); 2024.
8. Sinclair A, Cimon K, Loncar M, et al. *Dialysis Modalities for the Treatment of End-Stage Kidney Disease: A Health Technology Assessment: CADTH Optimal Use Report, No. 6.2b.; 2017 [cited 2024 Apr 1]. Available from: URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531991/pdf/Bookshelf\\_NBK531991.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531991/pdf/Bookshelf_NBK531991.pdf).*
9. Tonelli M, Wiebe N, Knoll G, Bello A, Browne S, Jadhav D et al. Systematic review: kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes. *Am J Transplant* 2011; 11(10):2093–109.
10. Yoo KD, Kim CT, Kim M-H, Noh J, Kim G, Kim H et al. Superior outcomes of kidney transplantation compared with dialysis: An optimal matched analysis of a national population-based cohort study between 2005 and 2008 in Korea. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95(33):e4352.
11. Strohmaier S, Wallisch C, Kammer M, Geroldinger A, Heinze G, Oberbauer R et al. Survival Benefit of First Single-Organ Deceased Donor Kidney Transplantation Compared With Long-term Dialysis Across Ages in Transplant-Eligible Patients With Kidney Failure. *JAMA Netw Open* 2022; 5(10):e2234971.
12. Boenink R, Astley ME, Huijben JA, Stel VS, Kerschbaum J, Ots-Rosenberg M et al. The ERA Registry Annual Report 2019: summary and age comparisons. *Clin Kidney J* 2022; 15(3):452–72.
13. Iqbal MM, Rahman N, Alam M, Deb Nath PK, Waheed S, Islam K et al. Quality of Life Is Improved in Renal Transplant Recipients Versus That Shown in Patients With Chronic Kidney Disease With or Without Dialysis. *Exp Clin Transplant* 2020; 18(Suppl 1):64–7.
14. Jofre R, López-Gómez JM, Valderrábano F. Quality of life for patient groups. *Kidney Int* 2000; 57:S121-S130.
15. Poggio ED, Augustine JJ, Arrigain S, Brennan DC, Schold JD. Long-term kidney transplant graft survival-Making progress when most needed. *Am J Transplant* 2021; 21(8):2824–32.
16. Redondo-Pachón D, Calatayud E, Buxeda A, Pérez-Sáez MJ, Arias-Cabrales C, Gimeno J et al. Evolución de las causas de pérdida del injerto en trasplante renal durante 40 años (1979-2019). *Nefrología* 2023; 43(3):316–27.

17. Burton H, Iyamu Perisanidou L, Steenkamp R, Evans R, Mumford L, Evans KM et al. Causes of renal allograft failure in the UK: trends in UK Renal Registry and National Health Service Blood and Transplant data from 2000 to 2013. *Nephrol Dial Transplant* 2019; 34(2):355–64.
18. Betjes MGH, Roelen DL, van Agteren M, Kal-van Gestel J. Causes of Kidney Graft Failure in a Cohort of Recipients With a Very Long-Time Follow-Up After Transplantation. *Front Med (Lausanne)* 2022; 9:842419.
19. Lewis A, Koukoura A, Tsianos G-I, Gargavanis AA, Nielsen AA, Vassiliadis E. Organ donation in the US and Europe: The supply vs demand imbalance. *Transplant Rev (Orlando)* 2021; 35(2):100585.
20. Deutsche Stiftung Organtransplantation DSO. Jahresbericht Organspende und Transplantation in Deutschland 2022 [cited 2024 Apr 1]. Available from: URL: <https://dso.de/SiteCollectionDocuments/DSO-Jahresbericht%202022.pdf>.
21. Bundesministerium der Justiz. Gesetz über die Spende, Entnahme und Übertragung von Organen und Geweben (Transplantationsgesetz - TPG): § 12 Organvermittlung, Vermittlungsstelle [cited 2024 Apr 19]. Available from: URL: [https://www.gesetze-im-internet.de/tpg/\\_\\_\\_12.html](https://www.gesetze-im-internet.de/tpg/___12.html).
22. Eurotransplant. Eurotransplant Manual; 2024 [cited 2024 Apr 1]. Available from: URL: <https://www.eurotransplant.org/allocation/eurotransplant-manual/>.
23. Eurotransplant. The journey of a donated organ: From one human to another [Infographic]; 2024 [cited 2024 Jul 4]. Available from: URL: <https://www.eurotransplant.org/wp-content/uploads/2024/06/The-journey-of-a-donated-organ-DEF.pdf>.
24. Barker CF, Markmann JF. Historical overview of transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013; 3(4):a014977.
25. Baranski A. *Kidney Transplantation*. Cham: Springer International Publishing; 2023.
26. Low G, Crockett AM, Leung K, Walji AH, Patel VH, Shapiro AMJ et al. Imaging of vascular complications and their consequences following transplantation in the abdomen. *Radiographics* 2013; 33(3):633–52.
27. Alberts VP, Idu MM, Legemate DA, Laguna Pes MP, Minnee RC. Ureterovesical anastomotic techniques for kidney transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Transpl Int* 2014; 27(6):593–605.
28. Bustangi N, Kallas Chemaly A, Scalabre A, Khelif K, Luyckx S, Steyaert H et al. Extravesical Ureteral Reimplantation Following Lich-Gregoir Technique for the Correction of Vesico-Ureteral Reflux Retrospective Comparative Study Open vs. Laparoscopy. *Front Pediatr* 2018; 6:388.
29. Hornick P, Rose M, editors. *Transplantation immunology: Methods and protocols*. Totowa, N.J.: Humana Press; 2006. (Methods In Molecular Biology; vol 333).
30. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2002. *Tissue Antigens* 2002; 60(5):407–64.
31. Takemoto S, Terasaki PI, Cecka JM, Cho YW, Gjertson DW. Survival of nationally shared, HLA-matched kidney transplants from cadaveric donors. The UNOS Scientific Renal Transplant Registry. *N Engl J Med* 1992; 327(12):834–9.
32. Opelz G, Wujciak T, Döhler B, Scherer S, Mytilineos J. HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study. *Rev Immunogenet* 1999; 1(3):334–42.

33. Opelz G, Döhler B, Middleton D, Süsal C. HLA Matching in Pediatric Kidney Transplantation: HLA Poorly Matched Living Donor Transplants Versus HLA Well-Matched Deceased Donor Transplants. *Transplantation* 2017; 101(11):2789–92.
34. Gramlick ME, Trevillian P, Palazzi KL, Heer MK. Time to Move on: HLA Matching Should Be Reconsidered in Modern Deceased Donor Kidney Allocation. *Transplant Direct* 2022; 8(3):e1295.
35. Dragun D, Müller DN, Bräsen JH, Fritsche L, Nieminen-Kelhä M, Dechend R et al. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med* 2005; 352(6):558–69.
36. Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. *N Engl J Med* 2010; 363(15):1451–62.
37. Colvin RB. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18(4):1046–56.
38. Novotný M, Kment M, Viklický O. Antibody-mediated rejection of renal allografts: diagnostic pitfalls and challenges. *Physiol Res* 2021; 70(Suppl4):S551-S565.
39. Larsen CP, Morris PJ, Austyn JM. Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. A novel pathway for initiation of rejection. *J Exp Med* 1990; 171(1):307–14.
40. Kreisel D, Krupnick AS, Balsara KR, Riha M, Gelman AE, Popma SH et al. Mouse vascular endothelium activates CD8+ T lymphocytes in a B7-dependent fashion. *J Immunol* 2002; 169(11):6154–61.
41. Baddoura FK, Nasr IW, Wrobel B, Li Q, Ruddle NH, Lakkis FG. Lymphoid neogenesis in murine cardiac allografts undergoing chronic rejection. *Am J Transplant* 2005; 5(3):510–6.
42. Thauat O, Field A-C, Dai J, Louedec L, Patey N, Bloch M-F et al. Lymphoid neogenesis in chronic rejection: evidence for a local humoral alloimmune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(41):14723–8.
43. Lee YH, Sato Y, Saito M, Fukuma S, Saito M, Yamamoto S et al. Advanced Tertiary Lymphoid Tissues in Protocol Biopsies are Associated with Progressive Graft Dysfunction in Kidney Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol* 2022; 33(1):186–200.
44. Koenig A, Thauat O. Lymphoid Neogenesis and Tertiary Lymphoid Organs in Transplanted Organs. *Front Immunol* 2016; 7:646.
45. Brown K, Sacks SH, Wong W. Tertiary lymphoid organs in renal allografts can be associated with donor-specific tolerance rather than rejection. *Eur J Immunol* 2011; 41(1):89–96.
46. Zarkhin V, Kambham N, Li L, Kwok S, Hsieh S-C, Salvatierra O et al. Characterization of intra-graft B cells during renal allograft rejection. *Kidney Int* 2008; 74(5):664–73.
47. Bagnasco SM, Tsai W, Rahman MH, Kraus ES, Barisoni L, Vega R et al. CD20-positive infiltrates in renal allograft biopsies with acute cellular rejection are not associated with worse graft survival. *Am J Transplant* 2007; 7(8):1968–73.
48. Hippen BE, DeMattos A, Cook WJ, Kew CE, Gaston RS. Association of CD20+ infiltrates with poorer clinical outcomes in acute cellular rejection of renal allografts. *Am J Transplant* 2005; 5(9):2248–52.
49. Tsai EW, Rianthavorn P, Gjertson DW, Wallace WD, Reed EF, Ettenger RB. CD20+ lymphocytes in renal allografts are associated with poor graft survival in pediatric patients. *Transplantation* 2006; 82(12):1769–73.
50. Hwang HS, Song JH, Hyoung BJ, Lee SY, Jeon YJ, Kang SH et al. Clinical impacts of CD38+ B cells on acute cellular rejection with CD20+ B cells in renal allograft. *Transplantation* 2010; 89(12):1489–95.

51. Loupy A, Haas M, Roufousse C, Naesens M, Adam B, Afrouzian M et al. The Banff 2019 Kidney Meeting Report (I): Updates on and clarification of criteria for T cell- and antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2020; 20(9):2318–31.
52. Katsuma A, Yamakawa T, Nakada Y, Yamamoto I, Yokoo T. Histopathological findings in transplanted kidneys. *Ren Replace Ther* 2017; 3(1).
53. Dörje C, Midtvedt K, Holdaas H, Naper C, Strøm EH, Øyen O et al. Early versus late acute antibody-mediated rejection in renal transplant recipients. *Transplantation* 2013; 96(1):79–84.
54. Lefaucheur C, Loupy A, Vernerey D, Duong-Van-Huyen J-P, Suberbielle C, Anglicheau D et al. Antibody-mediated vascular rejection of kidney allografts: a population-based study. *Lancet* 2013; 381(9863):313–9.
55. Sellarés J, Freitas DG de, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B 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.
56. Kasiske BL, Zeier MG, Chapman JR, Craig JC, Ekberg H, Garvey CA et al. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients: a summary. *Kidney Int* 2010; 77(4):299–311.
57. Chapman TM, Keating GM. Basiliximab: a review of its use as induction therapy in renal transplantation. *Drugs* 2003; 63(24):2803–35.
58. Cibrik DM, Kaplan B, Meier-Kriesche HU. Role of anti-interleukin-2 receptor antibodies in kidney transplantation. *BioDrugs* 2001; 15(10):655–66.
59. Mohty M. Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. *Leukemia* 2007; 21(7):1387–94.
60. Genestier L, Fournel S, Flacher M, Assossou O, Revillard JP, Bonnefoy-Berard N. Induction of Fas (Apo-1, CD95)-mediated apoptosis of activated lymphocytes by polyclonal antithymocyte globulins. *Blood* 1998; 91(7):2360–8.
61. Brennan DC, Daller JA, Lake KD, Cibrik D, Del Castillo D. Rabbit antithymocyte globulin versus basiliximab in renal transplantation. *N Engl J Med* 2006; 355(19):1967–77.
62. Macian F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(6):472–84.
63. Liu J, Farmer JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991; 66(4):807–15.
64. Wiederrecht G, Lam E, Hung S, Martin M, Sigal N. The mechanism of action of FK-506 and cyclosporin A. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 696:9–19.
65. Bruyne R de, Bogaert D, Ruyck N de, Lambrecht BN, van Winckel M, Gevaert P et al. Calcineurin inhibitors dampen humoral immunity by acting directly on naive B cells. *Clin Exp Immunol* 2015; 180(3):542–50.
66. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vítko S, Nashan B, Gürkan A et al. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med* 2007; 357(25):2562–75.
67. Mayer AD, Dmitrewski J, Squifflet JP, Besse T, Grabensee B, Klein B et al. Multicenter randomized trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporine in the prevention of renal allograft rejection: a report of the European Tacrolimus Multicenter Renal Study Group. *Transplantation* 1997; 64(3):436–43.

68. Gonwa T, Johnson C, Ahsan N, Alfrey EJ, Halloran P, Stegall M et al. Randomized trial of tacrolimus + mycophenolate mofetil or azathioprine versus cyclosporine + mycophenolate mofetil after cadaveric kidney transplantation: results at three years. *Transplantation* 2003; 75(12):2048–53.
69. Lentine KL, Smith JM, Lyden GR, Miller JM, Dolan TG, Bradbrook K et al. OPTN/SRTR 2022 Annual Data Report: Kidney. *Am J Transplant* 2024; 24(2S1):S19-S118.
70. Naesens M, Kuypers DRJ, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4(2):481–508.
71. Kuypers DRJ, Jonge H de, Naesens M, Vanrenterghem Y. A prospective, open-label, observational clinical cohort study of the association between delayed renal allograft function, tacrolimus exposure, and CYP3A5 genotype in adult recipients. *Clin Ther* 2010; 32(12):2012–23.
72. Ponticelli C. De novo thrombotic microangiopathy. An underrated complication of renal transplantation. *Clin Nephrol* 2007; 67(6):335–40.
73. Solez K, Vincenti F, Filo RS. Histopathologic findings from 2-year protocol biopsies from a U.S. multicenter kidney transplant trial comparing tacrolimus versus cyclosporine: a report of the FK506 Kidney Transplant Study Group. *Transplantation* 1998; 66(12):1736–40.
74. Myers BD, Ross J, Newton L, Luetscher J, Perltroth M. Cyclosporine-associated chronic nephropathy. *N Engl J Med* 1984; 311(11):699–705.
75. Ojo AO, Held PJ, Port FK, Wolfe RA, Leichtman AB, Young EW et al. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med* 2003; 349(10):931–40.
76. Jain S, Bicknell GR, Nicholson ML. Tacrolimus has less fibrogenic potential than cyclosporin A in a model of renal ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 2000; 87(11):1563–8.
77. Naesens M, Kambham N, Concepcion W, Salvatierra O, Sarwal M. The evolution of nonimmune histological injury and its clinical relevance in adult-sized kidney grafts in pediatric recipients. *Am J Transplant* 2007; 7(11):2504–14.
78. Mihatsch MJ, Kyo M, Morozumi K, Yamaguchi Y, Nickeleit V, Ryffel B. The side-effects of cyclosporine-A and tacrolimus. *Clin Nephrol* 1998; 49(6):356–63.
79. Ransom JT. Mechanism of action of mycophenolate mofetil. *Ther Drug Monit* 1995; 17(6):681–4.
80. Wagner M, Earley AK, Webster AC, Schmid CH, Balk EM, Uhlig K. Mycophenolic acid versus azathioprine as primary immunosuppression for kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev* 2015; 2015(12):CD007746.
81. Leroy C, Rigot J-M, Leroy M, Decanter C, Le Mapihan K, Parent A-S et al. Immunosuppressive drugs and fertility. *Orphanet J Rare Dis* 2015; 10:136.
82. Thomusch O, Wiesener M, Opgenoorth M, Pascher A, Woitas RP, Witzke O et al. Rabbit-ATG or basiliximab induction for rapid steroid withdrawal after renal transplantation (Harmony): an open-label, multicentre, randomised controlled trial. *Lancet* 2016; 388(10063):3006–16.
83. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004; 351(26):2715–29.
84. Liu Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 2011; 7(12):684–96.
85. Zeisberg M, Neilson EG. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21(11):1819–34.

86. Iwano M, Neilson EG. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004; 13(3):279–84.
87. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008; 214(2):199–210.
88. Park W, Griffin M, Grande JP, Cosio F, Stegall MD. Molecular evidence of injury and inflammation in normal and fibrotic renal allografts one year posttransplant. *Transplantation* 2007; 83(11):1466–76.
89. Mannon RB, Matas AJ, Grande J, Leduc R, Connett J, Kasiske B et al. Inflammation in areas of tubular atrophy in kidney allograft biopsies: a potent predictor of allograft failure. *Am J Transplant* 2010; 10(9):2066–73.
90. Chen M, Lin X, Liu Y, Li Q, Deng Y, Liu Z et al. The function of BAFF on T helper cells in autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 2014; 25(3):301–5.
91. Vincent FB, Northcott M, Hoi A, Mackay F, Morand EF. Association of serum B cell activating factor from the tumour necrosis factor family (BAFF) and a proliferation-inducing ligand (APRIL) with central nervous system and renal disease in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2013; 22(9):873–84.
92. Schwarting A, Relle M, Meineck M, Föhr B, Triantafyllias K, Weinmann A et al. Renal tubular epithelial cell-derived BAFF expression mediates kidney damage and correlates with activity of proliferative lupus nephritis in mouse and men. *Lupus* 2018; 27(2):243–56.
93. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang Y-H et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005; 6(11):1133–41.
94. Vincent FB, Morand EF, Schneider P, Mackay F. The BAFF/APRIL system in SLE pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol* 2014; 10(6):365–73.
95. Chung BH, Oh HJ, Piao SG, Sun IO, Kang SH, Choi SR et al. Higher infiltration by Th17 cells compared with regulatory T cells is associated with severe acute T-cell-mediated graft rejection. *Exp Mol Med* 2011; 43(11):630–7.
96. Chung BH, Yang CW, Cho M-L. Clinical significance of Th17 cells in kidney transplantation. *Korean J Intern Med* 2018; 33(5):860–6.
97. Furie R, Rovin BH, Houssiau F, Malvar A, Teng YKO, Contreras G et al. Two-Year, Randomized, Controlled Trial of Belimumab in Lupus Nephritis. *N Engl J Med* 2020; 383(12):1117–28.
98. Rovin BH, Furie R, Teng YKO, Contreras G, Malvar A, Yu X et al. A secondary analysis of the Belimumab International Study in Lupus Nephritis trial examined effects of belimumab on kidney outcomes and preservation of kidney function in patients with lupus nephritis. *Kidney Int* 2022; 101(2):403–13.
99. Thibault-Espitia A, Foucher Y, Danger R, Migone T, Pallier A, Castagnet S et al. BAFF and BAFF-R levels are associated with risk of long-term kidney graft dysfunction and development of donor-specific antibodies. *Am J Transplant* 2012; 12(10):2754–62.
100. Schuster A, Jung B, Hofbauer J, Kühne L, Zecher D, Banas B et al. B-cell activating factor BAFF reflects patients' immunological risk profile after kidney transplantation. *Transpl Immunol* 2017; 45:35–41.
101. Pongpirul W, Chanchaoenthana W, Pongpirul K, Leelahavanichkul A, Kittikowit W, Jutivorakool K et al. B-cell activating factor, a predictor of antibody mediated rejection in kidney transplantation recipients. *Nephrology (Carlton)* 2018; 23(2):169–74.

102. Banham G, Prezzi D, Harford S, Taylor CJ, Hamer R, Higgins R et al. Elevated pretransplantation soluble BAFF is associated with an increased risk of acute antibody-mediated rejection. *Transplantation* 2013; 96(4):413–20.
103. Schuster AM, Miesgang N, Steines L, Bach C, Banas B, Bergler T. B-cell activating factor BAFF as a novel alert marker for the immunological risk stratification after kidney transplantation. *Immunol Res* 2021; 69(6):487–95.
104. Steines L, Poth H, Schuster A, Geissler EK, Amann K, Banas B et al. Anti-BAFF Treatment Interferes With Humoral Responses in a Model of Renal Transplantation in Rats. *Transplantation* 2020; 104(1):e16–e22.
105. Mujtaba MA, Komocsar WJ, Nantz E, Samaniego MD, Henson SL, Hague JA et al. Effect of Treatment With Tabalumab, a B Cell-Activating Factor Inhibitor, on Highly Sensitized Patients With End-Stage Renal Disease Awaiting Transplantation. *Am J Transplant* 2016; 16(4):1266–75.
106. Banham GD, Flint SM, Torpey N, Lyons PA, Shanahan DN, Gibson A et al. Belimumab in kidney transplantation: an experimental medicine, randomised, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet* 2018; 391(10140):2619–30.
107. Federico G, Meister M, Mathow D, Heine GH, Moldenhauer G, Popovic ZV et al. Tubular Dickkopf-3 promotes the development of renal atrophy and fibrosis. *JCI Insight* 2016; 1(1):e84916.
108. Nelson PJ, Toerne C von, Gröne H-J. Wnt-signaling pathways in progressive renal fibrosis. *Expert Opin Ther Targets* 2011; 15(9):1073–83.
109. Zewinger S, Rauen T, Rudnicki M, Federico G, Wagner M, Triem S et al. Dickkopf-3 (DKK3) in Urine Identifies Patients with Short-Term Risk of eGFR Loss. *J Am Soc Nephrol* 2018; 29(11):2722–33.
110. Schunk SJ, Zarbock A, Meersch M, Küllmar M, Kellum JA, Schmit D et al. Association between urinary dickkopf-3, acute kidney injury, and subsequent loss of kidney function in patients undergoing cardiac surgery: an observational cohort study. *Lancet* 2019; 394(10197):488–96.
111. Schunk SJ, Beisswenger C, Ritzmann F, Herr C, Wagner M, Triem S et al. Measurement of urinary Dickkopf-3 uncovered silent progressive kidney injury in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Kidney Int* 2021; 100(5):1081–91.
112. Roscigno G, Quintavalle C, Biondi-Zoccai G, Micco F de, Frati G, Affinito A et al. Urinary Dickkopf-3 and Contrast-Associated Kidney Damage. *J Am Coll Cardiol* 2021; 77(21):2667–76.
113. Schuster A, Steines L, Müller K, Zeman F, Findeisen P, Banas B et al. Dickkopf 3-A New Indicator for the Deterioration of Allograft Function After Kidney Transplantation. *Front Med (Lausanne)* 2022; 9:885018.
114. Limbach Gruppe SE. Dickkopf 3 (DKK3): Neuer Biomarker einer progredienten chronischen Nierenschädigung; 2024 [cited 2024 Jun 2]. Available from: URL: <https://www.limbachgruppe.com/fuer-aerzte/dickkopf-dkk3/>.
115. Bergler T, Hoffmann U, Bergler E, Jung B, Banas MC, Reinhold SW et al. Toll-like receptor 4 in experimental kidney transplantation: early mediator of endogenous danger signals. *Nephron Exp Nephrol* 2012; 121(3-4):e59-70.
116. Hoffmann U, Bergler T, Jung B, Steege A, Pace C, Rümmele P et al. Comprehensive morphometric analysis of mononuclear cell infiltration during experimental renal allograft rejection. *Transpl Immunol* 2013; 28(1):24–31.

117. Badid C, Desmouliere A, Babici D, Hadj-Aissa A, McGregor B, Lefrancois N et al. Interstitial expression of alpha-SMA: an early marker of chronic renal allograft dysfunction. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17(11):1993–8.
118. Kühne L, Jung B, Poth H, Schuster A, Wurm S, Ruemmele P et al. Renal allograft rejection, lymphocyte infiltration, and de novo donor-specific antibodies in a novel model of non-adherence to immunosuppressive therapy. *BMC Immunol* 2017; 18(1):52.
119. Badr G, Borhis G, Lefevre EA, Chaoul N, Deshayes F, Dessirier V et al. BAFF enhances chemotaxis of primary human B cells: a particular synergy between BAFF and CXCL13 on memory B cells. *Blood* 2008; 111(5):2744–54.
120. Hueso M, Navarro E, Moreso F, O'Valle F, Pérez-Riba M, Del Moral RG et al. Intragraft expression of the IL-10 gene is up-regulated in renal protocol biopsies with early interstitial fibrosis, tubular atrophy, and subclinical rejection. *Am J Pathol* 2010; 176(4):1696–704.
121. Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int* 2006; 69(2):213–7.
122. Suso JP, Posso-Osorio I, Jiménez CA, Naranjo-Escobar J, Ospina FE, Sánchez A et al. Profile of BAFF and its receptors' expression in lupus nephritis is associated with pathological classes. *Lupus* 2018; 27(5):708–15.
123. Kang S, Fedoriw Y, Brenneman EK, Truong YK, Kikly K, Vilen BJ. BAFF Induces Tertiary Lymphoid Structures and Positions T Cells within the Glomeruli during Lupus Nephritis. *J Immunol* 2017; 198(7):2602–11.
124. François A, Gombault A, Villeret B, Alsaleh G, Fanny M, Gasse P et al. B cell activating factor is central to bleomycin- and IL-17-mediated experimental pulmonary fibrosis. *J Autoimmun* 2015; 56:1–11.
125. Liu J, Xiao Q, Xiao J, Niu C, Li Y, Zhang X et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduct Target Ther* 2022; 7(1):3.
126. Gordon JK, Martyanov V, Franks JM, Bernstein EJ, Szymonifka J, Magro C et al. Belimumab for the Treatment of Early Diffuse Systemic Sclerosis: Results of a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Pilot Trial. *Arthritis Rheumatol* 2018; 70(2):308–16.
127. Masola V, Gambaro G, Tibaldi E, Brunati AM, Gastaldello A, D'Angelo A et al. Heparanase and syndecan-1 interplay orchestrates fibroblast growth factor-2-induced epithelial-mesenchymal transition in renal tubular cells. *J Biol Chem* 2012; 287(2):1478–88.
128. Ludwig J, Federico G, Prokosch S, Küblbeck G, Schmitt S, Klevenz A et al. Dickkopf-3 acts as a modulator of B cell fate and function. *J Immunol* 2015; 194(6):2624–34.
129. Karpe KM, Talaulikar GS, Walters GD. Calcineurin inhibitor withdrawal or tapering for kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev* 2017; 7(7):CD006750.
130. Labes R, Brinkmann L, Kulow VA, Roegner K, Mathia S, Balcerak B et al. Daprodustat prevents cyclosporine-A-mediated anemia and peritubular capillary loss. *Kidney Int* 2022; 102(4):750–65.
131. Andoh TF, Bennett WM. Chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998; 7(3):265–70.
132. Farouk SS, Rein JL. The Many Faces of Calcineurin Inhibitor Toxicity-What the FK? *Adv Chronic Kidney Dis* 2020; 27(1):56–66.

