

**Einfluss von Hypervolämie auf T-Zell-Subpopulationen,  
Monozyten sowie TNF- $\alpha$  und Caspase-4-Aktivierung bei  
chronischen Nierenerkrankungen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von: Zeynep Canim

Betreuer: PD Dr. med. Roman Fiedler, Dr. rer. nat. Christof Ulrich

Gutachter: Prof. Dr. Michael Gekle, Halle (Saale);  
apl. Prof. Dr. Martin Busch, Jena

Datum der Verteidigung: 10.07.2025

*Gewidmet meinen Eltern*

## Referat

Die Hypervolämie, ein bei Hämodialysepatienten häufig vorkommendes Phänomen, wird seit geraumer Zeit mit der Inflammation in Verbindung gebracht. Da die genauen pathophysiologischen Mechanismen, wie Hypervolämie zum Krankheitsgeschehen beiträgt, nicht bekannt sind, rücken hypervoläme Entgleisungen der Nierenkranken vermehrt in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. In der hier durchgeführten monozentrischen Pilotstudie wurden 40 Hämodialysepatienten durch Bioimpedanzmessung in die beiden Gruppen „normovoläm“ (N:23) und „hypervoläm“ (H:17) eingeteilt. Mit Hilfe von klassischen biochemischen Verfahren wurden periphere mononukleare Blutzellen (PBMCs) aus den Blutproben der Probanden isoliert und durchflusszytometrisch bestimmt, wobei hier der Fokus auf den T-Zellen und Monozyten lag. Die mRNA-/Protein-Expression vom Tumornekrosefaktor (TNF- $\alpha$ ) wurde mittels des qPCRs und ELISA-Methoden ermittelt. Die Phosphorylierung der Proteine RelA (pS529) und RelB (pS552) des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B wurde anhand der Durchflusszytometrie analysiert. Zur Ermittlung der Caspase-4- und -8-Aktivität wurde ein Caspase-Assay mit substratspezifischen Inhibitoren verwendet. Durch die angewendeten Verfahren sollte in dieser Studie der entzündliche Charakter in hypervolämen Hämodialysepatienten untersucht und dessen Einfluss auf die T- und Monozytenpopulationen analysiert werden. Die in die Studie eingebundenen hypervolämen Patienten wiesen erhöhte CRP- und Blutdruckwerte auf und hatten häufiger Diabetes. Eine vermehrte TNF- $\alpha$ -Sekretion konnte durch *ex vivo* Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) beobachtet werden, während in Monozyten der normovolämen Patienten auch eine mögliche Beteiligung des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor-Pathways nachgewiesen wurde. Bei Hypervolämen beobachteten wir eine erhöhte monozytäre Caspase-4-Aktivität, die ein Beleg für die höhere bakterielle, inflammatorische Belastung solcher HD-Patienten ist. Gleichzeitig zeigte sich bei den Hypervolämen ein geringerer Phosphorylierungsgrad von monozytärem RelB, ein Faktor, der mit der Abschaltung der NF $\kappa$ B-Aktivität verknüpft ist, was als Indiz einer schwächeren Eindämmungskapazität der Inflammation gewertet werden kann.

# Inhaltsverzeichnis

## Referat

### Abkürzungen und Symbole

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Chronische Nierenerkrankungen .....	1
1.2 Inflammation in CKD .....	3
1.2.1 Bedeutung von Monozyten .....	4
1.2.2 Bedeutung von T-Lymphozyten .....	5
1.3 Zytokine .....	7
1.3.1 TNF- $\alpha$ .....	8
1.3.2 Interleukin 6 .....	9
1.4 Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B mit Bezug auf RelA und RelB.....	10
1.5 Inflammatorische Caspasen mit Fokus auf Caspase 4 .....	11
<b>2. Zielstellung .....</b>	<b>14</b>
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
3.1 Material .....	15
3.2 Methoden .....	20
3.2.1 Studiendesign.....	20
3.2.2 Studienablauf .....	21
3.2.2.1 Klinische Phase .....	21
3.2.2.2 Experimentelle Phase .....	23
3.2.2.3 Statistische Phase .....	39
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
4.1 Demographische Daten .....	40
4.2 Absolutwerte immunologisch aktiver Zellen.....	41
4.3 mRNA-Expression von TNF- $\alpha$ unter basalen und stimulierten Bedingungen .....	42
4.4 TNF- $\alpha$ Sekretion .....	43
4.4.1 TNF- $\alpha$ -Serum-Spiegel .....	43
4.4.2 TNF- $\alpha$ im Überstand von unstimulierten und stimulierten PBMCs.....	44

4.4.3 TNF- $\alpha$ positive Monozyten und Lymphozyten unter basalen und stimulierten Bedingungen.....	45
4.5 NF $\kappa$ B Signaling .....	48
4.5.1 Phosphorylierung von NF $\kappa$ B (RelA/p65) an Serin 529 in CD86-positiven Monozyten unter basalen und stimulierten Bedingungen .....	49
4.5.2 Phosphorylierung von NF $\kappa$ B (RelA/p65) an Serin 529 in CD4-positiven Lymphozyten unter basalen und stimulierten Bedingungen.....	50
4.5.3 RelB Signaling in CD86-positiven Monozyten unter basalen und stimulierten Bedingungen.....	51
4.5.4 RelB Signaling in CD4-positiven Lymphozyten unter basalen und stimulierten Bedingungen.....	52
4.6 Caspase - 4 Aktivierung in der Hypervolämie.....	53
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>54</b>
5.1 Einschränkungen .....	62
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>63</b>
<b>7. Thesen .....</b>	<b>73</b>
<b>8. Anhang</b>	

## Abkürzungen und Symbole

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
ACTB	Actin Beta
AhR-A	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor-Antagonist
BAFF	B Cell Activating Factor
BIA	Bioelektrische Impedanz Analyse
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Bovines Serumalbumin
CARD	Caspase Recruitment Domain
CASP	Caspase
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Complementary DNA
CKD	Chronic Kidney Disease
CRP	C-reaktives Protein
C <sub>t</sub>	Cycle Threshold
DAMP	Damage Associated Molecular Patterns
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ECW	Extrazelluläres Wasser
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FADD	Fas-Associated Death Domain
FBS	Fetal Bovine Serum
FRET	Föster-Resonanz-Energietransfer
FSC	Forward Scatter
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
H	Hypervolämie
HD	Hämodialyse

HDL	High Density Lipoprotein
HSA	Humanes Serumalbumin
I3S	Indoxylsulfat
IFN	Interferon
IL	Interleukin
I $\kappa$ B	Inhibitor of NF $\kappa$ B
IKK	I $\kappa$ B-Kinase-Komplexes
JAK	Januskinase
kDa	Kilo-Dalton
KfH	Kuratorium für Dialyse und Nierentransplantation e.V
KIM	Klinik für Innere Medizin
KO	Kontrollgruppe
LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
LT $\beta$	Lymphotoxin- $\beta$
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MHC	Major Histocompatibility Complex
mRNA	Messenger RNA
mTNF $\alpha$	Membrangebundenes TNF- $\alpha$
N	Normovolämie
Na-Azid	Natriumazid
NF $\kappa$ B	Nuclear Factor “kappa-light-chain- enhancer” of Activated B-cells
NIK	NF $\kappa$ B-induzierende Kinase
NK	Natürliche Killerzellen
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyd
PRR	Pattern-Recognition-Rezeptor

qPCR	quantitative Real-Time PCR (auch RT-PCR)
RelA/B	Proteine der NF $\kappa$ B-Familie
RIP1	Receptor Interacting Protein 1
RNA	Ribonucleic Acid
rpm	Rotation per Minute
RPMI	Zellkulturmedium
SD	Standardabweichung
SSC	Side Scatter
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
sTNF $\alpha$	Soluble TNF- $\alpha$
TACE/ADAM17	TNF- $\alpha$ Converting Enzyme
Taq	Thermus aquaticus
TBW	Total Body Water
T <sub>C</sub>	Zytotoxische T-Zellen
TCR	T-Cell Receptor
T <sub>H</sub>	T-Helferzellen
TLR-4	Toll-like Receptor 4
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TNFR1/2	TNF- $\alpha$ -Rezeptoren 1 und 2
TRADD	TNFR1-Associated Death Domain Protein
TRAF	TNFR-Associated Factor
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T-Zellen
UF	Ultrafiltrationsrate
UMH	Universitätsmedizin Halle
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

## 1. Einleitung

### 1.1 Chronische Nierenerkrankungen

Die chronische Nierenerkrankung („chronic kidney disease“, CKD) ist eine weltweit 8% bis 16% der Bevölkerung betreffende Erkrankung (Chen et al. 2020), die mit einer Prävalenz von etwa 10% ab einem Alter von 40 Jahren ebenso häufig vertreten ist wie Diabetes mellitus, koronare Herzkrankheit oder Depression (Stolpe et al. 2022).

Von einer chronischen Nierenerkrankung wird gesprochen, wenn eine veränderte Struktur der Niere oder eine eingeschränkte Nierenfunktion vorliegt, die länger als 3 Monate andauert. Es wird eine Reduktion der glomerulären Filtrationsrate (GFR) oder eine Ausscheidung von Albumin im Urin beobachtet. Beträgt die GFR  $\leq 60$  ml/min pro  $1,73 \text{ m}^2$  oder liegt eine Albuminurie von  $\geq 30$  mg/d vor, dann wird von einer anhaltenden Anomalie der Nierenstruktur gesprochen (Chen et al. 2020). Mit zunehmender Albuminausscheidung und abnehmender Nierenfunktion steigt das Risiko einer Dialysepflichtigkeit und die Mortalitätsrate exponentiell an, wobei kardiovaskuläre Ereignisse zumeist die Todesursache darstellen (Greite, Schmidt-Ott 2022).

Wurde eine chronische Nierenerkrankung festgestellt, wird im nächsten Schritt das Stadium der CKD bestimmt. Die Einteilung, welche von der Organisation Kidney Disease: Improving Global Outcome in ihrer Leitlinie empfohlen wird, beinhaltet die Ursache der CKD, 6 GFR- und 3 Albuminurie-Kategorien. Ein entscheidender Faktor für die Prognose der Erkrankung ist dabei die Albuminausscheidung.

#### Hypervolämie

Albumin ist ein Protein, zu dessen Aufgaben unter anderem die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks im Blut zählt. Im Rahmen eines nephrotischen Zustandes kommt es durch die Hypoalbuminämie zur Veränderung des onkotischen Drucks, welche zu einer irregulären Flüssigkeitsverteilung zwischen dem Blutplasma und Interstitium führt. Die Kapillarfiltration der überschüssigen Flüssigkeit nimmt ab und es kommt zu einer Anhäufung dieser im Interstitium (Humphreys 1994). Die von Hung et al. durchgeführte Querschnittsstudie legt nahe, dass eine Nierenfunktionsstörung nur dann mit einer Flüssigkeitsretention assoziiert ist, wenn eine Proteinurie vorliegt (Hung et al.

2014). Durch den progressiven Verlust der Nierenfunktion kommt es außerdem zu einer verminderten Filtration von Natrium, welches letztendlich die Volumenausdehnung mit begünstigt (ebd.). Kommt es nun auch zur vermehrten Einnahme von Natrium über die Nahrung, kann dies bei CKD-Patienten zur Hypernatriämie, und diese wiederum zu einem verstärkten Durstgefühl durch die vermehrte Aktivierung des Durstzentrums im Gehirn und somit zu einer Zunahme der extrazellulären Flüssigkeit (ECW) führen (Nagasawa 2021). Die kranken Nieren sind somit nicht mehr in der Lage, die Natriumausscheidung mit der Natriumaufnahme in Einklang zu bringen. Auch die erhöhte Kapillardurchlässigkeit begünstigt die Veränderung der Verteilung der Flüssigkeit zwischen dem Blutvolumen und dem interstitiellen Raum (Ulrich et al. 2020). Durch die aufgelisteten Faktoren ist somit die Entstehung einer extrazellulären Flüssigkeitsüberlastung (Hypervolämie) absehbar.

Mit Hilfe der bioelektrischen Impedanzanalyse (BIA), welche die elektrischen Eigenschaften von Geweben ausnutzt, kann der Flüssigkeitsstatus direkt überwacht werden, ohne dass eine Körpergewichtsmessung notwendig ist. Hierbei wird der Hydratationszustand von dialysepflichtigen Nierenkranken mit dem einer gesunden Bevölkerung verglichen. Dabei zeichnen sich bei den Messungen Trajektorien auf, die sich entweder innerhalb oder außerhalb der 75%-Toleranzellipse (Referenzpopulation) befinden. Liegen diese innerhalb, kann davon ausgegangen werden, dass eine normale, der gesunden Bevölkerung entsprechende Hydratation vorliegt. Befinden sich diese jedoch außerhalb der 75%-Toleranzellipse, liegt ein „abnormaler“ Zustand vor. Durch die Messungen können Hämodialysepatienten somit in „normovoläm“ und „hypervoläm“ eingeteilt werden (Piccoli 2014).

Die Hypervolämie ist bei Patienten mit Nierenversagen im Endstadium keine Seltenheit. Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von dysreguliertem Bluthochdruck und kongestiver Herzinsuffizienz bei Hämodialysepatienten. So betrug die jährliche Mortalitätsrate bei den HD-Patienten im Jahre 2010 ungefähr 18%, wovon etwa die Hälfte der Todesfälle auf kardiovaskuläre Ursachen zu schließen waren (Agarwal 2010). Schon in frühen Phasen der CKD gibt es Hinweise darauf, dass die Hypervolämie mit der Aktivierung des Immunsystems assoziiert ist, welche die Inflammation bei HD-Patienten begünstigt und einen Risikofaktor für die Mortalität darstellt (Pecoits-Filho et al. 2004).

## 1.2 Inflammation in CKD

Die Inflammation wurde in den späten 1990er Jahren vorwiegend mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Mortalität in Verbindung gebracht und als wesentlicher Bestandteil der chronischen Nierenerkrankung deklariert (Stenvinkel et al. 1999). Seitdem rückte die Inflammation immer weiter in den Mittelpunkt der Forschung. Das Interesse an Inflammation in CKD nahm zu und mehrere Studien zu der Thematik wurden verzeichnet. In ihrer Arbeit fassten Akchurin und Kaskel mehrere Metaanalysen und Studien auf dem Gebiet der urämischen Entzündung zusammen. Hierbei wurde deutlich, dass die Inflammation bei CKD-Patienten multifaktoriell bedingt ist. Neben genetischen Faktoren, Lebensstil und dialysebezogenen Aspekten spielen epigenetische Einflüsse eine große Rolle bei der Entstehung dieser (Akchurin, Kaskel 2015). Daten aus der Studie von Shlipak et al. deuten darauf hin, dass schon in frühen Stadien der CKD bestimmte proinflammatorische Zytokine und inflammatorische Biomarker bei Patienten mit Niereninsuffizienz deutlich höher waren als bei Patienten mit normaler Nierenfunktion und mit der Progredienz der Erkrankung zunehmend vermehrt im Plasma vorlagen (Shlipak et al. 2003). Als Ursache wurde entweder eine verringerte renale Clearance oder eine erhöhte Produktion dieser in Betracht gezogen (Rosengren et al. 2013).

Im Jahre 2006 untersuchten Goncalves et al. in einer Querschnitts- und Beobachtungsstudie den Zusammenhang zwischen der renalen Funktion, Hypervolämie und systemische Inflammation bei chronischen Nierenkranken. Hierbei belegten sie, dass die Hypervolämie einen Stimulus für die inflammatorische Aktivität darstellt, welches mit einer womöglich veränderten Durchlässigkeit der Darmbarriere assoziiert wurde, die als Folge des ödematösen Zustandes hervortreten und die Verlagerung von Makromolekülen einschließlich Endotoxine in den Blutkreislauf ermöglichen könnte (Goncalves et al. 2006). Obwohl der Pathomechanismus hierfür noch nicht eindeutig geklärt ist, stellt dies eine gute Erklärung für die Entstehung der Inflammation bei Hypervolämie dar. Zahlreiche Studien deuten darauf hin, dass aus dem Darmtrakt freigesetzte Toxine wie Indoxylsulfat (IS) an dem Entzündungszustand bei CKD beteiligt sind. Es wurde aufgezeigt, dass die Gesamtmortalität und die durch kardiovaskuläre Ursachen herbeigeführte Mortalität bei Hämodialysepatienten durch eine höhere IS-

Konzentration angestiegen ist (Huang et al. 2016). In mehreren Studien wurde dargelegt, dass proinflammatorische Zytokinspiegel wie Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  und Interleukin (IL)-6 und das C-reaktive Protein (CRP) durch urämische Toxine erhöht (Adesso et al. 2013) sowie die Expression des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor „kappa-light-chain-enhancer“ of Activated B-cells (NF $\kappa$ B) positiv durch diese beeinflusst werden (Rapa et al. 2019). In Anwesenheit von Lipopolysaccharid (LPS), welche die bakterielle äußere Zellmembran von gramnegativen Bakterien bildet, induziert I3S die Verstärkung der inflammatorischen Reaktion. In einem Mausmodell wurde festgestellt, dass I3S die Funktion von Makrophagen stimuliert und die LPS-gebundene Entzündungsreaktion fördert (Kim et al. 2017).

Bei Patienten mit CKD spielt somit die Retention urämischer Toxine und Zytokine eine große Rolle bei der Entwicklung des proinflammatorischen Milieus, die die Zusammensetzung und Funktion des zellulären Immunsystems beeinflusst (ebd.)

### 1.2.1 Bedeutung von Monozyten

In vorangegangenen Studien wurde aufgezeigt, dass Monozyten und T-Zellen bei Hämodialysepatienten verglichen mit der gesunden Population erhöht vorkommen (Heine et al. 2008; Kim et al. 2017).

Monozyten entstehen im Knochenmark aus der myeloischen Progenitorzelle und sind den Leukozyten zugeordnet. Sie repräsentieren etwa 5% aller im Blut zirkulierenden kernhaltigen Zellen. Als Teil der angeborenen Immunantwort spielen sie eine Schlüsselrolle bei Infektionen und Entzündungen sowie bei Gewebereparaturen und -regeneration (Espinoza, Emmady 2024). Die „Aktivierung“ der Monozyten kann durch Entzündungsmediatoren, chemotaktische Faktoren oder durch den Kontakt mit entzündungsfördernden Organismen im Körper erfolgen (Nockher, Scherberich 1998).

Monozyten stellen eine heterogene Zellgruppe dar, die sich phänotypisch durch unterschiedliche LPS-Rezeptoren CD14 und Fc $\gamma$ III-Rezeptoren CD16, welche sich auf ihrer Oberfläche befinden, charakterisieren und sich in die drei Subtypen klassisch (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), intermediär (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) und nicht klassisch (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) einteilen (Ziegler-Heitbrock et al. 2010). Hierbei wird die Hauptgruppe von den klassischen Monozyten gebildet (90%), während unter physiologischen Bedingungen die CD16-

positiven Monozyten nur ca. 10% der sich im Blut zirkulierenden Monozyten ausmachen (Ziegler-Heitbrock 2014).

Im Hinblick auf die inflammatorischen Eigenschaften werden die CD16-positiven Monozyten als proinflammatorisch beschrieben. Sie produzieren vermehrt TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6, während sie IL-10, ein antiinflammatorisches Zytokin, in geringem Maße sezernieren. Trotz ihres minimalen Anteils im menschlichen Blut sind sie für einen großen Teil des von stimulierten „Peripheral Blood Mononuclear Cell“ (PBMC) sezernierten TNF- $\alpha$  verantwortlich. Außerdem wurde ein Anstieg der Zellzahl dieser in chronischem Entzündungszustand beobachtet (Belge et al. 2002; Heine et al. 2008). Merino et al. stellten in ihrer durchgeführten Studie fest, dass durch die Stimulation mit LPS die Zunahme der Zytokinproduktion von CD16<sup>+</sup> Monozyten erfolgt. Des Weiteren konnte erfasst werden, dass die CD16<sup>+</sup> Monozyten bei CKD-Patienten erhöht sind und eine große Rolle bei der Schädigung des Endothels und somit bei der Entstehung von Gefäßerkrankungen spielen (Merino et al. 2011). Auch die von Rogacev et al. durchgeführte Studie bestätigte, dass die intermediären und nicht-klassischen Monozyten bei dialysepflichtigen Patienten im Gegensatz zur gesunden Population vermehrt vorliegen (Rogacev et al. 2011).

Neben ihrer proinflammatorischen Eigenschaft lässt sich auch über ihre Rolle als potente Antigen-präsentierende Zelle sprechen. So besitzen CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> Monozyten an ihrer Oberfläche vermehrt MHC-Klasse-II-Moleküle, welche für die Antigenpräsentation an T-Lymphozyten notwendig sind und somit möglicherweise die Immunantwort während eines Entzündungsgeschehens auslösen können (Nockher, Scherberich 1998).

### 1.2.2 Bedeutung von T-Lymphozyten

Thymusabhängige (T-) Lymphozyten, auch als T-Zellen bezeichnet, sind Teil der adaptiven Immunabwehr und gehen aus multipotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark hervor, wobei die Heranreifung und die positive sowie negative Selektion dieser im Thymus erfolgen und dann in die Peripherie ausgeschleust werden (Sauls et al. 2024).

T-Zellen ( $CD3^+$  Lymphozyten) durchlaufen im Laufe ihrer Entwicklung mehrere Stadien, die unter anderem durch Veränderung der Zelloberflächenproteine, sogenannte CD-Moleküle, gekennzeichnet sind. Zu Beginn liegen die T-Zellen zumeist als unreife, doppelt negative Thymozyten vor und tragen somit keine der für T-Zellen charakteristischen Oberflächenmoleküle. Im weiteren Verlauf bildet sich der T-Zellrezeptor (TCR), der sich mit dem Proteinkomplex CD3 vereinigt und somit den T-Zell-CD3-Komplex bildet. Somit vermehren sich die Zellen und exprimieren die beiden CD4- und CD8-Corezeptoren. Die nun entstandenen doppelt positiven Thymozyten durchlaufen die negative und positive Selektion und werden schließlich zu einfach positiven CD4- oder CD8-Thymozyten, indem sie die Expression eines der beiden Corezeptormoleküle beenden. Somit können diese aus dem Thymus in die Peripherie entlassen werden und ihrer Aufgabe in der Immunabwehr nachgehen (Murphy, Weaver 2018).

T-Zellen erkennen Antigene, die an sogenannte Haupthistokompatibilitätskomplexen (im engl.: Major Histocompatibility Complex, MHC) gebunden sind. Dabei werden zwei verschiedene Typen unterschieden: die MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Rezeptoren. Für die Entwicklung und Aktivierung von  $CD4^+$ -T-Zellen sind die MHC-Klasse-II-Moleküle, welche unter anderem von Monozyten exprimiert werden, und für die  $CD8^+$ -T-Zell-Entwicklung und Aktivierung die MHC-Klasse-I-Moleküle notwendig, die die Antigene binden und mit dem TCR interagieren (Alberts et al. 2002).

$CD8^+$ -T-Zellen, auch als zytotoxische Zellen ( $T_c$ ) bezeichnet, stellen eine Untergruppe der  $CD3^+$ -T-Zellen dar und sind an der zellvermittelten Immunantwort beteiligt. Durch das Erkennen des Pathogens auf einer Zielzelle sezernieren sie Proteine wie Granzyme und Perforine und können durch die Aktivierung von Caspasen die Apoptose dieser Zellen auslösen (Lüllmann-Rauch, Asan 2015).

Die  $CD4^+$ -T-Zellen stellen eine weitere Untergruppe dar und unterteilen sich zum einen in die T-Helferzellen ( $T_H$ ) mit den drei Subtypen  $T_H1$ - und  $T_H2$ - und  $T_H17$ -Zellen und den regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) (Corthay 2008). Die T-Helferzellen vom Typ I sezernieren die Zytokine Interferon ( $IFN$ ) $_\gamma$  und  $TNF-\alpha$ , welche zur Aktivierung und Differenzierung von Makrophagen sowie zur vermehrten Migration von dendritischen Zellen führen. Während die  $T_H2$ -Zellen Interleukine produzieren und an der Bekämpfung von

parasitären Infektionen beteiligt sind, aktivieren  $T_H17$ -Zellen Monozyten und neutrophile Granulozyten und führen zu einer Verstärkung des Entzündungsgeschehens (Sauls et al. 2024). Dagegen besitzen regulatorische T-Zellen modulierende und supprimierende Eigenschaften, die an der Entwicklung der Selbsttoleranz sowie an der Beendigung einer Infektion eine große Rolle spielen. Sie produzieren die inhibierenden Zytokine IL-10 und IL-35 und können somit die Immunantwort steuern (ebd.).

### **1.3 Zytokine**

Das menschliche Immunsystem wird in die angeborene (unspezifische) und erworbene (adaptive, spezifische) Immunabwehr eingeteilt. Monozyten/Makrophagen und dendritische Zellen spielen eine wichtige Rolle in der angeborenen, während die Antigen-spezifischen T- und B-Zellen ihre Funktion in der erworbenen Immunabwehr ausüben (Lüllmann-Rauch, Asan 2015). Das unspezifische Immunsystem erkennt Pathogene beim Eindringen in den Körper und versucht diese durch eine inflammatorische Reaktion zu eliminieren. Dabei werden sogenannte „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) wie zum Beispiel LPS (abgeleitet von Pathogenen) und „damage associated molecular patterns“ (DAMPs), welche intrazelluläre Proteine und Nukleinsäuren darstellen, mittels Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRRs) der Immunzellen erfasst und intrazelluläre Signale ausgelöst, wobei Transkriptionsfaktoren wie NF $\kappa$ B aktiviert werden und es vermehrt zur Expression von inflammatorischen Genen kommt (Hirayama et al. 2017). Inflammatorische Zytokine werden infolgedessen produziert, die somit eine Immunreaktion auslösen (Kawai, Akira 2010).

Zytokine sind kleine (< 40 kDa) Proteine, die von fast allen Zellen produziert werden und als immunologische Vermittler zwischen diesen gelten (Kany et al. 2019). Sie stellen eine inhomogene Gruppe dar, die sich in Interleukine, Interferone, Tumornekrosefaktoren, Chemokinen sowie verschiedene Wachstumshormone einteilen. Sie regulieren die Proliferation und beeinflussen die Differenzierung von Immunzellen und spielen eine signifikante Rolle in physiologischen und pathologischen Prozessen (Liu et al. 2021). Die Einteilung von Zytokinen kann neben den oben genannten Hauptgruppen auch funktionell grob in anti-inflammatorisch und pro-inflammatorisch unterschieden

werden. Anti-inflammatorische Zytokine sind an der Überwachung von pro-inflammatorischer Zytokinreaktion und der Regulation humaner Immunantwort beteiligt. IL-10, mit seiner maßgebend entzündungshemmenden Wirkung, dient zur Unterdrückung der Expression von inflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IL-6 und der Hemmung der Antigenpräsentation (Zhang, An 2007; Sabat et al. 2010). Im Gegensatz zu diesen werden entzündungsfördernde Zytokine vermehrt von Monozyten/Makrophagen durch den Kontakt mit zum Beispiel bakteriellen Produkten sezerniert und initiieren die Aktivierung der adaptiven Immunabwehr beim Eindringen der Pathogene in den Wirt, um Verletzung und Inflammation so schnell es geht vorzubeugen. Ihre wichtigste Aufgabe besteht darin, mit den umliegenden Geweben zu kommunizieren und durch den Eintritt in die Blutzirkulation im Wirt die Akute-Phase-Reaktion zu starten (Liu et al. 2021).

### 1.3.1 TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  gehört zur Familie der Tumornekrosefaktoren und wurde im Jahre 1975 im Serum von Tieren entdeckt, die durch Endotoxin behandelt wurden. Durch seine nekrotische Wirkung in Tumorzellen wurde ihm die heutige Bezeichnung gegeben. Zehn Jahre später wurde aus dem Überstand von mit Endotoxin behandelten Makrophagen ein Protein namens Cachectin ausfindig gemacht, welches sich später auch als TNF- $\alpha$  erwies (Chu 2013). Dieser spielt eine große Rolle in akuter und chronischer Inflammation sowie in Autoimmunerkrankungen, wobei dieser auch an der Apoptose und der Initiation der Akute-Phase-Reaktion mitwirkt (ebd.) Die Hauptproduzenten von TNF- $\alpha$  sind Monozyten/Makrophagen, wobei diese auch von B- und T-Lymphozyten, Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), Mastzellen und Endothelzellen sezerniert werden (Bradley 2008).

Es sind zwei Arten des Tumornekrosefaktors  $\alpha$  vorhanden: die membrangebundene (mTNF- $\alpha$ ) und die gelöste (sTNF- $\alpha$ ) Form. Durch die Metalloprotease Tumornekrosefaktor- $\alpha$  konvertierendes Enzym (kurz TACE oder auch als ADAM17 bezeichnet) wird von dem mTNF- $\alpha$  die gelöste, aktive Form sTNF $\alpha$  freigesetzt (Black et al. 1997). Demnach können beide Formen mit den TNF-Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 interagieren, wobei die proinflammatorische Wirkung und der programmierte Zelltod

zumeist durch TNFR1 ausgeübt werden, denn diese besitzt eine „Death Domäne“ (DD), die mit Todesdomänen von anderen Adaptorproteinen interagieren können (Pobezinskaya, Liu 2012). Dementgegen besitzt TNFR2 keine DD und die Signalwege sind unklar definiert. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass TNFR2 die Zellaktivierung, Proliferation und die Migration fördert (Bradley 2008) und zur TNFR1-Antwort, insbesondere bei niedrigen TNF- $\alpha$  Konzentrationen, beiträgt, in dem es TNFR1 die von sich „aufgefangenen“ TNF-Signale übergibt (Tartaglia et al. 1993).

Nach der Bindung von TNF- $\alpha$  an TNFR1, kommt es zur Konformationsänderung. Adapterproteine wie TRADD können sich anschließend an diesen Komplex binden. Weitere Proteine wie FADD und/oder RIP1 werden rekrutiert. Dieser Komplex kann anschließend mit der Caspase-8 (CASP8) interagieren und diese aktivieren. Somit wird die Grundlage für den programmierten Zelltod geschaffen (Li et al. 2013). Durch die Anbindung von TRADD an TNFR1 können auch TNFR-assoziierte Faktoren (TRAFs), insbesondere TRAF2 und TRAF5, rekrutiert werden, die zur Aktivierung des NF $\kappa$ B-Weges führen (Pobezinskaya, Liu 2012). Bemerkenswert ist jedoch, dass TNFR2 zwar keine Todesdomäne besitzt, jedoch einen Komplex mit TRAF2 und TRAF5 bilden kann, welches wiederum NF $\kappa$ B aktiviert (Chu 2013).

### 1.3.2 Interleukin 6

Ein weiteres proinflammatorisches Zytokin stellt Interleukin 6 (IL-6) dar. Obwohl IL-6 multifunktionell fungiert, d.h. sowohl pro- als auch antiinflammatorisch ist, überwiegt seine entzündungsfördernde Eigenschaft (Rose-John 2020). IL-6 ist auf dem Chromosomen 7 kodiert (Tanaka et al. 2014) und wird vor allem von myeloiden Zellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen nach der Detektion von Pathogenen durch Toll-like Rezeptoren sezerniert (Kang et al. 2019).

Die IL-6-Konzentration liegt normalerweise bei 1-5 pg/ml, diese kann sich jedoch um das 1000-fache erhöhen, wenn ein infektiöser oder inflammatorischer Zustand vorliegt (Rose-John 2020). So wird sehr schnell ein Alarmsignal im Körper ausgelöst und die Wirtsabwehr kann ihrer Funktion zeitnah nachgehen. Mit der Bindung von IL-6 an seinen Rezeptor, wird der JAK/STAT-Signalweg sowie der MAP-Kinase (MAPK)-Weg aktiviert und daraus resultierend inflammatorische Zytokine vermehrt produziert (Aliyu et al.

2022). Die Expression von IL-6 wird von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 und TNF- $\alpha$  begünstigt und durch Transkriptionsfaktoren wie NF $\kappa$ B stimuliert (Libermann, Baltimore 1990).

Neben ihrer Schlüsselrolle in der Aktivierung und Modulation der Immunantwort, stellt diese auch unter anderem eine zentrale Figur in der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen, Steigerung der Antikörper-Produktion aktiver B-Lymphozyten, Unterstützung der T<sub>H</sub>2-Antwort, Hemmung der Differenzierung von regulatorischen T-Zellen und der Bildung einer Brücke zwischen der angeborenen und erworbenen Immunabwehr dar (Aliyu et al. 2022).

#### **1.4 Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B mit Bezug auf RelA und RelB**

Der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B (im engl.: nuclear factor “kappa-light-chain-enhancer” of activated B-cells) wurde zum ersten Mal im Jahre 1986 beschrieben (Baud, Collares 2016) und ist an der Regulation von einer ganzen Reihe von proinflammatorischen Genen beteiligt, insbesondere von Zytokinen und Chemokinen, welche an der Immunantwort und Entzündungsreaktion involviert sind (Liu et al. 2017). Neben dieser Aufgabe kontrolliert NF $\kappa$ B außerdem den Zellwachstum, -differenzierung und -tod (Wang et al. 2000).

Die Familie des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B besteht aus fünf Proteinen, die in Säugetieren erforscht wurden und sich strukturell ähnlich sind: NF $\kappa$ B-1 (p50), NF $\kappa$ B-2 (p52), RelA (p65), RelB und c-Rel. Diese binden an spezifische DNA-Elemente von Zielgenen und bewirken deren Transkription (Jacque et al. 2005). Normalerweise können NF $\kappa$ B/Rel-Proteine untereinander Hetero- und Homodimere bilden, die in unstimulierten Zellen inaktiv im Zytoplasma vorliegen und an inhibitorische  $\kappa$ B-Proteine wie I $\kappa$ B $\alpha$  gebunden sind (Wang, Baldwin 1998). Damit NF $\kappa$ B in seinen aktiven Zustand gebracht werden kann, muss als aller erstes der inhibitorische Effekt vom I $\kappa$ B $\alpha$  aufgehoben werden. Dabei unterscheidet man zwei Signalwege: den kanonischen und den nicht-kanonischen (Sun 2017).

Der klassische Signalweg wird durch verschiedene Stimuli eingeleitet wie zum Beispiel durch Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-6, TNFR-, T- und B-Zellrezeptoren sowie PRRs, welche

die Aktivierung des sogenannten I $\kappa$ B-Kinase-Komplexes (IKK) anregen, die die Phosphorylierung an den zwei N-terminalen Serinen und die Ubiquitinierung an den I $\kappa$ B-Proteinen durchführen und letztendlich deren Abbau fördern. Dadurch können die NF $\kappa$ B-Proteine, hier vor allem die Dimere p50/RelA und p50/c-Rel, vom Zytoplasma in den Nukleus gelangen und dort ihre Funktion in der Transkription ausüben (Liu et al. 2017). Der klassische Weg wird durch das rasche NF $\kappa$ B-Signal als Antwort auf eine Stresssituation eingeleitet und dient der Regulierung von Inflammation (Baud, Collares 2016). Die posttranslationale Modifikation in Form von Phosphorylierung an Serinresten von RelA wie S529 spielen außerdem eine Schlüsselrolle in der Regulierung von NF $\kappa$ B, die zu der Beeinflussung der Transkriptionsaktivität führen kann (Wang et al. 2000).

Der alternative Signalweg hat im Gegensatz zum klassischen Weg nicht den Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  als Ziel, sondern dient der Freisetzung und Aktivierung von RelB/50- und RelB/p52-Dimeren durch das Verarbeiten von p100, ein Vorläuferprotein des NF $\kappa$ B-2 (Sun 2011). Als Stimuli gelten hier Mitglieder der TNF-Superfamilie wie Lymphotoxin  $\beta$  (LT $\beta$ ), B-Zell-aktivierende Faktor (BAFF) und CD40 Ligand. Durch die Aktivierung der entsprechenden Rezeptoren dieser, kommt es zum Abbau von TRAF3, der dann zur Anregung des NF $\kappa$ B-induzierenden Kinase (NIK) führt. Dies wiederum aktiviert IKK $\alpha$ , der die Phosphorylierung und die Spaltung von p100 herbeiführt. Zuallerletzt können die Dimere RelB/50- und RelB/p52 freigesetzt werden und gelangen somit in den Nukleus und können die Transkription von Zielgenen bewirken (Baud, Collares 2016).

Im Unterschied zu den anderen NF $\kappa$ B-Mitgliedern kann RelB keine Homodimere bilden. Nur durch die Anbindung an p50 oder p52 kann es seine Transkriptionsfunktion ausüben (Derudder et al. 2003). Von großer Bedeutung ist hier die Bindungsaktivität von RelB und seinen Dimeren an die DNA, die durch verschiedene Mechanismen positiv oder negativ reguliert wird und sich somit in der NF $\kappa$ B-responsiven Genexpression äußert (Baud, Collares 2016).

### **1.5 Inflammatorische Caspasen mit Fokus auf Caspase 4**

Caspasen sind eine Gruppe von Enzymen, die zu den Cysteinproteasen gehören. Sie enthalten im aktiven Zentrum Cysteinreste und spalten Proteine hinter dem Aspartat

(Horn 2019). Zu ihren Aufgaben gehört die Regulation von Apoptose und Entzündungen. Kommt es zu einer mangelhaften Caspase-Aktivierung wird die Tumorentstehung begünstigt, wobei bei einer Überaktivierung die Neurodegeneration und Entzündungen gefördert werden (McIlwain et al. 2013). Daneben haben diese nicht-apoptotische Funktionen in Zelldifferenzierung und Proliferation sowie Suppression der Entwicklung von Immunzellen und Aktivierung von NFκB (Lakshmanan, Porter 2007).

Man unterscheidet eine Reihe von humanen Caspasen, die nach ihrer Aufgabe in zwei Subtypen eingeteilt werden: die apoptotischen und inflammatorischen Caspasen. Je nach Vorhandensein oder Fehlen von spezifischen Proteindomänen am N-Terminus der apoptotischen Caspasen, werden diese wiederum in Initiator- (CASP 2, 8, 9, 10) und Effektorcaspasen (CASP 3, 6, 7) eingeteilt (Shalini et al. 2015). Caspasen mit Initiatorfunktion haben längere Prodomänen als Effektorcaspasen und besitzen eine „Caspase recruitment domain“ (CARD) (CASP 2 und 9) oder eine „Death effector domain“ (DED) (CASP 8, 10). Sie befinden sich am Anfang der Caspasen-Kaskade und können durch ihre Interaktionsdomänen an Todessignalkomplexe rekrutiert und durch Dimerisierung (sog. „induced proximity“) aktiviert werden (Kumar 2007). Durch die Dimerisierung kommt es zu einer Konformationsänderung dieser, welches das Zymogen in ein aktives Initiatorcaspasen-Dimer überführt und durch die autoproteolytische Spaltung das finale Heterotetramer bildet (Sohn 2007). Da den Effektorcaspasen die Prodomäne am Amino-Terminus fehlt, wird ihre Spaltung und Aktivierung durch Initiatorcaspasen durchgeführt, die wiederum andere Effektorcaspasen anregen und demzufolge durch den extrinsischen oder intrinsischen Signalweg die Apoptose induzieren (van Opdenbosch, Lamkanfi 2019).

Die Gruppe der inflammatorischen Caspasen sind im Gegensatz zu den apoptotischen Caspasen vorwiegend an der Regulierung von Entzündungsreaktionen beteiligt und sind Vermittler der angeborenen Immunantwort (Martinon, Tschopp 2004). Hierzu zählen die humanen Caspasen 1, 4, 5 und 12, wobei die Caspasen 1, 11, und 12 in Mäusen vorgefunden wurden (Shalini et al. 2015). Hierbei wird der Caspase 1 eine sehr wichtige Position zugesprochen, denn durch ihre Funktion in der Spaltung von IL-1β in seine aktive Form, wurde erstmals auf die Caspasen aufmerksam gemacht (Black et al. 1989). IL-1β ist ein proinflammatorisches Zytokin, das vorwiegend durch Monozyten und

Makrophagen produziert wird und eine wesentliche Rolle in der Entstehung von akuter und chronischer Inflammation spielt. Durch die Spaltung und Aktivierung dieser durch die CASP-1 (oder auch als „interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme“ bezeichnet) wurde ihr die proinflammatorische Eigenschaft zugeschrieben (Khukhlaeva 2022; Martinon et al. 2002). Inflammatorische Caspasen liegen als inaktive Procaspasen vor und werden durch ein Proteinkomplex, den sogenannten Inflammasomen, nach der Stimulation durch PRR aktiviert. Diese wiederum spalten inaktive, proinflammatorische Zytokine in aktive Formen und begünstigen somit die Sekretion dieser und fördern die Inflammation (McIlwain et al. 2013).

Eine weitere entzündungsfördernde Caspase stellt die CASP4 dar. Diese befindet sich auf dem menschlichen Chromosomen 11 inmitten der Caspasen 1 und 12 und stellt mit der Caspase 5 funktionelle Orthologe der Caspase 11 der Maus dar (Imre 2020). Aktiviert wird sie durch die Bindung von LPS an ihre CARD-Domäne (Baker et al. 2015). Der CASP4 wurde eine duale Rolle zugesprochen, da sie vermutlich sowohl in der Apoptose als auch in der Inflammation tätig ist. Sehr lange wurde angenommen, dass die CASP4 apoptotische Funktionen verfügt, da sie an der im endoplasmatischen Retikulum durch den Stress hervorgerufenen Apoptose und beim  $\beta$ -Amyloid-induzierten Zelltod beteiligt ist (Hitomi et al. 2004). Daneben übt sie ihre Funktion im LPS-induzierten TLR4-Signalweg aus, die zu der Aktivierung vom Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B führt und die Upregulation und Sekretion von Zytokinen wie IL-8 begünstigt. Außerdem agiert sie als eine Protease, die in der NF $\kappa$ B-abhängigen Transkription des für IL-1 $\beta$  kodierenden Gens mitwirkt und somit an der Produktion dieser beteiligt ist (Lakshmanan, Porter 2007). Durch ihre Beteiligung am Entzündungsgeschehen im menschlichen Körper wäre die CASP4 ein potenzieller Akteur in der Entstehung der hypervolämischen Inflammation und erlangt dadurch eine gesonderte Stellung in dieser Arbeit.

## 2. Zielstellung

Die Hypervolämie ist ein häufig vorkommendes Phänomen bei chronischen Nierenkranken, welches mit einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität einhergeht. Ein Charakteristikum von hypervolämen Patienten ist die bestehende Dysbalance von Inflammation und Anti-Inflammation. Schon in der vorherigen Studie von Ulrich et al. wurde der erhöhte Zytokinspiegel vom proinflammatorischen IL-6 nachgewiesen (Ulrich et al. 2020), während Daten bezüglich des Tumornekrosefaktors  $\alpha$  weniger gut belegt sind. Dieser ist an zahlreichen Pathways beteiligt und kann neben ihrer inflammatorischen Funktion auch die Apoptose begünstigen. Da die Hypervolämie eine große Stressreaktion für den Körper darstellt, wird angenommen, dass ein weiterer wichtiger Signalweg, der mit am Inflammationsgeschehen involviert ist, aktiviert ist.

Die Intention dieser Dissertationsarbeit ist es, anhand der durchgeführten monozentrischen Pilotstudie, den Einfluss der Hypervolämie bei Hämodialysepatienten auf den Grad der TNF- $\alpha$  und Caspase-4-Aktivierung mittels klassischer Verfahren zu untersuchen und Aussagen über eine mögliche Beteiligung des NF $\kappa$ B-Signalwegs in peripheren mononukleären Zellen anhand Analyse eines verstärkten/verminderten Phosphorylierungsgrades der Rel-Proteine zu treffen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

Die in der klinischen und experimentellen Phase der Studie verwendeten Materialien wie Antikörper, Substanzen, Verbrauchsmaterialien sowie Geräte wurden in den folgenden Tabellen zusammenfassend dargestellt:

##### Monoklonale Antikörper

*Tabelle 1: anti-humane, monoklonale Antikörper, die in der Studie verwendet wurden*

<b>Monoklonale Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
Phospho-NF-κB-p65 (Ser529) AlexaFluor488	BD Biosciences, Heidelberg DE
CD4 APC-eFluor780	Thermo Fisher Scientific, Frankfurt, DE
Phospho-Stat3 (Tyr705) Brilliant Violett 421	Biolegend, San Diego, USA
CD3 APC-Vio 770	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE
CD3FITC	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE
CD3VB, REAfinity	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE
CD4 FITC, REAfinity	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE
CD8 PE	BD Bioscience, Heidelberg, DE
CD14 PeCy7	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE
CD14 FITC, REAfinity	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE
CD14 PerCP, REAlease	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE
CD15 eF450	eBioscience, Frankfurt, DE
CD25 PeCy7	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE
CD45 APCVio770, REAfinity	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE
CD 127 APC	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE
IL-10 APC, REAfinity	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE
Phospho-Stat3 (Ser727) PE	Biolegend, San Diego, USA
CD86 Pe-Cy5.5	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE

Phospho-RelB (Ser552) APC	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE
TNF- $\alpha$ PE, REAfinity	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE

## Substanzen & Kits

*Tabelle 2: Liste der verwendeten Substanzen und Kits*

<b>Substanzen</b>	<b>Hersteller</b>
7-AAD Viability Staining Solution	eBioscience, Frankfurt, DE
Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor-Antagonist (AhR-A)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
BD FACS-Lysing Solution	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG., Karlsruhe, DE
Caspase 4 Inhibitor	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Caspase 8 Inhibitor	Invivogen, San Diego, USA
Ethanol (100%)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roche, Basel, CHE
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin, DE
Humanserum Albumin (HSA)	CSL Behring GmbH, Marburg, DE
Indoxylsulfat (IS)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
L-Glutamin	PAA GE Healthcare, Freiburg, DE
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Monensin	Biolegend, San Diego, USA
Natriumazid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Pancoll human (1,077g/ml)	Pan Biotech, Aidenbach, DE
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH & Co. KG., Karlsruhe, DE
PhosFlow Perm Buffer	BD Biosciences, Heidelberg DE
RIPA-Lysepuffer	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, DE
RPMI ohne L-Glutamin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Saponin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE

Viability Dye 405/450	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE
<b>Kits</b>	<b>Hersteller</b>
20x Taqman Gene Expression Assay	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE
Caspase1-Glo Kit	Promega, Walldorf, DE
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Life technologies, Darmstadt, DE
Human TNF- $\alpha$ (Total) ELISA Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE
Human TNF- $\alpha$ High Sensitivity ELISA Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE
qPCRBIO Probe Mix High-ROX	Nippon Genetic Europe, Düren, DE
Quick RNA MiniPrep Kit	Zymo Research, Freiburg, DE

### Ansätze von Puffer und Medien

*Tabelle 3: Verwendete Puffer und Medien und ihre Zusammensetzung*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
FACS-Puffer	1 Liter PBS 7ml 10% Natriumazid 1g BSA (Bovines Serumalbumin)
Kryomedium	700 $\mu$ l RPMI-Medium 200 $\mu$ l FBS 100 $\mu$ l DMSO
PBS + 2mM EDTA	4ml 0,5M EDTA-Lösung 1 Liter PBS
1% PFA	12,5ml PFA (4%) 37,5ml FACS-Puffer
4% PFA	8g Paraformaldehyd 200ml PBS
RPMI-Medium	Für 500ml Ansatz: 370ml RPMI mit inbegriffen: 5ml 1% Glutamin

	+ 5ml 1% Penicillin/Streptomycin 20ml FBS (Fetal Bovine Serum) 100ml 20% HSA (Humanserum-Albumin)
1% Saponin	2ml Saponin (5%) 100ml FACS-Puffer
5% Saponin	2g Saponin 39,72ml PBS 0,28ml Natriumazid (10%)

### Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Die während der Studie verwendeten Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Microplate, PS, 96-well, F-Bottom (Chimney)	Greiner AG, Kremsmünster, AUT
FACS-Röhrchen	Greiner AG, Kremsmünster, AUT
Gestopfte Pipettenspitzen in div. Größen	Ilona Schubert, Leipzig, DE
Handschuhe. Ultra Vinyl, Größe: S	BSN medical GmbH, Hamburg, DE
Leucosept-Röhrchen	Greiner AG, Kremsmünster, AUT
Monovetten – 9ml EDTA, 2,7ml Serum	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Multi-Adapter	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Multipipette (Gilson)	Ilona Schubert, Leipzig, DE
Pasteurpipetten (Glas)	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
PCR-Mikrotestplatten, 96 wells	Ilona Schubert, Leipzig, DE
PCR-Tubes	Ilona Schubert, Leipzig, DE
Pipettenspitzen 0,5-20µl	Ilona Schubert, Leipzig, DE
Pipettenspitzen 1-100µl	Ilona Schubert, Leipzig, DE
Pipettenspitzen 1-200µl	Ilona Schubert, Leipzig, DE
Pipettenspitzen 1-5ml Makro	Ilona Schubert, Leipzig, DE
Pipettenspitzen 100-1000µl	Ilona Schubert, Leipzig, DE

Reaktionsgefäße mit Deckel 0,5ml; 1,5ml; 2ml	Ilona Schubert, Leipzig, DE
Serologische Einmalpipetten; 5ml, 10ml, 25ml	Greiner AG, Kremsmünster, AUT
Spin-Away-Filter	Zymo Research, Freiburg, DE
Tempus Blut-RNA-Röhrchen	Greiner AG, Kremsmünster, AUT
Thermal Sealing Film for PCR Plates	VWR International, Radnor, USA
TruCount Tubes	BD Biosciences, Heidelberg DE
Zentrifugenröhrchen 15ml, 50ml	Ilona Schubert, Leipzig, DE
ZymoSpin-Column	Zymo Research, Freiburg, DE

## Geräte

*Tabelle 5: Im Rahmen der Studie benutzte Geräte*

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Brutschrank (NU-5510)	NuAire, Inc., Plymouth, USA
Bioimpedanzgerät Nutriguard-MS	Data Input GmbH, Pöcking, DE
Dialysegerät DBB-Exa zur Durchführung der bioelektrischen Messung	Nikkiso Europe GmbH, Langenhagen, DE
Fast Gene Plate Centrifuge	Nippon Genetics, Düren, DE
MACSQuant TM Analyzer	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE
Micro Centrifuge (FastGene High Speed)	Nippon Genetics, Düren, DE
Microcentrifuge (Gerätetyp: Unifuge)	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
MiniAMP Thermal Cycler	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, DE
Real Time PCR Step One Plus	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
Schulwaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen, DE
Schüttler	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE
Sicherheitswerkbank Labgard Klasse II, Laminar Flow	NuAire, Inc., Plymouth, USA
Tecan Infinite M200 Pro Nanoquant	Tecan Group AG, Männedorf, CHE

Universal 320 Zentrifuge (1401)	Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen, DE
Vakuum-Sicherheits-Abzugssystem	HLC Bio Tech, Gerbershausen, DE
Vortexer	VWR International, Radnor, USA
Zentrifuge (Gerätetyp: Rotina 380R)	Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen, DE
Zentrifuge (Typ: MIKRO220R)	Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen, DE

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Studiendesign

Diese monozentrische Pilotstudie wurde innerhalb des ambulanten Patientenkollektivs des Kuratoriums für Dialyse und Nierentransplantation e.V. (kurz KfH) am Universitätsklinikum der Martin-Luther-Universität in Halle (Saale) durchgeführt.

In die durchgeführte Studie wurden 40 Hämodialysepatienten des KfH-Nierenzentrums eingeschlossen. Dabei mussten verschiedene Kriterien beachtet und eingehalten werden, um die Verfälschung der Ergebnisse und somit der Studie zu vermeiden.

Aufgenommen in die Studie wurden Probanden, die

- > 18 Jahre alt waren,
- an terminaler Niereninsuffizienz seit mindestens 3 Monaten litten,
- eine Ultrafiltrationsrate (UF) an der HD von  $\geq 2000$ ml aufwiesen.

Ausgeschlossen wurden Probanden bei

- fehlender Einwilligung /mangelnde Kooperationsbereitschaft
- Vorliegen eines bekannten bösartigen Tumorleiden
- einer akuten Infektion (CRP > 50mg/l, Fieber, Schüttelfrost)
- psychiatrischen oder neurologischen Erkrankungen, die die Einwilligungsfähigkeit beeinträchtigten
- Bestehen einer Schwangerschaft oder fehlende Kontrazeption (prämenopausale Frauen).

Von den ursprünglich 46 in die Studie eingeschlossenen Hämodialysepatienten, wurde ein Patient aufgrund einer akuten Infektion ausgeschlossen, drei Patienten erreichten das erforderliche UF-Volumen von 2000ml nicht, ein Patient wurde in ein anderes

Dialysezentrum verlegt und ein Patient widerrief seine Einwilligung, sodass letztendlich mit 40 Patienten berücksichtigt wurden.

### 3.2.2 Studienablauf

Der Ablauf der Studie wurde in die drei Phasen eingeteilt: die klinische, experimentelle und statistische Phase.

#### 3.2.2.1 Klinische Phase

Zuerst wurden mit Hilfe des Studienteams der KIM2 die Studienunterlagen erstellt, welche von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität geprüft wurden. In dieser sind Studieninhalt und -ablauf, Teilnahmebedingungen und datenschutzrechtliche Informationen beinhaltet. Außerdem wurden ein Dokumentationsbogen und eine potenzielle Patientenliste mit den für die Studie in Frage kommenden Patienten erstellt. Diese wurden aufgrund der unterschiedlichen Dialysezeiten in die drei Gruppen „Montag früh“, „Montag spät“ und „Dienstag früh“ eingeteilt. Nach dem positiven Votum der Ethikkommission erfolgte die Rekrutierung der Probanden.

Die sich in der Liste befindenden Patienten wurden zuallererst mündlich über den Inhalt und das Vorgehen der Studie sowie den Inhalt des Aufklärungsbogens informiert und einer ausführlichen Anamnese unterzogen. Jegliche Fragen seitens der Patienten über die Studie wurden beantwortet.

Nach Erhalt der unterschriebenen Einwilligungserklärungen wurden die Tage für die zu stattfindenden Bioimpedanz-Messungen geplant. Diese sollten nach der Dialysebehandlung der letzten Wochendialyse in den unterschiedlichen Gruppen stattfinden (Tab. 6).

Tabelle 6: Dialysetage (X) der Probanden in ihren eingeteilten Gruppen; X: Bioimpedanz-Messung; X: Blutabnahme, -: dialysefreie Tage

Gruppen \ Dialysetage	Mo	Di	Mi	Do	Fr	Sa	So
Mo-Frühsschicht	X	-	X	-	X	-	-
Mo-Spätschicht	X	-	X	-	X	-	-
Di-Frühsschicht	-	X	-	X	-	X	-

Bei der Bioelektrischen Impedanz-Analyse (kurz BIA) handelt es sich um eine Methode, bei der neben Fett- und Muskelmasse, auch die intra- und extrazelluläre Flüssigkeit und somit das Gesamtkörperwasser erfasst wird. Hierfür wurden zwei Elektroden den Probanden auf Hand und Fuß der gleichen Seite geklebt. Ein schwacher, vom Probanden nicht spürbarer Strom, wurde über ein Bioimpedanzgerät bei einer Frequenz von 50kHz von der Hand bis zum Fuß der untersuchten Seite geleitet und somit der Zellwiderstand und die Kondensatorfunktion der Körperzellen gemessen. Für die Einteilung des Hydratationszustandes der Probanden wurde das Vektorgramm (Piccoli 2014) herangezogen. Man spricht von einer Überwässerung (Hypervolämie, H), wenn sich der Vektor nicht innerhalb der 75. Perzentile des Flüssigkeitsquadranten befindet. Im Gegensatz zu dieser liegt bei den „Normovolämen“ (N) der Vektor innerhalb der 75. Perzentile.

Nach der Kategorisierung wurde den für die Woche eingeplanten Probanden einmalig 25,9ml Blut aus dem Dialysezugang seitens des Pflegepersonals entnommen. Hierfür wurde eine Serum-Monovette und ein Tempus Tube sowie zwei EDTA-Monovetten an den festgelegten Blutentnahme-Tagen zur Verfügung gestellt.

Auf dem Dokumentationsbogen wurden neben Geschlecht und Größe auch das Gewicht vor und nach der Dialyse notiert. Die Gründe für die terminale Niereninsuffizienz, die sich u.a. aus Glomerulonephritis (17,5%), diabetische Nephropathie (25%), interstitielle Nephritis (2,5%), ischämische Nephropathie (17,5%) und anderen Erkrankungen (37,5%) zusammensetzt, der Dialysebeginn, die Medikamentenliste (Antihypertensiva (Minoxidil), Diuretika, Insulin und Phosphat-Hemmer) sowie Dialyseparameter wie

Ultrafiltrationsrate (ml/h), systolischer und diastolischer Blutdruck (mmHg), Puls (bpm), Kt/V und Rezirkulation (%) wurden aus den Patientenakten des KfHs entnommen.

Festgehalten wurden außerdem Parameter aus Routine-Blutabnahmen, welche im Zentrallabor im UMH bestimmt wurden. Dazu zählen Albumin, CRP, Kreatinin, Hämoglobin und die Blutfettwerte LDL, HDL, VLDL, Triglyceride und Gesamtcholesterin. Des Weiteren wurde auch eine durchgemachte Corona-Infektion erfragt und notiert.

### 3.2.2.2 Experimentelle Phase

#### **Isolation von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC)**

Für die Isolation von PBMCs eines Probanden wurden zwei beschriftete EDTA-Monovetten a' 9ml verwendet. Das Blut wurde vor Beginn der ersten Wochendialyse seitens des Pflegepersonals aus dem Dialysezugang entnommen.

Im Labor der KIM2 wurde das frisch entnommene Vollblut unterhalb steriler Bedingungen einem Standardprotokoll der Dichtezentrifugation unterzogen.

Zuallererst wurden zwei Leucosept-Röhrchen mit jeweils 15ml Pancoll human-Lösung (1,077g/ml, PanTech) befüllt und bei 1000g für eine Minute zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde das antikoagulierte Blut aus den beiden Monovetten nach kurzem Invertieren in zwei 50ml Falcon-Röhrchen je mit 8 ml Blut aufgeteilt und mit jeweils 20ml PBS/2mM EDTA verdünnt. Nach der Entnahme der Leucosept-Röhrchen aus der Zentrifuge wurde das gesamte Blut-PBS-Gemisch jeweils in diese überführt und für 18min bei 18°C und 1000g ohne Bremse zentrifugiert. Bei der Überführung musste darauf geachtet werden, dass sich die beiden Phasen Pancoll/PBS-Blut nicht vermischen. Währenddessen wurden in ein FACS-Röhrchen 385,5µl FACS-Puffer und die Antikörpermischung (0,5µl CD3 FITC, 2µl CD15 eF450, 1µl CD14 Pcy7 und 1µl 7-AAD) vorbereitet und kühlgestellt.

Die nach der Zentrifugation in den beiden Leucosept-Röhrchen vorliegenden „PBMC-Ringe“, bestehend aus Lymphozyten und Monozyten, wurden vorsichtig in ein frisches Falcon-Röhrchen überführt, mit PBS/2mM EDTA auf 50ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert (bei 300g mit Bremse und 8°C für 10min).

Dieser Waschschrift wurde für zwei weitere Male wiederholt, wobei der letzte Waschvorgang bei 200g mit Bremse durchgeführt wurde.

Nachfolgend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1ml RPMI-Medium (4%FBS/HSA) aufgenommen. 10µl der Zellsuspension wurde dem FACS-Röhrchen mit der Antikörpermixtur und FACS-Puffer hinzugefügt und nochmals für 5min bei 4°C kühlgestellt. Im Anschluss daran wurde das FACS-Röhrchen an dem MACSQuant Analyzer 10 bereitgestellt, um die Zellzahl zu messen und die Qualität der PBMCs zu bestimmen.

Der MACSQuant 10 Analyzer ist eine von dem Biotechnologie- und Biomedizin-Unternehmen Miltenyi Biotec entwickelte Apparatur, welche Forschern auf der ganzen Welt vielfältige Anwendungen der Durchflusszytometrie ermöglicht.

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um eine Methode, bei der verschiedene Zellen und Partikel, welche sich in einem gepufferten Medium befinden, durch die Verwendung von Laser charakterisiert und sortiert werden können.

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht darauf, dass die zu analysierende Probe mit den zu untersuchenden Zellen laminar durch eine Messkammer transportiert werden. Die Zellen (auch als „Events“ bezeichnet) werden durch kohärentes Laserlicht an dem sogenannten „Interrogation point“ angestrahlt. Dabei entsteht bedingt durch die Irregularität der inneren und äußeren Struktur des Events in alle Richtungen Streulicht. Die Intensität des Streulichts gibt Auskunft über die Größe und Granularität des Events. Das von den Events gestreute Licht wird von zwei unterschiedlichen Detektoren gemessen: Die Streuung, die entlang des Laserstrahls erfasst wird, wird von dem Vorwärtsstreuendetektor (im engl.: „Forward Scatter“, FSC) quantifiziert. Der Seitenstreuendetektor (im engl.: „Side Scatter“, SSC) misst die Streuung im 90° Winkel zum Laserstrahl. Die FSC-Intensität ist direkt proportional zum Durchmesser des Events. Somit können die einzelnen Zellen nach ihrer Größe unterschieden werden. Das vom SSC aufgenommene, stark gebeugte Licht gibt Auskunft über die Granularität der Zellen. Trifft das emittierte Licht auf die Detektoren, baut sich an diesen eine elektrische Spannung auf. Events mit kleinem Durchmesser und wenig Granularität erzeugen einen kleinen elektrischen Impuls und vice versa. In einer Datenbank werden für jedes Event die elektrischen Impulse aufgezeichnet und gespeichert.

Im Gegensatz zur einfachen Durchflusszytometrie können die Events mittels eines Färbeprotokolls mit bestimmten fluoreszenzmarkierten Antikörpern sog.

„Fluorochrome“ beladen werden. Wenn das Laserlicht auf das Event mit Fluorochrome trifft, werden die Elektronen in ihrem Energiezustand auf ein höheres Niveau gehoben. Das Licht, welches frei wird, wird durch das Zurückfallen der angeregten Elektronen in ihre Ausgangszustände erzeugt. Dies wird von einer Vielzahl von Fluoreszenzdetektoren gemessen, wobei jeder Detektor nur ein einziges „Farbstoff“ quantifiziert. Die an den Detektoren erzeugte Lichtintensität entspricht der Menge der Fluorochrom-Moleküle auf den Events. Je mehr von diesen vorliegen, desto höher ist das Signal an den Detektoren. Im Gegensatz dazu, unterliegen Events, die nicht angefärbt wurden, einer Autofluoreszenz.

In der durchgeführten Studie wurden die T-Lymphozyten mittels CD3 FITC, die Granulozyten mit CD15 eF450 und die Monozyten mit CD14 Pcy7 angefärbt. Um die nekrotischen Zellen darzustellen, wurde 7-AAD zur Antikörpermischung hinzugefügt.

Die Visualisierung der aufgenommenen Signale kann mittels eines Histogramms oder Punktdiagramms (im engl.: „Dotplot“) erfolgen. In der durchgeführten Studie wurde am MACSQuant das Dotplot bevorzugt. Hierbei werden zwei optische Parameter in einer Grafik zusammengefasst. Je nach Intensität des Signals positionieren sich die Events als „Dot“ in der Abbildung. Events mit ähnlichen Intensitäten häufen sich in Clustern an und können somit bestimmte Zellpopulationen darstellen z.B. PBMCs und Granulozyten. Ungefärbte Events wie z.B. nekrotische Zellen ordnen sich in der Grafik links unten an. Um die Gesamtmenge und die Qualität des zu untersuchenden Events messen zu können, werden im Dotplot sog. „Gates“ angelegt. Somit konnten in der durchgeführten Studie nekrotische und ungewollte Zellen wie Granulozyten ausgeschlossen werden. Die Zahl und Vitalität der PBMCs konnten somit gezielt bestimmt werden (Abb. 1).

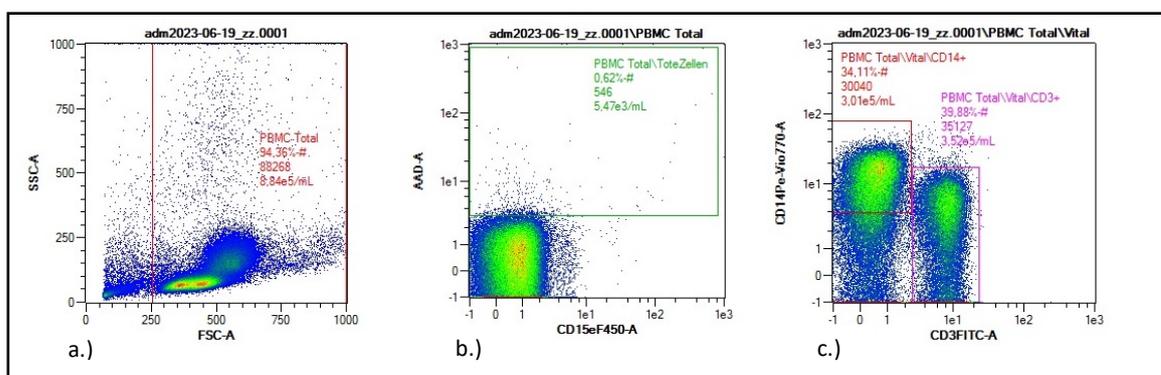


Abbildung 1: Gatingmethode am Beispiel der PBMCs; a.) PBMCs in Total im FSC/SSC Dotplot, Abgrenzung zu den Granulozyten; b.) Vitalitätsmessung der PBMCs anhand der Färbung mit 7-AAD; c.) Verhältnis der CD3/CD14 Expression in PBMCs

Die angegebene PBMC-Zahl, die durch den MACSQuant 10 Analyzer gemessen wurde, musste seitens der Autorin mit vierzig multipliziert werden, da eine Verdünnung von 1:40 vorlag. Somit konnte die endgültige Zellzahl für einen Milliliter festgelegt werden.

### **Die phänotypische Charakterisierung der T-Zellen mittels TruCount-Bead-Analyse**

Um eine Aussage darüber zu geben, ob eine Erhöhung von bestimmten Lymphozyten bei Hypervolämie vorliegt, wurden mittels der TruCount-Bead-Analyse durchflusszytometrisch T-Zell-Klassen untersucht. Mit Hilfe von Oberflächenmarkern konnte damit die absolute Anzahl von CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten, zytotoxischen T-Zellen (CD8<sup>+</sup>) und T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>) ermittelt werden. Bei der Messung wurden auch die regulatorischen T-Zellen (CD25, CD127) und Monozyten (CD14) mit betrachtet.

Zu Beginn wurden aus den restlichen 2ml Vollblut in den EDTA-Röhrchen für einen Probanden unter sterilen Bedingungen 50µl Blut entnommen und mittels Reverse-Pipetting-Technik in ein TruCount-Tube gegeben. Vorher wurde in einem sterilen Eppendorf Tube für die Anfärbung der Zellen eine Antikörpermixtur vorbereitet. Hierfür wurden 5µl von CD45 APC-Vio770 und CD8 PE, 2µl von CD4 FITC, CD25 PE-Cy7 und CD127 APC, 1µl von CD14 PerCP sowie 0,5µl von CD3 VB appliziert. Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren der Antikörpermixtur wurde dieser komplett auf das sich im TruCount Tube befindliche Vollblut pipettiert und für 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Hiernach wurden 450µl von der FACS-Lysing- Solution in das TruCount Tube gegeben und für weitere 15 Minuten inkubiert. Dies ist notwendig, um die Lyse der Erythrozyten zu ermöglichen. Ist die Flüssigkeit nicht durchscheinend klar gewesen, musste die Inkubation verlängert werden.

Anschließend fand an dem MACSQuant 10 Analyzer die durchflusszytometrische Untersuchung der Probe statt (Abb. 2).

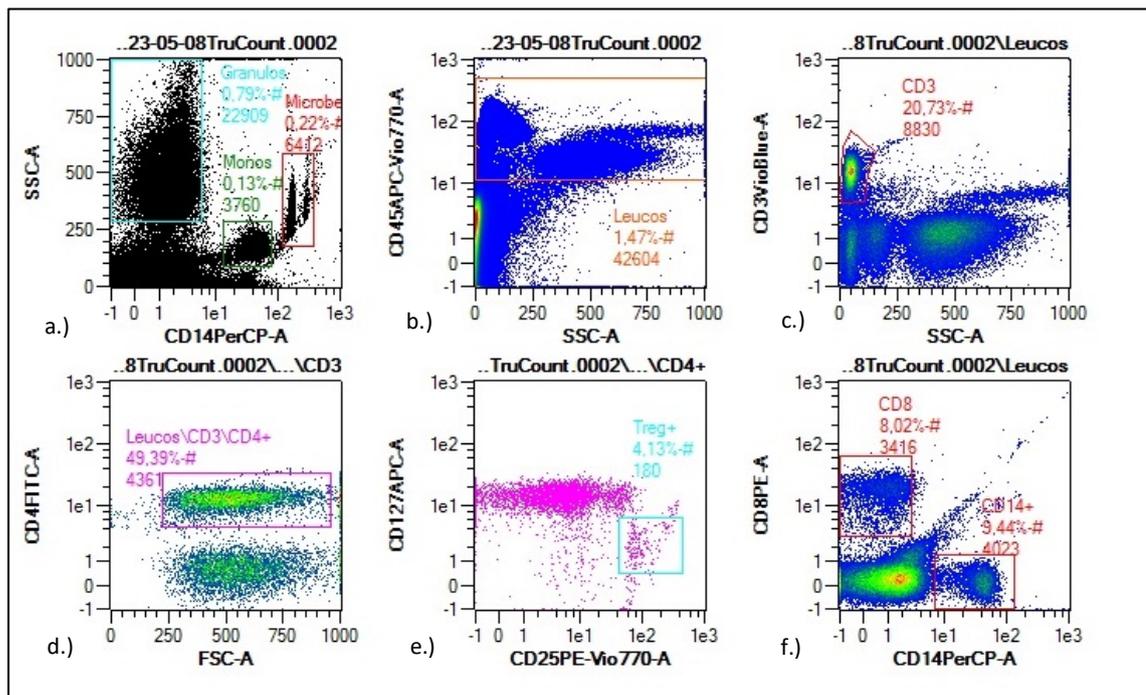


Abbildung 2: Durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Klassen und Monozyten; a.) Granulozyten und CD14<sup>+</sup>-Monozyten, b.) CD45-Leukozyten; c.) CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten; d.) CD4-positive T-Zellen; e.) regulatorische T-Zellen; f.) CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und CD14<sup>+</sup>- Monozyten

### Isolation von RNA aus peripheren mononukleären Blutzellen

Nach der Isolation der PBMCs musste zuallererst eine Rechnung zur Ermittlung der Menge an Flüssigkeit durchgeführt werden, in der sich die für das Experiment benötigte Menge an PBMCs befindet. Somit wurden je  $1 \times 10^6$  PBMCs in einem Gesamtvolumen von 500  $\mu$ l RPMI-Medium (4%FBS/HSA) aufgenommen. In je drei sterile FACS-Röhrchen wurde das RPMI-Medium vorgelegt und die jeweilige Menge an PBMCs dazupipettiert. Hierbei wurde ein Röhrchen mit 1  $\mu$ l LPS (10  $\mu$ g/ml) und ein Röhrchen mit 1  $\mu$ l LPS und 2  $\mu$ l AhR-Antagonist (AhR-A, 2mg/ml) stimuliert. Das dritte Röhrchen stellte die interne Kontrolle dar und blieb unstimuliert. Nach kurzem Vortexen der drei FACS-Röhrchen wurden diese zur Inkubation für vier Stunden im Brutschrank gelagert.

Nach der Inkubationszeit wurden die Röhrchen dem Brutschrank entnommen und bei 450g für fünf Minuten zentrifugiert. Demzufolge wurde der sich nun gebildete Überstand mittels der Pasteurpipette abgesaugt und das verbliebene Zellpellet in 300  $\mu$ l RNA-Lysepuffer resuspendiert. Je nach Zeitmanagement konnte man diese entweder für die sofortige Weiterverarbeitung zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubieren lassen

oder den Inhalt der drei Röhrchen in sterile 1,5ml Eppendorf Tubes überführen und wegfrieren, um an einem späteren Zeitpunkt die Isolation durchführen zu können.

Die eigentliche Isolation der RNA wurde mittels des Quick-RNA Miniprep Kits von Zymo durchgeführt. Hierfür wurden zuvor die eingefrorenen Proben zum Auftauen aus dem Gefrierschrank entnommen, die Arbeitsfläche mit Alkohol desinfiziert und Pipettenspitzen mit Filter bereitgelegt. In der Zwischenzeit wurde außerdem die DNase I (250U) angesetzt.

Vorerst wurden die aufgetauten Proben nach kurzem Vortexen bei 12000g für eine Minute zentrifugiert. Währenddessen wurden in Collection-Tubes gelbe Spin-Away-Filter und grüne Zymo-Spin IIICG Column platziert. Anschließend wurden die Proben auf die Spin-Away-Filter überführt und nochmals für eine Minute der Zentrifugation (12000g) ausgesetzt. Die Durchflüsse wurden hiernach in den Collection-Tubes aufgehoben, die Filter verworfen und je 300µl Ethanol (95-100%) hinzupipettiert. Der Mix wurde auf die jeweilige Zymo-Spin IIICG Column gegeben, für weitere 30 Sekunden zentrifugiert und die Überstände wieder verworfen. 400µl RNA-Wash-Buffer wurde in die Column pipettiert und nochmals für 30 Sekunden bei 12000g zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Durchflusses wurde in jedes Column 80µl der Mischung aus DNase I und DNA-Digestion-Buffer gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Somit konnten die noch erhaltenen DNA-Fragmente effizient abgebaut werden. Nachfolgend wurde 400µl RNA-Prep-Buffer der Mischung hinzupipettiert und für weitere 30 Sekunden der Zentrifugation ausgesetzt. Anschließend schlossen sich zwei Waschschriffe mit RNA-Wash-Buffer an, wobei nach dem ersten Waschriff für 30 Sekunden und nach dem zweiten 2 Minuten bei 12000g zentrifugiert und die Durchflüsse aus dem Column verworfen wurden. Daraufhin wurden die Column in Rnase-free-Tubes gestellt und auf die Membran 50µl RNase-freies Wasser gegeben. Abschließend wurde ein letzter Zentrifugationsschritt für 30 Sekunden (12000g) durchgeführt und die Column verworfen. Entweder konnten die entstandenen RNA-Lösungen auf Eis gestellt gleich gemessen werden oder bei -70°C gelagert werden, um die anstehende Messung zu einem späteren Zeitpunkt durchführen zu können.

### Messung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentrationsmessung erfolgte anhand des Infinite 200 Pro-Plattenreaders, der NanoQuant Platte und der „i-control“ Software der Firma Tecan (Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz). Mittels dieser können Analysen von kleinvolumigen Nukleinsäuren wie DNA und RNA ermittelt und die Reinheit der Proben bestimmt werden (Tecan 2024). Die Messung der vorliegenden RNA-Proben werden mittels Absorptionsspektrometrie durchgeführt, wobei sich das Absorptionsmaximum der RNA bei 260nm und die von Proteinen bei 280nm befindet. Aus diesen wird der Quotient gebildet. Liegt ein Quotient von 1,8-2,0 vor, kann von einer sauber extrahierten RNA-Probe ausgegangen werden. Liegt dieser jedoch unter 1,8, dann deutet dies auf eine Verunreinigung hin, die während der Isolation nicht vollständig entfernt werden konnte (Hauk 2013).

Zuallererst wurden die Pipettierfelder der NanoQuant Platte gesäubert, um eine Kreuzkontamination zu verhindern. Daraufhin wurden 2µl vom RNase-freiem Wasser auf die Felder pipettiert und die Platte für das „Blanking“ in den Infinite 200 Pro-Plattenreader eingeführt. Nach Entfernung der Platte aus dem Reader wurden die Felder wieder gereinigt, 2µl der zu messenden RNA-Proben als Doppelmessung auf die diese aufgetragen und zum Messen in den Reader eingeschoben. Nach der Konzentrationsbestimmung wurde die Platte nochmals gesäubert und die RNA-Proben zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **Die cDNA-Herstellung**

Die schon zuvor isolierte und gemessene RNA wurde in diesem Versuch in die cDNA umgewandelt. Hierfür wurden 100ng RNA mittels der High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit umgeschrieben.

Zuerst wurde auf einer desinfizierten Arbeitsfläche der Mastermix mit den sich im Kit vorhandenen Komponenten 10xRT Buffer, 10xRT Random Primer, 25xdNTP Mix (100mM), MultiScribe Reverse Transcriptase (50U/µl) und DNA/RNA-freies Wasser hergestellt. In 0,2ml PCR Tubes wurde die zuvor berechnete und erforderliche Menge an Nuclease-freies Wasser und RNA so hineinpipettiert, sodass eine Gesamt-RNA-

Menge von 10µl vorlag. Ebenso wurden von dem soeben hergestellten Mix 10µl hinzugefügt, wodurch die für eine Probe benötigte Gesamtmenge von 20µl erreicht wurde. Hiernach wurden die PCR Tubes verschlossen und kurz an zentrifugiert. Für die anstehende Inkubation wurde der MiniAMP™ Thermocycler verwendet. Die PCR-Tubes wurden eingesetzt und zuerst für 10 Minuten bei 25°C, dann 120 Minuten bei 37°C und zuletzt für fünf Minuten bei 85°C inkubiert. Die Proben wurden nach Ablauf der Zeit auf 4°C heruntergekühlt und konnten entweder sofort weiterverarbeitet oder für die spätere Verarbeitung bei -20°C gelagert werden.

### **Die Real-Time Quantitative PCR**

Die quantitative Real-Time PCR (RT-PCR oder auch qPCR) ist eine einfache und effiziente Genanalysetechnik, die der Amplifikation von Nukleinsäuren dient. Das Verfahren beruht auf der herkömmlichen PCR-Technik, wobei hier die Vervielfältigung der DNA-Sequenz in Echtzeit beobachtet werden kann.

Die herkömmliche Polymerase-Kettenreaktion wurde zum ersten Mal im Jahre 1985 von Mullis und seinen Kollegen vorgestellt. Diese läuft in den drei Hauptphasen Denaturierung, Hybridisierung/Annealing und Elongation/Amplifikation ab. Zuerst wird in der Denaturierungsphase die doppelsträngige cDNA/DNA bei 95°C erhitzt, sodass sich die zwischen den komplementären Basenpaaren vorhandenen Wasserstoffbrücken auflösen. Demzufolge wird die Temperatur entsprechend der verwendeten Primer soweit herabgesetzt, dass sich diese an ihre jeweiligen komplementären Bereiche der einzelsträngigen DNA binden können. Meist handelt es sich hier um eine Temperatur zwischen 55°C und 65°C. Von diesen aus synthetisiert die hitzestabile DNA-Polymerase zwischen 75°C und 80°C die komplementären Stränge, indem sie diese mit freien Nukleotiden auffüllt. So entstehen nun aus einer doppelsträngigen DNA vier PCR-Produkte, die der Ausgangs-DNA identisch sind. Dieser Prozess wird ungefähr in 30 bis 40 Zyklen gleichermaßen fortgeführt bis die Kapazität des Reagenzes aufgebraucht ist (Khehra et al. 2024).

Das Konzept des Real-Time PCRs unterscheidet sich von der herkömmlichen PCR dadurch, dass sie neben der Amplifikation der DNA auch die Quantifizierung der gewonnenen DNA gewährt. Somit ist es möglich, die PCR-Amplifikation in Echtzeit zu

messen und die Ausgangskonzentration der Nukleinsäure zu bestimmen. Dagegen basiert die herkömmliche PCR auf der Endpunktdetektion, welche die Bestimmung der Ausgangskonzentration der zu messenden Nukleinsäure unmöglich macht. Bei der Real-Time PCR werden für die Quantifizierung fluorogene Marker verwendet, bei der sie durch sensible Methoden aufgrund ihrer Emission nachgewiesen werden können. Dies kann entweder mittels DNA-Farbstoffe oder durch die sogenannten FRET-Sonden durchgeführt werden (Thermo Fisher Scientific 2018; Mackay et al. 2002).

Die FRET-Sonden beruhen auf dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers. Hierbei handelt es sich um einen physikalischen Prozess, bei dem Energie durch die Anregung eines molekularen Donor-Fluorophors (Reporter) durch eine Lichtquelle auf ein anderes sich in ausreichender Nähe befindenden Fluorophors (Akzeptor) übertragen wird (Seker, Babu 2003). Eine Möglichkeit der Nutzung des FRET besteht in der Anwendung von Sonden-Systemen. Hierzu gehören die Taqman-Sonden, die so konzipiert sind, dass sie am 3'-Ende einen nicht fluoreszierenden Quencher und am 5'-Ende einen Reporterfarbstoff tragen. Die Taq-DNA-Polymerase, die verwendet wird, besitzt neben ihrer Polymerasefunktion zusätzlich eine 5' Exonuklease-Aktivität. Die Sonde bindet zwischen den Primerstellen an ihre Target-Sequenz und wird durch die Taq-DNA-Polymerase bei der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abgebaut. Dadurch wird der Reporter vom Quencher unter Energieabgabe getrennt und eine steigende Reporter-Fluoreszenz wird gemessen. Mit jedem Zyklus werden mehrere Reporter-Fluorophore freigesetzt, welche zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität führen, der proportional zur Menge des produzierten Amplikons ist. Verglichen mit den DNA-Farbstoffen ist die Methode mit den Taqman-Sonden spezifischer und weniger falsch positive Signale werden erzeugt (Thermo Fischer Scientific).

In dem durchgeführten Versuch wurden die mRNA-Expressionen von TNF- $\alpha$  (Hs01113624\_m1), TNFRSF1a (Hs01042313\_m1), TNFRSF1b (Hs00961749\_m1), IL-6 (Hs00985639\_m1) und RPL37A (Hs01102345\_m1) anhand von Taqman-Sonden (Thermo Fisher Scientific) kombiniert mit qPCRBIO Probe Mix High-ROX (Nippon Genetic Europe, Düren, Deutschland) untersucht. Zuerst wurden an einem desinfizierten Arbeitsplatz die eingefrorenen cDNA-Proben aufgetaut und die Mastermixe mit den

jeweiligen FRET-Sonden hergestellt. Auf eine 96-well PCR-Platte wurde 1µl von der cDNA und jeweils 9µl der Mastermixe pipettiert und mittels eines Thermal Sealing Films verschlossen. Dabei wurden die Proben doppelt aufgetragen und eine negative und interne Kontrolle mitgeführt. Bezogen wurden die Daten auf die RNA gesunder Kontrollspender. Die Platte wurde mit Hilfe einer Plattenzentrifuge zentrifugiert und anschließend mittels des Step one Plus Cylers (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Die Real-Time PCR läuft im Schnellmodus ab und passiert die drei Stufen der initialen Aktivierung (10 Minuten bei 95°C), die Denaturierung (10 Sekunden bei 95°C) und das Annealing/Extending (30 Sekunden bei 60°C). In 40 Zyklen wird der beschriebene Prozess wiederholt.

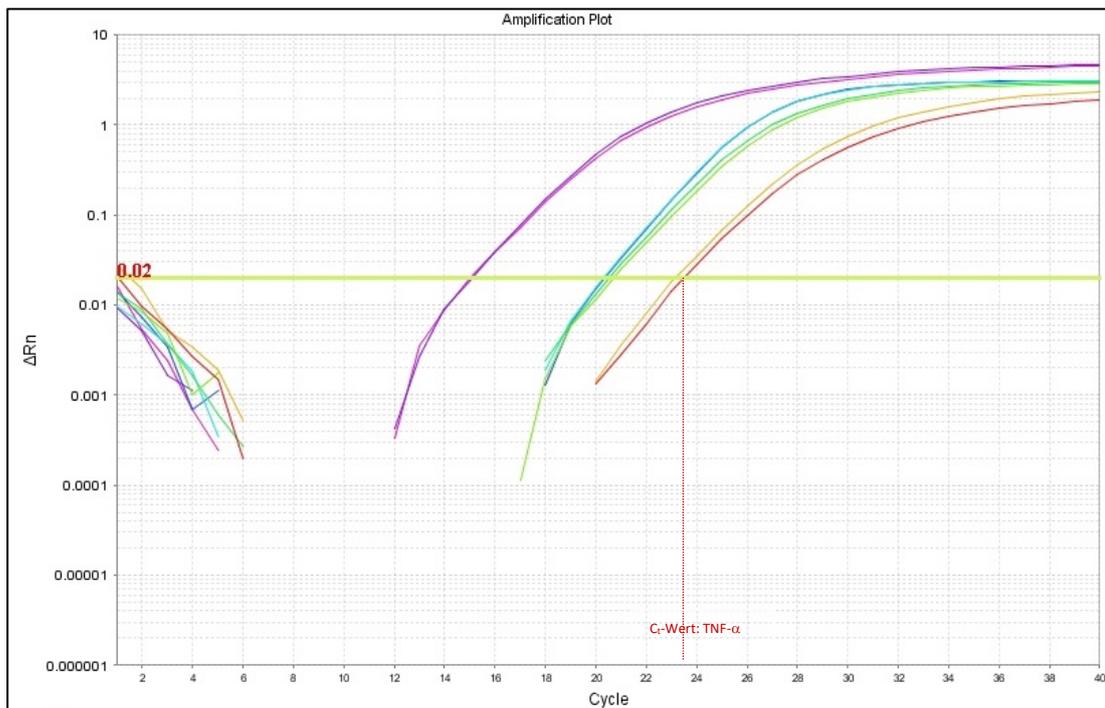


Abbildung 3: Beispiel einer logarithmierten Darstellung der mRNA-Expression von TNF- $\alpha$ ; Threshold (hellgrüne Linie) liegt bei 0,02; rot gestrichelte Linie: C<sub>t</sub>-Wert von TNF- $\alpha$

Die Darstellung der Daten wird im Rahmen einer Eichkurve angezeigt, die sich in die exponentielle, lineare und endpoint (Plateau) Phase einteilt (Abb. 3). Wichtig ist hierbei die exponentielle Phase, die präzise und genaue Daten für die Quantifizierung generiert. Von großer Bedeutung sind hierbei der Threshold und C<sub>t</sub>-Wert. Der Threshold stellt eine Nachweisgrenze dar, bei der eine Fluoreszenzintensität einer Reaktion über die

Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Der  $C_t$ -Wert beschreibt den PCR-Zyklus, bei dem der Schwellenwert von einer Probe erreicht wird. Dieser ist ein relatives Maß für die Konzentration der Zielgens im Reaktionsansatz (Thermo Fischer Scientific). Die Berechnungen der x-fachen Expressionsanstiegs/-abfalls wurde mittels der  $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ -Methode bestimmt. Hierzu wurden die entsprechenden Target-Gene durch das Hauskeeping-Gen RPL37A und durch Bezug auf eine interne Referenz (gesunder 60-jähriger Proband) normalisiert.

### **Durchflusszytometrische Analyse von RelA und RelB in Monozyten und Lymphozyten**

In dem Versuch wurden in einem Volumen von 500µl Puffermedium je  $0,25 \times 10^6$  PBMCs eingesät. Zur Ermittlung der jeweiligen Mengen an PBMC-Lösung und RPMI-Medium (4%FBS/HSA) wurde zu Beginn eine Rechnung durchgeführt. Das Medium wurde in vier vorbereitete FACS-Röhrchen vorgelegt und die Zellen hinzupipettiert. In das erste Röhrchen wurde 1µl LPS (10µg/ml) und in das Zweite 1µl LPS und 2µl AhR-Antagonist (2mg/ml) beigefügt, wobei die letzten beiden Röhrchen unstimuliert blieben und somit die Kontrollgruppen 1 (Ko1) und 2 (Ko2) darstellten. Nach kurzem Vortexen wurden die vier FACS-Röhrchen für eine halbe Stunde im Brutschrank gelagert.

Nachdem die Röhrchen aus dem Brutschrank entnommen wurden, wurde für die Fixierung der Proben unter dem Abzug in diese jeweils 100µl von der 4%igen Paraformaldehyd-Lösung (PFA) hinzupipettiert. Anschließend wurden diese gevortext und für zehn Minuten inkubiert. Für die Pelletierung wurden die Röhrchen danach für fünf Minuten bei 300g zentrifugiert und hinterher der Überstand in ein Abfallbehälter unter dem Abzug abgekippt. Die Permeabilisierung der nun fixierten PBMCs wird durch die Hinzugabe von 1ml eisgekühltem PhosFlow Perm Puffer III initiiert. Die Proben wurden nach kurzem Vortexen für eine halbe Stunde auf Eis inkubiert und danach für fünf Minuten bei 350g zentrifugiert. Demnach schlossen sich zwei Waschschriffe mittels 2ml FACS-Puffer (filtriert, PBS/0,1% BSA/0,07% Na-Azid) an, wobei nach diesen 48µl FACS-Puffer zum Pellet pipettiert wurde. In der Zwischenzeit wurde der Antikörper-Mix für die Anfärbung bereitgestellt. Hierzu wurden je Probe 1µl von CD4 APC eF480, 5µl von Stat3BV421 (Tyr705), 5µl von CD86 PeCy5, 5µl von Phospho-RelB (Ser552) und jeweils 20µl von NFκB p65 Alexa 488 und Stat3 PE (Ser 727) benötigt. Von dem Mix

wurden je 56µl in die Röhren mit Ko2, LPS und LPS/AhR-A pipettiert, wobei in das Ko1-Röhren nur 1µl vom CD4 APC eF480 und 5µl vom CD86 PeCy5 hinzugegeben wurden. Alle Proben wurden gevortext und für eine halbe Stunde im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurde ein weiterer Waschschrift mit 2ml FACS-Puffer durchgeführt und ein Zentrifugationsschritt (5 Min., 350g) schloss sich hiernach an. Zum Schluss wurden auf die vorliegenden Pellets je 200µl FACS-Puffer hinzupipettiert und gevortext. Die Proben konnten somit am MACSQuant durchflusszytometrisch analysiert werden.

### **Durchflusszytometrische Analyse von TNF-α in Monozyten und Lymphozyten**

Insgesamt wurden in dem hier durchgeführten Versuch  $0,5 \times 10^6$  PBMCs in 500µl RPMI-Medium (4%FBS/HSA) eingesät. Die genauen Mengen wurden mit Hilfe einer Rechnung ermittelt. Hierfür wurden in die sechs beschriftete FACS-Röhren Ko1, Ko2, LPS, LPS/AhR-A, LPS/I3S, LPS/I3S/AhR-A zuerst das Medium und dann die Zellen hinzupipettiert. Jeweils 1µl LPS (10µg/ml), 2µl AhR-A (2mg/ml) und 2,5µl Indoxylsulfat (199mM) wurden in die dementsprechend beschrifteten Röhren gegeben. Die Ko1 und Ko2-Röhren blieben unstimuliert und dienten als Kontrollproben. Nach kurzem Vortexen wurden alle Proben erst einmal in den Brutschrank gestellt, bis sie dann wieder zu einem späteren Zeitpunkt herausgeholt wurden, um 0,5µl Monensin dazuzugeben. Monensin inhibiert intrazelluläre Transportprozesse von Proteinen während der Zellaktivierung. Dies führt zur Anhäufung von zum Beispiel Zytokinen im Endoplasmatischen Retikulum/Golgi-Apparat, welche dann durch Färbung besser erfasst werden können (Jung et al.1993). Die Proben wurden anschließend für 14 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Röhren dem Brutschrank entnommen und mittels 2ml PBS (PBS + 0,07% Na-Azid) gewaschen. Nach der Zentrifugation (5 Min., 350g) wurden die Überstände der Proben in einen Behälter abgekippt und auf die Pellets 100µl PBS und 0,5µl Viability 405/450 Dye gegeben. Bei dem Viability Dye handelt es sich um einen aminreaktiven Farbstoff, der in beschädigte Zellen eindringen und mit den Zytoskelettproteinen interagieren kann. Damit dies geschieht, müssen die Zellen in einem proteinfreien Medium vorliegen, da somit eine vorzeitige Reaktion mit den Aminogruppen vermieden werden kann. Dies wurde hier durch das Waschen mittels

PBS im vorherigen Schritt gewährleistet. Ziel der Färbung ist es letztendlich tote Zellen von lebenden zu unterscheiden und durch ihre unterschiedlichen Fluoreszenzsignale diese zu erkennen (Miltenyi Biotec).

Hiernach fand die Inkubation für zehn Minuten im Dunkeln statt. In der Zwischenzeit wurde der Antikörpermix für die sechs Proben (3,3µl von CD14 FITC und 13,2µl von CD3 APC-Vio770) angefertigt und bis zur Verwendung kühl gelagert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Proben mittels 2ml FACS-Puffer gewaschen und bei 350g für fünf Minuten zentrifugiert. Hiernach wurden die Überstände der Proben abgekippt und die Pellets in 100µl FACS-Puffer aufgenommen. Je 2,5µl vom Antikörpermix wurde in jedes Röhrchen pipettiert und für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. An diese schlossen sich ein Waschschrift mittels 2ml FACS-Puffer und eine weitere Zentrifugation (5 Min., 350g) an. Das Pellet wurde für die Fixierung der Zellen unter dem Abzug in 200µl 1,0% PFA-Lösung aufgenommen, gevortext und für zehn Minuten bei 4°C gelagert. Danach wurden die Proben in 2ml FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert (5 Min., 300g). Die Überstände wurden in ein Abfallbehälter abgekippt, 1ml von 0,1%iger Saponinlösung zugegeben und für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Saponin dient der Komplex-Bildung innerhalb der Zellmembran, wodurch hier Poren entstehen und die Permeabilisierung der Zelle veranlasst wird. Nach Ablauf der Zeit wurden die Proben zentrifugiert (5 Min., 500g), der Überstand abgekippt und die Pellets in je 95,75µl FACS-Puffer aufgenommen. Anschließend fand die intrazelluläre Färbung mittels Antikörper statt. In fünf der sechs Proben (ausgenommen die Ko1-Probe) wurden 0,25µl von TNF-α PE, 2µl von IL-10 APC und 2µl von 5%iger Saponin-Lösung pipettiert. In die Ko1 wurde nur 2µl der 5%iger Saponin-Lösung hinzugegeben. Alle Proben wurden nach dem Vortexen für eine halbe Stunde im Dunkeln inkubiert, danach in 1ml FACS-Puffer aufgenommen, gevortext und für fünf Minuten bei 500g zentrifugiert. Abschließend wurden die Überstände abgekippt, die Pellets in 200µl FACS-Puffer aufgenommen und nach kurzem Vortexen für die durchflusszytometrische Analyse am MACSQuant bereitgestellt.

#### **Caspase-4 Assay**

In dem hier durchgeführten Versuch wurde der Caspase Glo1<sup>®</sup> Assay von der Firma Promega verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Kit, welches 10ml Caspase-Glo1

Puffer, Z-WEHD Substrat und 2x30µl MG-132 Inhibitor enthält. Zunächst wurde der Caspase-Glo1 Puffer zu dem Substrat Z-WEHD gegeben. Durch mehrfaches Invertieren und Schwenken der Flasche wurde die Flüssigkeit gut durchmischt. Hiernach wurde 60µl von MG-132 zu der Lösung gegeben und wieder mehrfach invertiert und geschwenkt. Somit entstand 10ml Caspase-Glo Reagenz, die in je 5ml große Röhrchen abpipettiert und weggefroren wurden. Die Zugabe des Puffers zum Substrat führt zur Erzeugung eines stabilen Lichtsignals, das proportional zur Caspase-Aktivität ist. Durch den Proteasominhibitor MG-132 wird die unspezifische Proteasom-vermittelte Spaltung des Substrates verhindert und ermöglicht somit den Nachweis der Caspase 1, 4 und 5 (Promega 2019). Zum spezifischen Nachweis der Caspase 4 wurde der CASP4-Inhibitor AC-LEVD-CHO eingesetzt. Zur Detektion von unspezifischer Caspasenspaltung wurde der CASP8 Inhibitor Z-IETD-FMK verwendet.

Zu Beginn des Versuchs wurden in ein FACS-Röhrchen die zuvor berechneten Mengen an PBMCs und RPMI-Puffer pipettiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass ca.  $3 \times 10^6$  Zellen in 1,5ml RPMI-Puffer (4%FBS/HSA) hinzugefügt wurden. Hiernach wurden in 24 wells (A-D, 1-6) der weißen, opaken Luminometer-fähigen 96-well Platte je 50µl der PBMC-Lösung pipettiert und somit die gewünschte Zellmenge von  $0,1 \times 10^6$  eingesät. Die Mediumkontrollen wurden in weitere 12 wells (E-F, 1-6) gelegt. Die Reihe 1 blieb unstimuliert, währenddessen in die Reihe 2 1µl CASP4 Inhibitor (AC-LEVD-CHO, 2µM) und in die Reihe 3 CASP8 Inhibitor (Z-IETD-FMK, 2µM) hinzupipettiert wurden. Die anderen drei Reihen wurden jeweils mit 0,5µl Indoxylsulfat (199mM), 0,5µl Indoxylsulfat und 1µl CASP4 sowie 0,5µl Indoxylsulfat, 1µl CASP4 und 2µl AhR-Antagonist (2mg/ml) stimuliert. Die Platte wird mittels eines Plattenschüttlers (5 Sek., 300rpm) vorsichtig durchmischt und im Brutschrank für 22 bis 24 Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde diese wieder aus dem Brutschrank entnommen und in alle besetzten wells je 50µl Caspase-Glo1 Reagenz pipettiert. Hiernach erfolgte die Durchmischung wieder durch den Plattenschüttler (5 Sek., 300 rpm). Die Inkubation der Platte fand für eine halbe Stunde im Dunkeln statt, bis diese dann mittels des Infinite 200 Pro-Plattenreader und der „i-control“ Software der Firma Tecan luminometrisch gemessen wurde.

## **ELISAs von TNF- $\alpha$ im Serum und Zellüberständen**

Bei dem Enzyme Linked Immunosorbent Assay (kurz ELISA) handelt es sich um ein immunologisches Nachweis- und Quantifizierungsverfahren von löslichen Molekülen wie Proteine, Peptide und Antikörper. Bei der Methode wird zumeist auf eine Mikroplatte das zu bestimmende Antigen aufgetragen, welches dann mit einem Antikörper interagiert. An dem Antikörper ist ein Reporterenzym gebunden, der mit einem spezifischen Substrat reagiert und sich dadurch ein messbares Produkt bildet. Dabei wird die Aktivität des Reporterenzyms gemessen (Thermo Fisher Scientific). Für die Anwendung des ELISAs wurden das Serum des Probanden und die Zellüberstände aus den Zellproben benötigt.

Das Serum, welches mit Hilfe einer 4,9 ml Monovette am ersten Dialysetag entnommen wurde, wurde zu allererst bei 2000g für zehn Minuten zentrifugiert. Dabei hob sich eine klare Schicht ab, die mittels einer Pipette auf zwei bis drei 1,5 ml Eppendorf-Tubes verteilt wurde. Diese wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C zwischengelagert.

Die Zellüberstände wurden aus den PBMCs nach ihrer Isolation gewonnen. Dabei wurden je  $0,5 \times 10^6$  Zellen in 500 $\mu$ l RPMI-Puffer (4% FBS/HSA) in drei FACS-Röhrchen aufgenommen. Anschließend wurde eine Probe mit 1 $\mu$ l LPS und eine Probe mit 1 $\mu$ l LPS und 2 $\mu$ l AhR-Antagonist stimuliert. Die Kontrollgruppe blieb unstimuliert. Die der Proben wurden kurz gevortext und für 20 bis 22 Stunden in den Brutschrank zur Inkubation gestellt. Nach erfolgter Inkubation wurde die Suspension in sterile 1,5 ml Eppendorf-Tubes überführt. Diese wurden für fünf Minuten bei 500g zentrifugiert und die Überstände in neue, beschriftete 1,5 ml Eppendorf-Tubes pipettiert. Es wurde strikt darauf geachtet, dass das Pellet nicht mit aufgenommen wird. Die Überstände konnten somit bei -20°C weggefroren und für die Anwendung des ELISAs verwendet werden. Zu den verbliebenen Pellets wurde der RIPA-Lysepuffer hinzupipettiert und bei -80°C eingefroren.

Für die Analyse von TNF- $\alpha$  wurden zwei verschiedene ELISA-Kits von der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet: das TNF- $\alpha$  high sensitivity ELISA-Kit für die Zellüberstände und Human TNF- $\alpha$  (Total) ELISA-Kit für den Nachweis im Serum. Bei beiden Kits mussten Reagenzien wie Wasch- und Assay Puffer vorbereitet werden, in dem diese mit

deionisiertem Wasser 1:20 verdünnt wurden. Das Biotin-Konjugat und Streptavidin-HRP wurden zuvor in einem Verhältnis von 1:100 mit Assay Buffer verdünnt und die Standardlösungen sowie die siebenfachen Verdünnungsreihen vorbereitet. Der Nachweis der Zellüberstände begann damit, dass die 96-well Platte mittels 400µl Waschpuffer zwei Mal gewaschen wurde. Hiernach wurden 100µl von den jeweiligen sieben Standardlösungen und 100µl vom Sample Diluent als Blankwerte doppelt aufgetragen. Anschließend wurden 50µl von den unstimulierten und stimulierten Proben in Doppelwerten auf die Platte pipettiert, wobei je 50µl vom Sample Diluent zu den Probe-Wells hinzugefügt wurde. Nachfolgend wurden 60µl vom Biotin-Konjugat in alle wells hinzupipettiert, die Platte verschlossen und für zwei Stunden auf dem Plattenschüttler bei 400 rpm inkubiert. Nach der Inkubation schlossen sich sechs Waschschritte mittels Wash-Buffer an. In jedes Well wurde danach 100µl vom Reporterenzym Streptavidin HRP gegeben und die Platte wieder verschlossen und für eine Stunde bei 400 rpm erneut inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die Amplifikationslösung I in einem Verhältnis von 1:100 angesetzt und nach der Inkubationszeit und den sechs Waschschritten 100µl von dieser in jedes Well gegeben und für weitere 15 Minuten auf dem Plattenschüttler (400 rpm) inkubiert. Die Amplifikationslösung II wurde in einem Verhältnis von 1:300 angesetzt. Nach Ablauf der Inkubation wurde die Platte nochmals gewaschen und 100µl der Lösung II in alle Wells pipettiert. Die Platte wurde verschlossen und in Raumtemperatur für eine halbe Stunde inkubiert. Anschließend schlossen sich die letzten sechs Waschschritte an und 100µl der Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung wurde in alle Wells pipettiert und für 10 bis 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden 100µl von der Stop Solution in alle wells gegeben und die Enzymreaktion somit sofort unterbunden. Zum Schluss erfolgte die sofortige Messung der Platte bei 450 nm am Ultra Microplate Reader.

Der Nachweis von TNF- $\alpha$  im Serum erfolgte mittels des Human TNF- $\alpha$  (Total) ELISA-Kits. Dieser ist, mit Ausnahme der Amplifikationsschritte I und II sowie der Konzentration der Standardlösung, identisch mit dem high sensitivity ELISA-Kit und stimmt mit den Waschschritten, Inkubationszeiten, Mengen der verwendeten Substanzen sowie die Messung der Platte überein.

### 3.2.2.3 Statistische Phase

Die mit der Durchführung der Versuche ermittelten Ergebnisse wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen (SD) festgehalten. Mit der Anwendung des D'Agostino-Pearson-Omnibus-Tests wurden alle kontinuierlichen Variablen auf die Normalverteilung überprüft. Mit dem Mann-Whitney-Test oder mit der einseitigen Varianzanalyse (kurz ANOVA) sowie mit dem im Anschluss durchgeführten LSD-Post-Hoc-Test nach Fisher konnten alle kontinuierlichen Daten verglichen werden. Kategoriale Variablen wurden mittels Chi-Square-Analyse ausgewertet. Die Daten wurden entweder mit der Software SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) oder mit GraphPad Prism 9.2.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) ausgewertet und per Boxplots und Tabellen verbildlicht. Als statistisch signifikant wurden alle Werte eingestuft, die sich innerhalb des Signifikanzniveaus von 5% ( $p < 0,05$ ) befanden.

## 4. Ergebnisse

In die durchgeführte Studie wurden 40 HD-Patienten einbezogen, von denen 23 als normovoläm (N) und 17 als hypervoläm (H) mittels Bioimpedanzmessung klassifiziert wurden. Die Bioimpedanzmessung wurde nach der letzten Dialysebehandlung der letzten Wochendialyse durchgeführt.

### 4.1 Demographische Daten

Die durch die Anamnese, der klinischen und laborchemischen Methoden ermittelten Daten der in die Studie eingebundenen Probanden wurden einfachheitshalber in der Tabelle 7 zusammengeführt:

Das Patientenalter der hypervolämen Gruppe betrug im Durchschnitt  $67,5 \pm 10,2$  Jahre und der normovolämen Gruppe  $57,6 \pm 14,3$  Jahre. Wurden beide Gruppen miteinander verglichen, konnte man hier einen signifikanten Unterschied ( $p = 0,020$ ) erkennen. In beiden Gruppen waren Dialysepatienten vertreten, die zusätzlich an Diabetes mellitus erkrankt sind. Hierbei waren die hypervolämen Probanden ungefähr dreimal so oft ( $p = 52,9\%$ ) betroffen als die normovolämen Probanden ( $17,4\%$ ). Somit lag ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen vor ( $p = 0,038$ ). Beim Vergleich des C-reaktiven Proteins in beiden Gruppen wurde sichtbar, dass dies bei den hypervolämen Patienten signifikant erhöht war als bei normovolämen Patienten ( $p = 0,020$ ). Beim Vergleich des ECWs und TBWs wurde außerdem ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Probandengruppen ersichtlich (ECW:  $p = 0,001$ ; TBW:  $p = 0,009$ ). Bei hypervolämen HD-Patienten konnte ein ECW/TBW-Wert von  $> 0,40$  ermittelt werden, während bei normovolämen Patienten dies bei  $< 0,40$  lag. Des Weiteren hatten hypervoläme Patienten im Vergleich zu normovoläme Patienten leicht erhöhte BMI-, systolische sowie diastolische Blutdruckwerte, wobei der Albuminwert bei diesen leicht erniedrigt ist (siehe Tabelle 7). Daneben lag ein signifikanter, niedriger Kreatinin-Wert bei Hypervolämen im Gegensatz zu Normovolämen (Kreatinin:  $p = 0,001$ ) vor. Bei der Betrachtung der durch die Probanden eingenommenen Medikamente wie Antihypertensiva und Diuretika waren keine signifikanten Unterschiede sichtbar

(Diuretika:  $p = 0,126$ ; Antihypertensiva:  $p = 0,836$ ). Außerdem unterschieden sich beide Gruppen nicht in der Geschlechterverteilung ( $p = 0,749$ ).

Tabelle 7: Demographische Daten von normo- (N) und hypervolämischen (H) Patienten

	N (n=23)	H (n=17)	Statistik
Alter (Jahre)	57,6±14,3	67,5±10,2	0,020
Geschlecht (w, %)	60,9	52,9	0,749
Diabetes (%)	17,4	52,9	0,038
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	26,7±8,1	29,4±6,9	0,184
Dialysedauer (in Jahren)	7,6±5,7	7,1±10,9	0,073
Kt/V	1,6±0,4	1,2±0,3	0,002
CRP (mg/dl)	5,2±6,3	14,2±16,1	0,020
Albumin (g/l)	40,1±3,2	38,6±4,7	0,256
Hämoglobin (mmol/l)	6,9±0,7	7,0±0,9	0,948
Kreatinin (µmol/l)	930±210	679±246	0,001
ECW (l)	14,9±6,2	20,4±4,9	0,001
ICW (l)	22,5±3,8	24,8±4,6	0,084
TBW (l)	37,3±9,4	45,2±9,2	0,009
Interdialytische Gewichtszunahme (kg)	1,9±2,0	3,0±1,2	0,062
Antihypertensiva (n)	2,4±1,3	2,4±1,1	0,836
Diuretika (n)	0,7±0,9	1,2±1,0	0,126
Systolischer RR (mm Hg)	127±27	143±31	0,093
Diastolischer RR (mm Hg)	69±13	70±20	0,806

BMI: Body-Mass-Index, ECW: Extrazelluläres Wasser, ICW: Intrazelluläres Wasser, TBW: total body water (= Gesamtkörperwasser), CRP: C-reaktives Protein

#### 4.2 Absolutwerte immunologisch aktiver Zellen

Die mittels der TruCount-Analyse und Durchflusszytometrie ermittelten absoluten Werte der unterschiedlichen T-Zell-Klassen, CD14<sup>+</sup>-Monozyten sowie Granulozyten aus den isolierten PBMCs wurden in der Tabelle 8 zusammengefasst.

Hierbei wird ersichtlich, dass die Hypervolämie auf zellulärer Ebene mit einer erhöhten Anzahl von CD45-positiven Leukozyten (10,8±4,3) einhergeht. Die Anzahl der Granulozyten ist im Gegensatz zu den anderen Leukozyten-Klassen bei hypervolämischen Probanden (7,3±3,2) im Vergleich zu normovolämischen Probanden (5,7±1,9) höher. Bei den absoluten Häufigkeiten von T-Zell-Klassen sowie CD14<sup>+</sup>-Monozyten der beiden Gruppen wurden keine signifikanten Unterschiede aufgezeigt (CD14<sup>+</sup>-Monozyten:  $p = 0,381$ ; CD3<sup>+</sup>:  $p = 0,728$ ; CD4<sup>+</sup>:  $p = 0,636$ ; CD8<sup>+</sup>:  $p = 0,216$ ; Treg<sup>+</sup>:  $p = 0,120$ ).

Tabelle 8: Absolute Häufigkeit von T-Zellen, Granulozyten und Monozyten

	N (n=23)	H (n=17)	Statistik
CD45+ (x10 <sup>6</sup> /ml)	9,1±3,0	10,8±4,3	0,079
Granulozyten (x10 <sup>6</sup> /ml)	5,7±1,9	7,3±3,2	0,065
CD14+ Monozyten (x10 <sup>6</sup> /ml)	0,7±0,4	0,8±0,3	0,381
CD3+Lymphozyten (x10 <sup>6</sup> /ml)	1,3±0,6	1,2±0,5	0,728
CD4+ (x10 <sup>6</sup> /ml)	0,7±0,4	0,6±0,3	0,636
CD8+(x10 <sup>6</sup> /ml)	0,4±0,2	0,5±0,3	0,216
Treg+ (CD25+CD127low, x10 <sup>6</sup> /ml)	0,02±0,02	0,02±0,02	0,120

### 4.3 mRNA-Expression von TNF- $\alpha$ unter basalen und stimulierten Bedingungen

Die mRNA-Expression des proinflammatorischen Tumornekrosefaktors- $\alpha$  und dessen TNFR1-Rezeptors in PBMCs wurde in den folgenden Abbildungen (Abb. 4a-d) unter basalen und stimulierten Bedingungen dargestellt. Unter unstimulierten Umständen wurde weder ein Unterschied in der TNF- $\alpha$ -Expression (Abb. 4a) noch in der Expression des TNFR1-Rezeptors (Abb. 4b) in den hyper- und normovolämen Patienten erkannt. Durch die Stimulation mittels LPS und AhR-Antagonist wurde aufgezeigt, dass LPS sowohl in normo- als auch hypervolämen Probanden die mRNA Expression von TNF- $\alpha$  in PBMCs induziert, wobei mit Mitwirkung von AhR-Antagonisten dieser Effekt v.a. bei Hypervolämen weiterhin verstärkt vorliegt (Abb. 4c, d). Die zusätzliche Beigabe des AhR-Antagonisten zu den durch LPS-aktivierten Zellen führt zu keiner signifikanten Veränderung in der Expression.

#### mRNA-Expression unter basalen Bedingungen

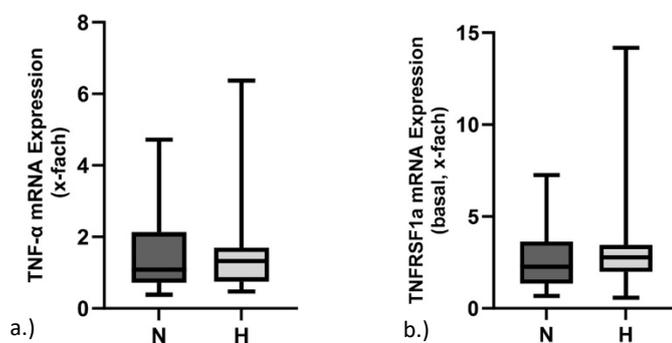


Abbildung 4: a.) mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  und b.) TNFR1-Rezeptor-Expression in normo- (N) und hypervolämen (H) Patienten in basalen Bedingungen

## mRNA-Expression nach Stimulation mittels LPS und AhR-Antagonist

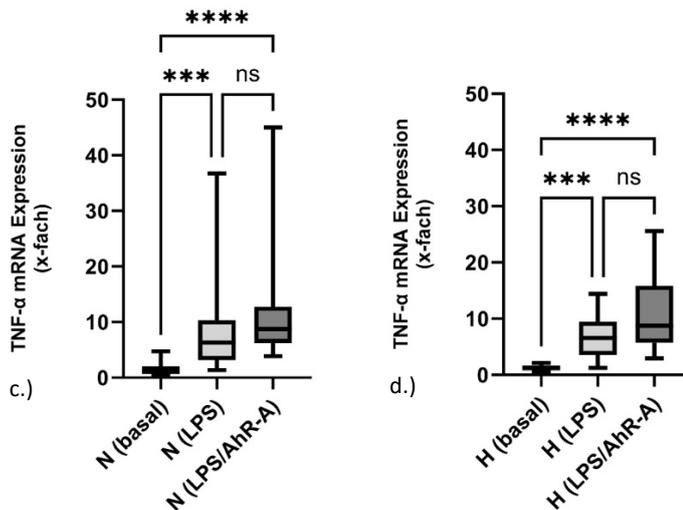


Abbildung 4: c.) mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  bei normo- (N) und d.) hypervoläm (H) Patienten unter stimulierten Bedingungen mittels LPS und AhR-Antagonisten; \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ns: nicht signifikant

### 4.4 TNF- $\alpha$ Sekretion

Der Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , welcher von einer Vielzahl von verschiedenen Zellen wie Monozyten und Lymphozyten gebildet wird, wurde mit dem vorher beschriebenen Quantifizierungsverfahren (ELISA) sowohl im Patientenserum als auch in Zellüberständen der isolierten Zellproben analysiert und die ermittelten Werte in Form von Boxplots in den folgenden Abbildungen veranschaulicht.

#### 4.4.1 TNF- $\alpha$ -Serum-Spiegel

In der folgenden Abb. 5 wurde der TNF- $\alpha$ -Spiegel (pg/ml) in den Seren von normo- und hypervoläm Hämodialysepatienten aufgezeichnet. Hierbei ist zu erkennen, dass der in den Seren vorhandene Tumornekrosefaktor sich in beiden Gruppen nicht quantitativ unterscheidet.

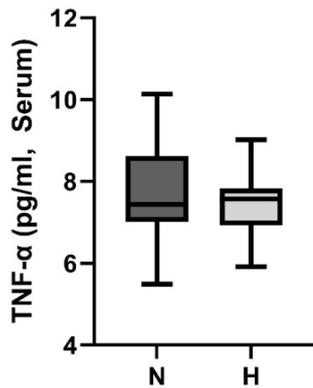
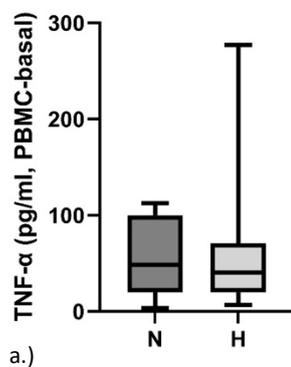


Abbildung 5: TNF- $\alpha$  Spiegel in der Einheit pg/ml im Serum von normo- (N) und hypervolämen (H) Hämodialysepatienten

#### 4.4.2 TNF- $\alpha$ im Überstand von unstimulierten und stimulierten PBMCs

Der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  wurde in den Zellüberständen der isolierten PBMCs unter unstimulierten und mittels LPS und AhR-Antagonisten stimulierten Bedingungen in normo- und hypervolämen Patienten analysiert. Bei der Betrachtung des TNF- $\alpha$  in unstimulierten PBMCs in den beiden Gruppen wurde kein signifikanter Unterschied zwischen diesen festgestellt (Abb. 6a). Des Weiteren kann unter stimulierten Bedingungen beobachtet werden, dass mit Wirkung von LPS der TNF- $\alpha$  (pg/ml) in PBMCs in N- und H-Patienten signifikant angestiegen ist (Abb. 6b, c). Dabei spielt die zusätzliche Stimulation mit AhR-Antagonisten eine untergeordnete Rolle.

#### TNF- $\alpha$ in unstimulierten PBMCs



## Stimulierte PBMCs mittels LPS und AhR-Antagonisten bei N- und H-Patienten

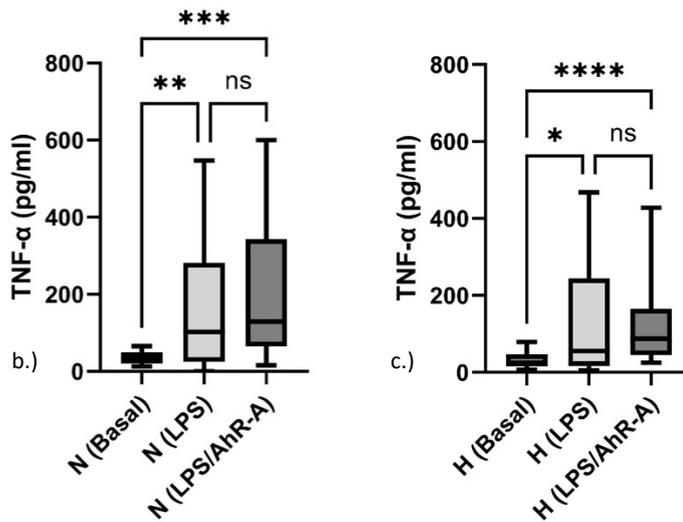


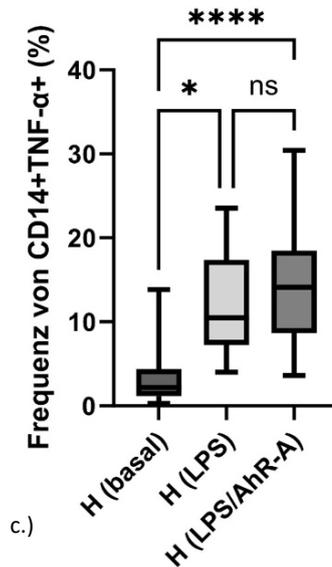
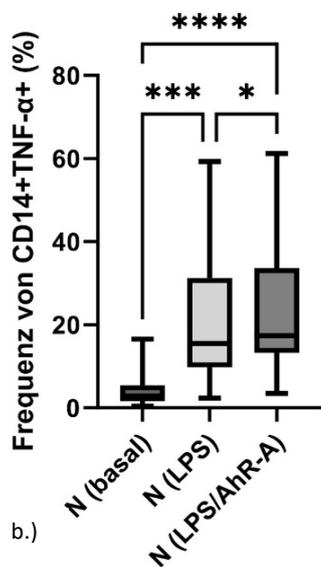
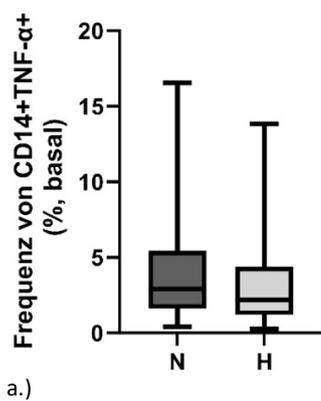
Abbildung 6: TNF- $\alpha$  (pg/ml) in normo- (N) und hypervolämischen (H) Hämodialysepatienten unter unstimulierten a.) und mit LPS und AhR-Antagonisten stimulierten b.,c.) Bedingungen; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ns: nicht signifikant

### 4.4.3 TNF- $\alpha$ positive Monozyten und Lymphozyten unter basalen und stimulierten Bedingungen

Die Werte, die durch die durchflusszytometrische Analyse von TNF- $\alpha$  in CD14<sup>+</sup>-Monozyten und CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten ermittelt wurden, wurden in Form von Boxplots in den folgenden Abbildungen (Abb. 7, 8; a-d) erfasst. Bei der Betrachtung von TNF- $\alpha$  in unstimulierten Monozyten ist zu sehen, dass sich die Anzahl der positiven gefärbten Zellen zwischen den beiden Patientengruppen N und H nicht unterscheidet (Abb. 7a). Im Gegensatz dazu ist bei normovolämischen Patienten unter der LPS-Stimulation ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,001$ ) zu beobachten, wobei durch die Zugabe von AhR-Antagonisten zum LPS dieser Effekt weiterhin signifikant ( $p < 0,05$ ) vorliegt (Abb. 7b). Im Vergleich dazu ist bei den hypervolämischen Patienten der zusätzliche Effekt von AhR-A nicht ersichtlich (Abb. 7c). Außerdem wurde hier das Verhalten der CD14<sup>+</sup>-Monozyten unter LPS und Indoxylsulfat (IS), ein Toxin, welches sich sehr wahrscheinlich am Entzündungsgeschehen mit beteiligt, in den zwei Patientengruppen beobachtet. Daraus konnte geschlossen werden, dass dieser keine zusätzliche Wirkung auf TNF- $\alpha$  ausübt (Abb. 7d.).

Die Betrachtung von TNF- $\alpha$  in CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten weist unter basalen Bedingungen zwischen den normo- und hypervolämen Patienten keinen signifikanten Unterschied auf (Abb. 8a). Unter stimulierten Bedingungen mit LPS und AhR-A ist in der normovolämen Patientengruppe keine zusätzliche, signifikante TNF- $\alpha$ -Bildung nachweisbar (Abb. 8b), während dies jedoch in der hypervolämen Gruppe unter LPS-Stimulation vorhanden ist ( $p < 0,05$ ) (Abb. 8c). Der Vergleich der beiden Gruppen miteinander zeigt, dass der AhR-Antagonist hier eine untergeordnete Rolle spielt. Die zusätzliche Stimulation mit I3S übt in beiden Patientengruppen keine Wirkung auf TNF- $\alpha$  aus (Abb. 8d).

TNF- $\alpha$  in Monozyten unter basalen und stimulierten Bedingungen mittels LPS und AhR-Antagonisten sowie I3S



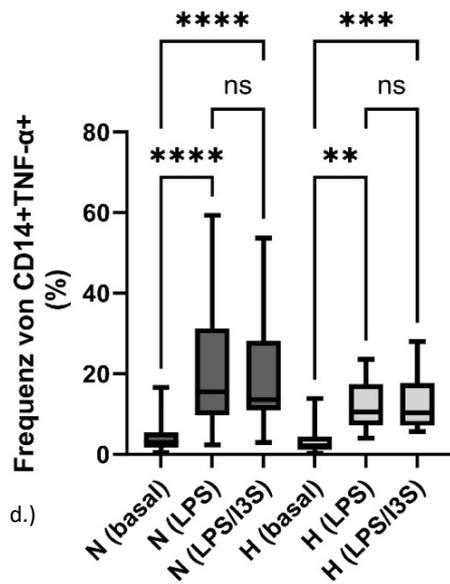
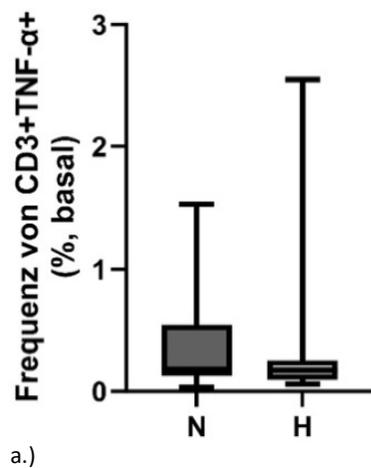


Abbildung 7: Frequenz (%) von TNF- $\alpha$  in CD14<sup>+</sup>-Monozyten bei normo- (N) und hypervolämen (H) Hämodialysepatienten unter unstimulierten a.) und mit LPS und AhR-Antagonisten stimulierten b,c.) Bedingungen, zusätzliche Stimulation mittels Indoxylsulfat (I3S); \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001, ns: nicht signifikant

TNF- $\alpha$  in CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten unter basalen und stimulierten Bedingungen mittels LPS und AhR-Antagonisten sowie I3S



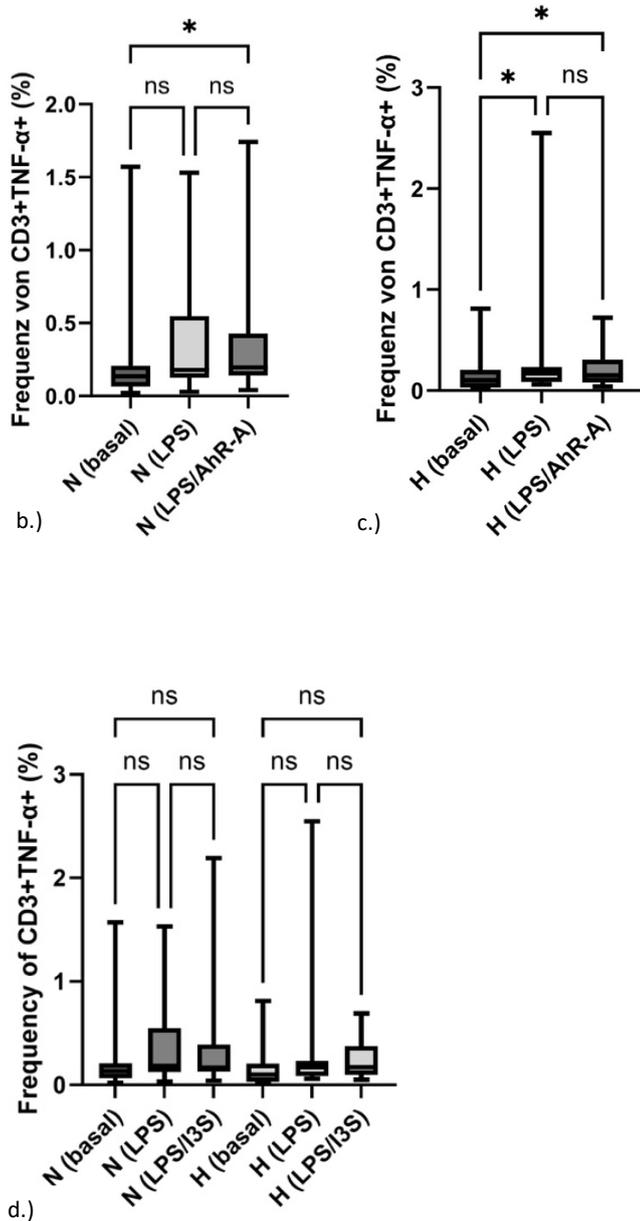


Abbildung 8: Frequenz (%) von TNF- $\alpha$  in CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten bei normo- (N) und hypervolämischen (H) Hämodialysepatienten unter unstimulierten a.) und mit LPS und AhR-Antagonisten stimulierten b,c.) Bedingungen, zusätzliche Stimulation mittels Indoxylsulfat (I3S) d.); \* $p < 0,05$ , ns: nicht signifikant

#### 4.5 NF $\kappa$ B Signaling

Der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B sowie die zur Familie dazugehörigen Proteine RelA und RelB spielen eine wichtige Rolle in der adaptiven und angeborenen Immunabwehr. Die Phosphorylierung der Proteine RelA und RelB in Monozyten sowie Lymphozyten wurden mittels der Durchflusszytometrie ermittelt und ihre Frequenz in Bezug auf die normo- und hypervolämische Gruppe in den folgenden Abbildungen (9-12, a-c) dargestellt.

#### 4.5.1 Phosphorylierung von NFκB (RelA/p65) an Serin 529 in CD86-positiven Monozyten unter basalen und stimulierten Bedingungen

In Abb. 9a wurde die Frequenz (Anzahl der positiven Zellen) von unstimulierten CD86<sup>+</sup>-Monozyten sowie die Phosphorylierung von RelA, welche an Serin 529 stattfand, in Verhältnis zu den zu betrachteten Gruppen „normo-“ (N) und „hypervoläm“ (H) aufgetragen. Hierbei ist zu erkennen, dass RelA (pS529) in unstimulierten Monozyten in den beiden Gruppen nicht unterschiedlich phosphoryliert wurde. Unter der Stimulation mittels LPS ist ein signifikanter Anstieg der Phosphorylierung in beiden Gruppen festzustellen (Abb. 9b, c), wobei hier der AhR-Antagonist nur eine untergeordnete Rolle spielt.

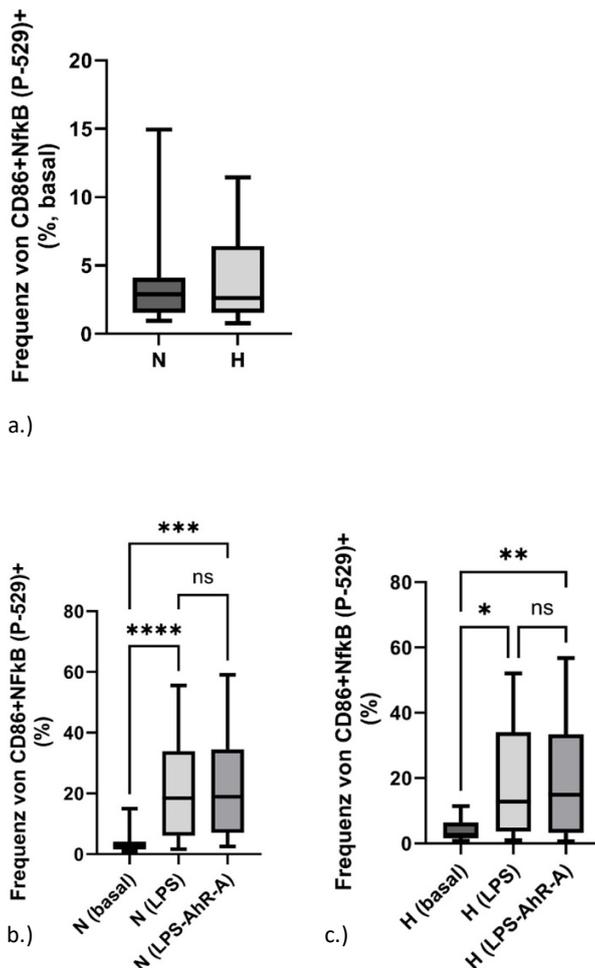


Abbildung 9: Frequenz (%) von unstimulierten a.) und mit LPS und AhR-Antagonisten stimulierten b.-c.) CD14<sup>+</sup>-Monozyten positiv gefärbt für an Serin P529 phosphoryliertem RelA in normo- (N) und hypervoläm (H) Hämodialysepatienten, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001, ns: nicht signifikant

#### 4.5.2 Phosphorylierung von NFκB (RelA/p65) an Serin 529 in CD4-positiven Lymphozyten unter basalen und stimulierten Bedingungen

Die unten folgenden Darstellungen zeigen die Frequenz des in CD4<sup>+</sup>-Zellen an Serin P-529 phosphorylierten Proteins RelA in unstimulierten (Abb. 10a) und stimulierten (Abb. 10b, c) Bedingungen bei normo- und hypervolämen Patienten. Die Stimulation erfolgte hier wiederum mittels LPS und AhR-Antagonisten. In Abb. 10a ist zu sehen, dass die Phosphorylierung von RelA unter basalen Umständen zwischen den beiden Gruppen nicht unterschiedlich induziert wird. Das Muster unter stimulierten Bedingungen ist zwischen Hypervolämen und Normovolämen ausgeprägter als in Monozyten, jedoch ist die Stimulation mittels LPS und AhR-Antagonisten im Vergleich zu den Monozyten jedoch schwächer ausgebildet. Es liegt kein Unterschied in der Phosphorylierung des Proteins RelA zwischen den beiden Gruppen in CD4<sup>+</sup>- Zellen vor (Abb. 10b, c).

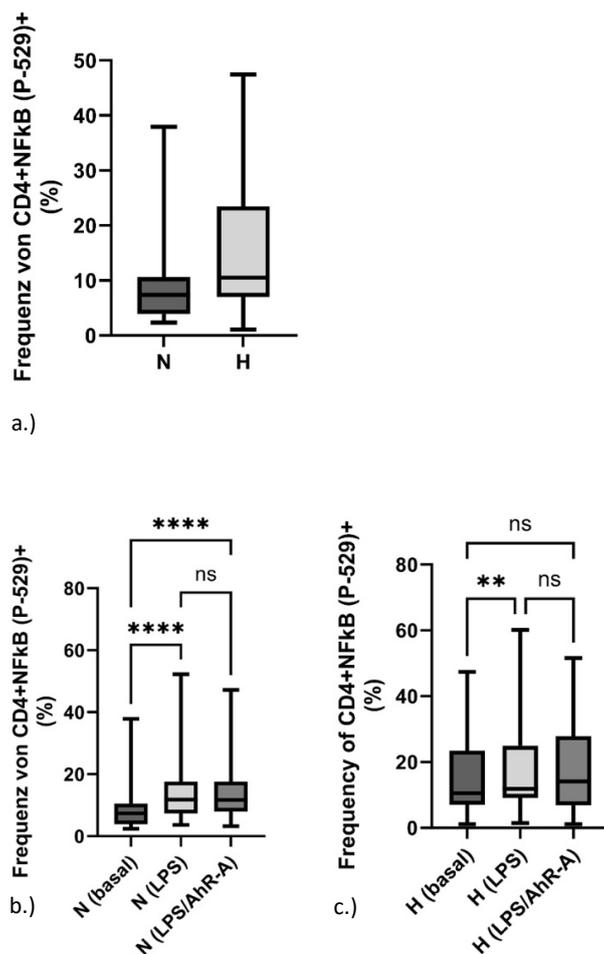


Abbildung 10: Frequenz (%) von unstimulierten a.) und mit LPS und AhR-Antagonisten stimulierten b.-c.) CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten positiv gefärbt für an Serin P529 phosphoryliertem RelA in normo- (N) und hypervolämen (H) Patienten, \*\*p<0,01, \*\*\*\*p<0,0001, ns: nicht signifikant

### 4.5.3 RelB Signaling in CD86-positiven Monozyten unter basalen und stimulierten Bedingungen

Das durch die durchflusszytometrische Analyse ermittelte RelB Signaling in CD86<sup>+</sup>-Monozyten unter basalen und stimulierten Bedingungen wurde in den kommenden Abbildungen dargestellt. Hierbei ist zu erkennen, dass in unstimulierten Zuständen das Signaling von RelB bei normovolämen Patienten signifikant höher ( $p < 0,05$ ) ist als bei der hypervolämen Gruppe (Abb. 11a). Außerdem ist zu beobachten, dass die nach RelB (pS552) positiv gefärbten Monozyten auch nach der LPS Stimulation erhöht vorliegen, wobei die zusätzliche Stimulation mittels AhR-Antagonisten ohne Effekt bleibt. Zwischen den N- und H-Patienten wurde in der RelB-Expression kein signifikanter Unterschied festgestellt (Abb. 11b, c).

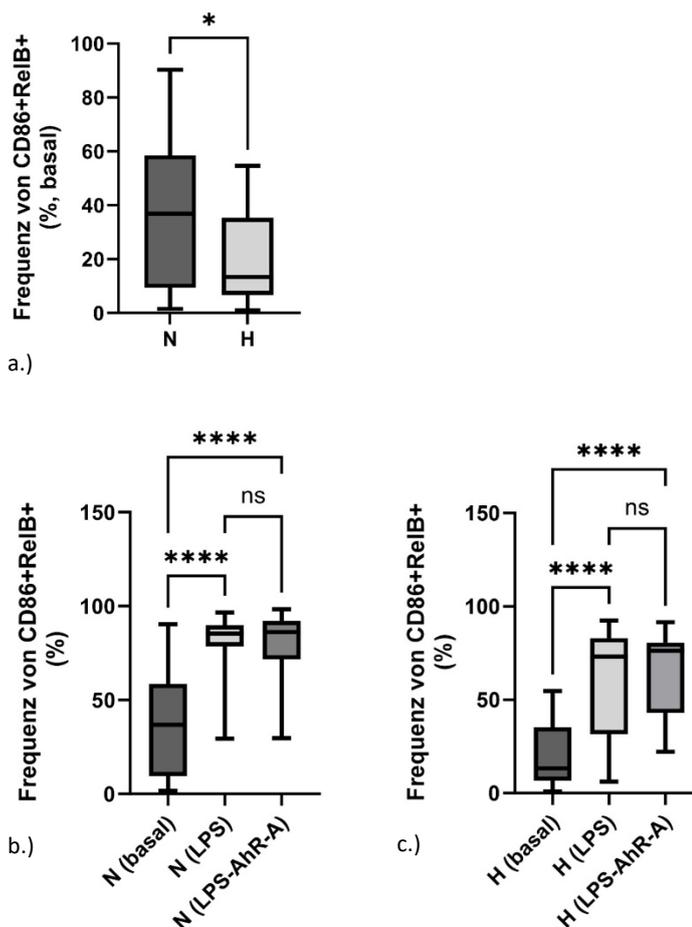


Abbildung 11: RelB-Signaling (%) unter unstimulierten a.) und mit LPS und AhR-Antagonisten stimulierten b.-c.) Bedingungen von CD86<sup>+</sup>-Monozyten in normo- (N) und hypervolämen (H) Patienten, \* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ns: nicht signifikant

#### 4.5.4 RelB Signaling in CD4-positiven Lymphozyten unter basalen und stimulierten Bedingungen

Das in CD4<sup>+</sup>-Zellen gemessene RelB-Signaling ist im Gegensatz zu den CD86<sup>+</sup>-Monozyten sowohl in unstimulierten als auch stimulierten Zuständen nicht ausschlaggebend. Zwischen den H- und N-Patienten liegt kein signifikanter Unterschied vor (Abb. 12a). Die Stimulation mit LPS schlägt nur minimal an (Abb. 12b) und spielt im Vergleich zu den analysierten Monozyten nur eine untergeordnete Rolle, wobei in hypervolämischen Probanden dieser Effekt auch ausbleibt (Abb. 12c). Die Anwendung von AhR-A ist sowohl in der H- als auch N-Gruppe wirkungslos.

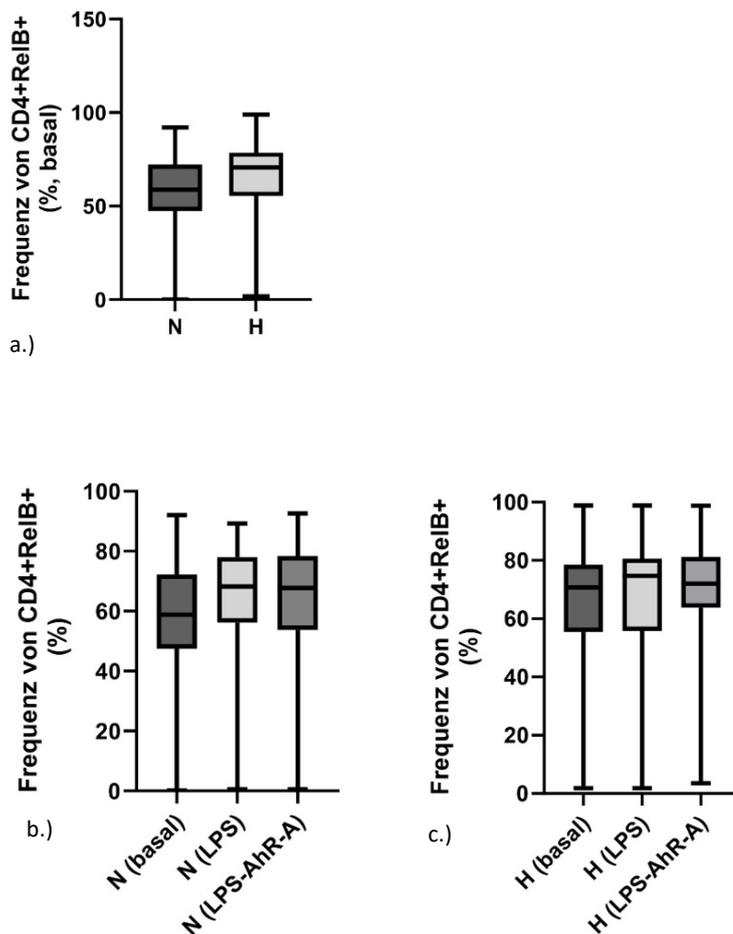


Abbildung 12: RelB-Signaling (%) unter unstimulierten a.) und mit LPS und AhR-Antagonisten stimulierten b.-c.) Bedingungen von CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten in normo- (N) und hypervolämischen (H) Patienten

#### 4.6 Caspase - 4 Aktivierung in der Hypervolämie

Die Aktivität von Caspase 4, eine zu den inflammatorischen Caspasen gehörige Protease, wurde mittels des durchgeführten Validierungsassays ermittelt. Hierfür wurden spezifische Caspase-Inhibitoren wie die CASP4- (AC-LEVD-CHO) und CASP8- (Z-IETD-FMK) spezifische Inhibitoren verwendet, um gezielt die Aktivität dieser nachweisen und die Rolle von Caspase 4 in den untersuchten HD-Patienten feststellen zu können.

In der Abb. 13a wurde die Caspase-Aktivität (%) im Verhältnis zu dem Caspase 4-spezifischen Inhibitor (LEVD) bei normo- und hypervolämen Patienten im Vergleich mit einer Kontrollgruppe dargestellt. Hierbei ist zwischen den beiden Patientengruppen ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,01$ ) zu beobachten. Die Funktion des CASP4-Inhibitors wird in den H-Patienten vermehrt ausgeübt, welches darauf zurückführt, dass CASP4 in dieser Gruppe vermehrt ihre Aktivität ausübt und dadurch auch zunehmend unterdrückt wird. Im Gegensatz dazu ist die Hemmwirkung des CASP8-Inhibitors (IETD) zwischen den beiden Patientengruppen nur gering zu verzeichnen (Abb. 13b).

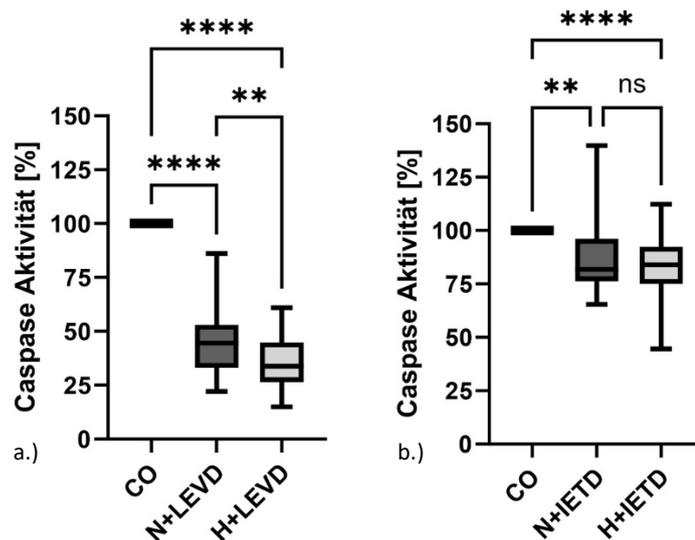


Abbildung 13: Caspase-Aktivitäten (%) in normo- (N) und hypervolämen (H) Patienten: a.) Caspase-4-Aktivität in N- und H-Patienten unter Mitwirkung von CASP4-Inhibitor (AC-LEVD-CHO); b.) Caspase-8-Aktivität in N- und H-Patienten unter Mitwirkung von CASP8-Inhibitor (Z-IETD-FMK); \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ns: nicht signifikant

## 5. Diskussion

Die Hypervolämie ist ein häufig bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen auftretender Zustand, welcher nicht nur die Erhöhung des Blutdruckes zur Folge hat, sondern auch eine enge Verbindung zur Inflammation darstellt und somit zu einer Verschlechterung der Prognose führt (Borrelli et al. 2020; Gangji et al. 2009). Hämodialysepatienten sind von einem ständigen, unterschwelligem entzündlichen Zustand betroffen, welcher durch die Induktion von proinflammatorischen Zytokinen und das Vorhandensein von Endotoxinen hervorgerufen wird (Canaud et al. 2021). Mit der Hypervolämie in CKD-Patienten wurden vor allem die entzündungsfördernden Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  in Verbindung gebracht (Hung et al. 2014), wobei im Rahmen dieser Pilotstudie vor allem der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  und weitere Entzündungsmediatoren wie die Caspase 4 sowie der NF $\kappa$ B-Signalweg bei 40 normo- und hypervolämischen Hämodialysepatienten analysiert wurden.

Aus den klinisch ermittelten Werten konnte gezeigt werden, dass bei überwässerten Patienten wie erwartet ein höheres ECW und Gesamtkörperwasser vorlag. Das ECW/TBW-Verhältnis nach der Dialyse ist ein signifikantes Zeichen für die Hyperhydratation und ein wichtiger Parameter für die Ermittlung des Mortalitätsrisikos, welches außerdem durch verschiedene Faktoren wie Alter und Begleiterkrankungen begünstigt werden kann. Während der Grenzwert in der Studie von Kim et al. im Jahre 2018 als 0,40 festgelegt wurde, definierten Pèrez-Morales et al. den Cut-off-Wert als 0,5023. Der Unterschied zwischen den beiden Studien lag darin, dass der Wert der erstgenannten Studie vor der Dialyse ermittelt wurde, während der Letztere der beiden nach dieser erfolgte. Abgesehen von den festgelegten Grenzwerten sind sich beide Studien in der negativen Auswirkung der anhaltenden Flüssigkeitsüberlastung auf die Lebenserwartung der Hämodialysepatienten einig (Kim et al. 2018; Pèrez-Morales et al. 2021). Ein weiterer klinischer Parameter - das C-reaktive Protein - wurde in der vorliegenden Arbeit in normo- und hypervolämischen HD-Patienten untersucht und zeigte sich bei den Überwässerten erhöht und spiegelte somit den inflammatorischen Charakter der Hypervolämie wider. Dieser Effekt wurde auch in den Studien von Dekker et al. und Jacobs et al. reflektiert und bekräftigen somit den Zusammenhang zwischen

der Hypervolämie und der Inflammation. Dekker et al. stellten die Ergebnisse einer Kohortenstudie von fast 9000 Hämodialysepatienten vor, bei denen während eines dreimonatigen Intervalls der Flüssigkeitsstatus und der Entzündungswert CRP ermittelt wurden. Hierbei stellte sich heraus, dass die Hypervolämie, mit oder ohne Anwesenheit einer Entzündung, ein signifikanter Risikofaktor für die Kurzzeitmortalität darstellt (Jacobs et al. 2010; Dekker et al. 2017). Interessant ist außerdem zu sehen, dass in unserer Studie dreimal so viele hypervoläme Patienten zusätzlich an Diabetes mellitus erkrankt waren als Normovoläme. Die in der Umgangssprache als „Zuckerkrankheit“ bezeichnete Stoffwechselerkrankung stellt die häufigste Ursache für die terminale Niereninsuffizienz dar und findet sich in vielen CKD-Patienten wieder. Neben der Abnahme der Nierenfunktion spielt dies auch eine große Rolle in der Entstehung von kardiovaskulären Ereignissen (Han et al. 2020). In der Studie von Tsai et al. wurde der Zusammenhang zwischen der Hypervolämie und dem Diabetes mellitus bei den CKD-Stadien 4 und 5 betrachtet. Durch den hohen Blutzuckerspiegel kommt es bei Diabetikern zu einem vermehrten Durstgefühl, welches mit der Flüssigkeitsaufnahme durch die Nahrung und der eingeschränkten Funktion des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems letztendlich zu der Dysbalance des Flüssigkeitshaushaltes beiträgt und somit die Flüssigkeitsüberlastung mit fördert. Die Hypervolämie zeigt sich neben dem Diabetes mellitus jedoch als dominierender Risikofaktor und kann mit oder ohne Mitwirkung von dieser die Verschlechterung der Nierenfunktion bedingen und die Progression der CKD beeinflussen (Tsai et al. 2013). Die Wirkung der Volumenüberlastung auf den Blutdruck wurde auch in unserer durchgeführten Studie beschrieben. Die hier ermittelten erhöhten Blutdruckwerte bei hypervolämen Hämodialysepatienten bekräftigen die Aussagen der Studie von Vidal-Petiot et al., indem verdeutlicht wird, dass ein hoher ECW-Wert mit einem hohen Hypertonierisiko in Verbindung steht und die Prognose bei terminaler Niereninsuffizienz negativ beeinflussen kann (Vidal-Petiot et al. 2018). Hierbei ist eine strenge Diät sowie Kontrolle der Flüssigkeitszunahme bei CKD-Patienten die Quintessenz.

Der entzündliche Charakter der Hypervolämie spiegelt sich in unserer Studie auch auf zellulärer Ebene wider. Die erhöhte Anzahl von CD45-positiven Leukozyten bei überwässerten Patienten, die durch den TruCount-Versuch und durch die

durchflusszytometrische Analyse der Blutproben der Probanden ermittelt wurden, bekräftigt den Trend der hohen CD45-Werte bei Hypervolämien. Das CD45-Antigen (auch als „leukocyte common antigen“ bezeichnet) befindet sich mit Ausnahme der Erythrozyten auf allen hämatopoetischen Zellen, dient der Aktivierung und Differenzierung dieser und erfüllt somit eine wichtige Funktion im Immunsystem (Nakano et al. 1990). Zu den Leukozyten gehören die Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Auch wenn das Augenmerk unserer Arbeit auf den Monozyten und Lymphozyten lag, wurde bei den für die Studie betrachteten Hämodialysepatienten allein eine Erhöhung der Granulozyten festgestellt. Granulozyten werden in die eosinophilen, neutrophilen und basophilen Granulozyten unterteilt, wobei der neutrophile Subtyp die häufigste im Blut zirkulierende Leukozytenpopulation des menschlichen Körpers darstellt und bekannt für ihre Teilnahme an Entzündungen und Infektion ist. Wie auch in unserer Studie wurde eine Erhöhung der Granulozyten in der Studie von Bieber et al. erfasst. Hierbei wurden CKD-Patienten auf die neutrophilen Granulozyten untersucht und dabei eine erhöhte Beteiligung und Aktivierung dieser während der Hämodialyse festgestellt (Bieber et al. 2020). Allein der Kontakt mit exogenen Dialysebestandteilen wie Dialysemembranen und Katheter, aber auch andere Faktoren wie oxidativer Stress, Hypoxie, Hypervolämie, Immundysfunktionen und urämische Toxine verstärken diesen Effekt und begünstigen die chronische Inflammation bei Dialysepatienten (Cobo et al. 2018). Die Hypothese, dass hypervolämischer Stress zu einer schnellen Zunahme der Leukozytenzahl, insbesondere der Granulozyten, führt (Nave et al. 2000), unterstützt in diesem Fall die von uns gewonnenen Werte der hypervolämien Probanden und lässt die hohe Anzahl der Granulozyten und Leukozyten der Studie gut erklären.

Die Hypervolämie als auch Inflammation sind zwei Risikofaktoren, die das Mortalitätsrisiko bei HD-Patienten beeinflussen und durch ihr kombiniertes Dasein das Risikoprofil weitgehend steigern können (Dekker et al. 2018). In Bezug dazu wurde in der hier durchgeführten Studie die Beziehung der Hypervolämie und der die Inflammation fördernden Faktoren genauer unter die Lupe genommen und analysiert: In der vorläufigen Studie von Ulrich et al. wurde festgestellt, dass bei hypervolämien HD-Patienten ein erhöhter IL-6-Spiegel vorlag. Da IL-6 zu den proinflammatorischen

Zytokinen gehört und sehr wahrscheinlich auch der Inflammation in Hämodialysepatienten beiträgt (Ulrich et al. 2020), wurde in dieser Studie die Aufmerksamkeit auf ein weiteres entzündungsförderndes Zytokin - dem Tumornekrosefaktor  $\alpha$  - gelenkt. Dieser spielt mit seinen beiden Rezeptoren, insbesondere dem TNFR1, eine Schlüsselrolle im Inflammationsgeschehen, indem es verschiedene Signalwege, unter anderem den NF $\kappa$ B-Signalweg, aktiviert, an der Regulierung von Zytokinen und Chemokinen beteiligt ist und die Apoptose sowie das Zellüberleben beeinflusst (Ruiz et al. 2021). In unserer Studie konnten keine Unterschiede hinsichtlich des TNF- $\alpha$  zwischen normo- und hypervolämischen HD-Patienten aufgezeigt werden. Die mRNA-TNF- $\alpha$ - und TNFR1-Rezeptor-Expressionen, sowie TNF- $\alpha$  in den Zellkulturüberständen und in den intrazellulären FACS-Analysen im Serum zwischen den beiden Probandengruppen sind kongruent. Die TNF- $\alpha$  Expression wird in Hypervolämien nicht stärker induziert als in Normovolämien. Dies stellt somit einen Widerspruch zu der Studie von Hung et al. dar, in der 338 CKD4-5 Patienten mit Volumenüberlastung untersucht wurden, bei denen neben den erhöhten IL-6 Werten auch eine Erhöhung des TNF- $\alpha$ -Spiegels festgestellt wurde. Im Gegensatz dazu konnten Beberashvilli und Kollegen bei der Untersuchung von 250 hypervolämischen HD-Patienten keine Veränderungen in den Werten von TNF- $\alpha$  vorfinden und kommen damit unseren Ergebnissen sehr nahe (Beberashvilli et al. 2014). Es kann nun darauf zurückgeschlossen werden, dass durch das Einbinden einer größeren Probandengruppe genauere Aussagen zur Beziehung von TNF- $\alpha$  und der Hypervolämie getroffen werden können. Unsere Pilotstudie mit ihren 40 eingebundenen HD-Patienten können dafür erste Einblicke liefern, müsste jedoch, um eine letztendliche Schlussfolgerung ziehen zu können, in der Größe des Patientenkollektivs erweitert werden.

Auf der Transkriptionsebene wird die Expression von TNF- $\alpha$  durch verschiedene Faktoren reguliert, darunter auch der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B. Andersherum induziert TNF- $\alpha$  die Aktivierung von NF $\kappa$ B (Parameswaran, Narayanan 2010). Dabei ist die Phosphorylierung seiner Untereinheiten RelA und RelB essentiell in der Ausübung seiner Funktion, da NF $\kappa$ B zumal ohne die Phosphorylierung inaktiv vorliegt. Die ortsspezifische Phosphorylierung der NF $\kappa$ B-Dimere bestimmt die Beständigkeit und Degradation und die Transkriptionsaktivität dieser. Es ist bekannt, dass RelA (p65) durch

die Stimulation von IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$  an der Position S529 phosphoryliert wird, was wiederum zu einer erhöhten Transkriptionsaktivität von p65 führt (Christian et al. 2016). Wang et al. konnten aufzeigen, dass die Phosphorylierung durch TNF- $\alpha$  ausschließlich an der oben genannten Serinposition stattfindet, und schlussfolgerten, dass durch diese Modifikation die Translokation in den Zellkern sowie die Bindungsfähigkeit an die DNA nicht beeinträchtigt, sondern nur das Transkriptionspotenzial von NF $\kappa$ B erhöht werden (Wang et al. 1998). In den von uns gewonnenen Ergebnissen konnten keine Unterschiede in der Phosphorylierung sowie der Häufigkeit von RelA in normo- und hypervolämen Probanden festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass eine Erhöhung des TNF- $\alpha$ -Spiegels nicht zwangsläufig in hypervolämen Patienten vorliegen muss. Im Gegensatz zu diesem wurde kein Effekt von TNF- $\alpha$  auf die RelB-Expression ermittelt (Baud et al. 2016). Als der einzige NF $\kappa$ B-Subtyp kann RelB keine Homodimere bilden und ist nur durch die Ankopplung an p50 oder p52 stabil und in der Lage, eine starke Transkriptionsaktivität auszulösen (ebd.). Schon Anfang der 2000er konnten Marienfeld und Kollegen Aussagen über die regulatorische Funktion von RelB auf die NF $\kappa$ B-Genexpression treffen, indem sie nachweisen konnten, dass die Phosphorylierung an der Position S552 des RelB-Subtyps zu dessen Abbau führt und somit die NF $\kappa$ B-Aktivität beeinträchtigt (Marienfeld et al. 2001). In der Studie von Christian et al. wurde auf die vielseitige Rolle des RelBs aufmerksam gemacht, die sich durch die posttranslationalen Modifikationen wie die der ortsständigen Phosphorylierung etabliert. Neben der Phosphorylierung von S552 kann auch diese an der Position 472 stattfinden und die gegensätzliche Wirkung hervorrufen (Christian et al. 2016). In der von uns durchgeführten Studie wurden nur in den Monozyten von normovolämen Patienten erhöhte RelB-Werte ermittelt. Gleichzeitig wurden bei diesen Patienten niedrige IL-12B-Spiegel gemessen, welches ein proinflammatorisches Zytokin darstellt. Der Studie von Saccani und Kollegen konnte entnommen werden, dass sich eine Besetzung des IL-12B-Promoters durch das RelB-Protein ereignen kann, welche letztendlich die Transkription und somit die inflammatorische Funktion von IL-12B beeinflusst (Saccani et al. 2003). Durch die Herunterregulierung der IL-12B Genexpression konnte somit auf die anti-inflammatorische Wirkung von RelB aufmerksam gemacht werden. Somit könnte geschlussfolgert werden, dass

normovoläme Patienten stärker in der Lage sind den NFκB-Aktivierungszustand zu beenden, wohingegen bei hypervolämen Patienten die Inflammation perpetuiert. Einen weiteren Schlüsselfaktor stellt die Stimulation des Transkriptionsfaktors NFκB mittels LPS dar. Hier konnten wir nachweisen, dass durch LPS die Proteine RelA und RelB in den Monozyten positiv beeinflusst werden und in Einklang mit den Ergebnissen von Bhattacharyya und Kollegen stehen. Diese konnten aufzeigen, dass sowohl der kanonische als auch der nicht-kanonische Signalweg durch LPS vermehrt aktiviert werden und somit die Transkriptionsergebnisse beeinflussen können (Bhattacharyya et al. 2010). Interessant ist jedoch, dass nur die Monozyten und nicht die T-Zellen dies vorwiesen. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Monozyten eine hohe Plastizität gegenüber Krankheitserregern und Umwelteinflüssen aufzeigen und ihre Funktionen dynamisch anpassen können.

LPS stellt einen starken Reiz für die Monozyten dar, die als Reaktion darauf große Mengen an entzündungsfördernden Zytokinen wie IL-6 und TNF-α sezernieren, aber auch die Produktion von IL-10 anregen können. Schon niedrige Konzentrationen an LPS, das sich an das CD14-Glykoprotein der Monozyten bindet, kann zu diesem Effekt führen (van der Bruggen et al. 1999). Auch in unserer Studie konnte beobachtet werden, dass bei beiden Probandengruppen durch eine geringfügige LPS-Menge (10ng/ml Endkonzentration) ein Anstieg der TNF-α-Produktion in den CD14<sup>+</sup>-Monozyten vorlag. Dies deutet daher darauf hin, dass durch LPS in allen Fällen eine Grundlage für Entzündung geschaffen wird und im Falle der Hypervolämie dieses dadurch verstärkt werden kann. In der Studie von Chaiwut und Kasinrek wurde die Interaktion von LPS mit den PBMCs untersucht. Hierbei konnten sie feststellen, dass durch die Wirkung von niedrig-konzentriertem LPS die CD14<sup>+</sup>-Monozyten rapid stimuliert und zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF-α und Chemokinen angeregt werden, während die Wirkung von LPS auf CD3-T-Zellen gar nicht oder nur gering aufgezeigt werden konnte (Chaiwut, Kasinrek 2022). Die in unserer Studie ermittelten Ergebnisse bestätigen diese Aussage, da hier die Stimulation der T-Zellen mittels LPS und somit die Freisetzung von TNF-α weitaus weniger erfolgt sind als bei den Monozyten. Interessant ist jedoch, dass bei hypervolämen Patienten im Gegensatz zur Normovolämie durch LPS eine signifikant vermehrte TNF-α-Produktion vorliegt, welche darauf zurückgeführt

werden könnte, dass durch das bereits vorhandene entzündliche Milieu, denen die T-Zellen ausgesetzt sind, schon zur Produktion von TNF- $\alpha$  angeregt wurden und somit dieser Effekt durch LPS weiter verstärkt wird. Des Weiteren konnten wir durch die Zugabe von Indoxylsulfat, ein urämisches Toxin, welches zum apoptotischen und nekrotischen Zelltod der Tubuszellen in der Niere führt und die systemische Inflammation fördert (Cheng et al. 2020), keine zusätzlich stimulierende Wirkung bei den Monozyten und T-Zellen in der TNF- $\alpha$ -Produktion ausfindig machen. Da anzunehmen ist, dass die Hypervolämie die Veränderung des Mikrobioms und die interstitielle Permeabilität herbeiführen kann, wird sehr stark davon ausgegangen, dass diese die I3S-Konzentration erhöht und somit den entzündlichen Zustand in CKD-Patienten verstärkt (Wang et al. 2020). In unserer Studie konnten wir jedoch das Verhältnis zwischen Hypervolämie, I3S und Inflammation nicht nachweisen und es bedarf daher weitere Abklärung in diese Richtung.

Die Involvierung eines vorhandenen Pathways des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors wurde durchgehend in unserer Studie in den Fokus genommen. Dieser ist ein multifunktionaler Ligand, der zahlreiche Zellprozesse wie die Zellproliferation und Apoptose reguliert und die Immunantwort durch die Beeinflussung von Immunzellen steuert (Gutiérrez-Vázquez, Quintane 2018; Mo et al. 2020). Der Begriff „multifunktional“ bezieht sich im Falle des AhRs auf seine entzündungsfördernde und -hemmende Wirkung, die den Verlauf der CKD fördern, aber auch hemmen kann. Die AhR-Funktion wird jedoch stark von Umwelteinflüssen wie Dioxine, Nahrungsmittel, Medikamente und Krankheitserregern beeinflusst (Curran, Kopp 2022). Beim Betrachten der Wirkung des AhRs auf die Produktion von TNF- $\alpha$  in Monozyten und T-Zellen wurde in unserer Studie kein Zusammenhang festgestellt. Einzig bei Monozyten der normovolämen Probandengruppe wurde durch den Einsatz eines AhR-Antagonisten eine Wirkung erzielt, die in diesem Falle auf die anti-inflammatorische Wirkung des Liganden vermuten lässt, da durch das Hemmen des Rezeptors weiterhin eine verstärkte inflammatorische Reaktion vorlag.

Hinsichtlich der Hypervolämie wurde in unserer Studie ein weiterer Entzündungsmediator - die Caspase 4 - in den beiden Probandengruppen untersucht. Hierbei konnten wir nachweisen, dass in überwässerten Patienten die CASP4-Aktivität

erhöht war. Die CASP4 ist eine Protease, der zwei Funktionen zugeschrieben werden: die Inflammation und Apoptose. Im Hinblick auf die Inflammation spielt die CASP4 eine zentrale Rolle in dem durch LPS-erzeugten Signalweg sowie der Aktivierung von NFκB und Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (Lakshmanan, Porter 2007). Als Sensor für die intrazelluläre bakterielle Last wird die CASP4-Aktivität zudem mit dem Nachweis von LPS assoziiert. Der Hauptakteur LPS kann entweder extrazellulär vorliegen und sich an das TLR4/MD2-Komplex binden oder intrazellulär vorkommen und den CASP4/5-Signalweg aktivieren. Dabei wird das Lipid A, ein Bestandteil des LPS, gebunden. Dadurch kommt es bei beiden Signalwegen zur Auslösung einer Reihe von proinflammatorischen Signalkaskaden, die dann zur Entstehung von akuten und chronischen Entzündungsgeschehen führen (Zamyatina, Heine 2020). In Bezug zu diesen Erkenntnissen könnte behauptet werden, dass die erhöhte Aktivität von CASP4 in hypervolämen Patienten unserer Studie mit einer hohen LPS- bzw. Bakterienlast einhergeht. Die Aktivität von CASP4 kann auch durch andere Faktoren wie dem I3S beeinflusst werden. Hierzu kann die Vorläuferstudie von Ulrich et al. herangezogen werden, in der nachgewiesen werden konnte, dass I3S in hohen Konzentrationen in der Lage wäre, CASP4 zu aktivieren (Ulrich et al. 2022). Letztendlich können die oben beschriebenen Erkenntnisse wichtige Grundlagen für die Erforschung des inflammatorischen Charakters der Hypervolämie darstellen.

Die Caspase 8, ein Multiplayer, das an verschiedenen Prozessen wie die der Apoptose, Expression von inflammatorischen Zytokinen, Inflammasomenaktivierung und Spaltung von IL-1β beteiligt sein kann, kann sowohl von LPS als auch TNF-α in Folge einer Signalkaskade aktiviert werden (Orning, Lien 2021). Um den Grad der unspezifischen Caspase-Aktivität im durchgeführten Assay zu detektieren, wurde der CASP8-Inhibitor Z-IETD-FMK verwendet. Hierbei wurde nur eine geringe Hemmwirkung des Inhibitors in normo- und hypervolämen Patienten ermittelt. Somit konnte weitestgehend eine CASP8-Aktivität ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Inflammation in hypervolämen Hämodialysepatienten durch eine Vielzahl von Mechanismen beeinflusst wird und eine entscheidende Rolle für die Prognose von chronischen Nierenkranken spielt. In unserer Studie wurden in hypervolämen HD-Patienten keine erhöhten TNF-α-Werte

und stärkere inflammatorische monozytäre NFκB (RelA)-Aktivierung festgestellt. Eine erhöhte Inflammation trotz fehlender höherer TNF-α-Spiegel, ist bei hypervolämen HD-Patienten aufgrund der erhöhten CRP-Werte trotzdem wahrscheinlich. Im Einklang damit steht auch die erhöhte CASP4-Aktivität, die auf eine höhere bakterielle Belastung der Hypervolämen schließen lässt. Die erniedrigten RelB-Spiegel könnten Ausdruck einer gestörten RelA/RelB-Homöostase sein, da die RelB-Aktivierung als ein Abschaltmechanismus der proinflammatorischen NFκB-Aktivität dient. Die hier in dieser Studie ermittelten Erkenntnisse könnten somit als erste Anhaltspunkte dienen und somit eine solide Grundlage für die weitere Forschung schaffen. Das bessere Verständnis der Natur der Hypervolämie könnte klinische Resultate verbessern und die Anwendung neuer Behandlungsstrategien initiieren, welche somit den Krankheitsverlauf als auch das Mortalitätsrisiko in positive Richtung lenken könnte.

### **5.1 Einschränkungen**

Die Einschränkung dieser Pilotstudie liegt an der geringen Anzahl von eingebundenen Probanden, die nur aus dem Patientenkollektiv des KfH entnommen wurden. Ziel dieser Studie war es jedoch erste Einblicke in das Entzündungsgeschehen in hypervolämen Hämodialysepatienten zu erhalten und die Aufmerksamkeit auf die Thematik zu lenken. Die Multimorbidität der CKD-Patienten stellt einen weiteren Punkt dar, der während unserer Studie berücksichtigt werden muss, da durch diese die Signalwege und die zu ermittelnden Faktoren negativ beeinflusst werden könnten. Eine Verwässerung unserer Ergebnisse wäre eine mögliche Konsequenz. Bei dem Caspase-4-Validierungsassay könnten neben der Aktivität der Caspase 4 auch die der Caspase 8 nachgewiesen werden, da der Assay ein breites Substratspektrum aufweist. Dies hat jedoch geringe Auswirkungen auf unsere Studie gezeigt, da die Caspase-4-Aktivität, die der Caspase 8 wesentlich überwiegt.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abbas, Samer R.; Zhu, Fansan; Levin, Nathan W. (2015): Bioimpedance can solve problems of fluid overload. In: *Journal of renal nutrition: the official journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation* 25 (2), S. 234–237. DOI: 10.1053/j.jrn.2014.10.014.
- Adesso, Simona; Popolo, Ada; Bianco, Giuseppe; Sorrentino, Rosalinda; Pinto, Aldo; Autore, Giuseppina; Marzocco, Stefania (2013): The uremic toxin indoxyl sulphate enhances macrophage response to LPS. In: *PloS one* 8 (9), e76778. DOI: 10.1371/journal.pone.0076778.
- Akchurin, Oleh M.; Kaskel, Frederick (2015): Update on inflammation in chronic kidney disease. In: *Blood purification* 39 (1-3), S. 84–92. DOI: 10.1159/000368940.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. (2002): *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. T Cells and MHC Proteins. New York: Garland Science.
- Aliyu, Mansur; Zohora, Fatema Tuz; Anka, Abubakar Umar; Ali, Kashif; Maleknia, Shayan; Saffarioun, Mohammad; Azizi, Gholamreza (2022): Interleukin-6 cytokine: An overview of the immune regulation, immune dysregulation, and therapeutic approach. In: *International immunopharmacology* 111, S. 109130. DOI: 10.1016/j.intimp.2022.109130.
- Antwerpes, Frank; No (2022): <https://flexikon.doccheck.com/de/Durchflusszytometrie>. Letzter Zugriff am 21.06.2024 um 16:28 Uhr.
- Baker, Paul J.; Boucher, Dave; Bierschenk, Damien; Tebartz, Christina; Whitney, Paul G.; D'Silva, Damian B. et al. (2015): NLRP3 inflammasome activation downstream of cytoplasmic LPS recognition by both caspase-4 and caspase-5. In: *European journal of immunology* 45 (10), S. 2918–2926. DOI: 10.1002/eji.201545655.
- Baud, Véronique; Collares, Davi (2016): Post-Translational Modifications of RelB NF- $\kappa$ B Subunit and Associated Functions. In: *Cells* 5 (2). DOI: 10.3390/cells5020022.
- Beberashvili, I.; Azar, A.; Sinuani, I.; Shapiro, G.; Feldman, L.; Stav, K. et al. (2014): Bioimpedance phase angle predicts muscle function, quality of life and clinical outcome in maintenance hemodialysis patients. In: *European journal of clinical nutrition* 68 (6), S. 683–689. DOI: 10.1038/ejcn.2014.67.
- Belge, Kai-Uwe; Dayyani, Farshid; Horelt, Alexia; Siedlar, Maciej; Frankenberger, Marion; Frankenberger, Bernhard et al. (2002): The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168 (7), S. 3536–3542. DOI: 10.4049/jimmunol.168.7.3536.
- Bhattacharyya, Sumit; Borthakur, Alip; Dudeja, Pradeep K.; Tobacman, Joanne K. (2010): Lipopolysaccharide-induced activation of NF- $\kappa$ B non-canonical pathway requires BCL10 serine 138 and NIK phosphorylations. In: *Experimental cell research* 316 (19), S. 3317–3327. DOI: 10.1016/j.yexcr.2010.05.004.

- Bieber, Scott; Muczynski, Kimberly A.; Lood, Christian (2020): Neutrophil Activation and Neutrophil Extracellular Trap Formation in Dialysis Patients. In: *Kidney medicine* 2 (6), S. 692–698.e1. DOI: 10.1016/j.xkme.2020.06.014.
- Black, R. A.; Kronheim, S. R.; Merriam, J. E.; March, C. J.; Hopp, T. P. (1989): A Pre-aspartate-specific Protease from Human Leukocytes That Cleaves Pro-interleukin-1  $\beta$ . In: *Journal of Biological Chemistry* 264 (10), S. 5323–5326. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)83546-3.
- Black, R. A.; Rauch, C. T.; Kozlosky, C. J.; Peschon, J. J.; Slack, J. L.; Wolfson, M. F. et al. (1997): A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. In: *Nature* 385 (6618), S. 729–733. DOI: 10.1038/385729a0.
- Borrelli, Silvio; Provenzano, Michele; Gagliardi, Ida; Michael, Ashour; Liberti, Maria Elena; Nicola, Luca de et al. (2020): Sodium Intake and Chronic Kidney Disease. In: *International journal of molecular sciences* 21 (13). DOI: 10.3390/ijms21134744.
- Bradley, J. R. (2008): TNF-mediated inflammatory disease. In: *The Journal of pathology* 214 (2), S. 149–160. DOI: 10.1002/path.2287.
- Canaud, Bernard; Stephens, Melanie P.; Nikam, Milind; Etter, Michael; Collins, Allan (2021): Multitargeted interventions to reduce dialysis-induced systemic stress. In: *Clinical kidney journal* 14 (Suppl 4), i72-i84. DOI: 10.1093/ckj/sfab192.
- Chaiwut, Ratthakorn; Kasinrer, Watchara (2022): Very low concentration of lipopolysaccharide can induce the production of various cytokines and chemokines in human primary monocytes. In: *BMC research notes* 15 (1), S. 42. DOI: 10.1186/s13104-022-05941-4.
- Chen, Teresa K.; Knicely, Daphne H.; Grams, Morgan E. (2019): Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management: A Review. In: *JAMA* 322 (13), S. 1294–1304. DOI: 10.1001/jama.2019.14745.
- Cheng, Tong-Hong; Ma, Ming-Chieh; Liao, Min-Tser; Zheng, Cai-Mei; Lu, Kuo-Cheng; Liao, Chun-Hou et al. (2020): Indoxyl Sulfate, a Tubular Toxin, Contributes to the Development of Chronic Kidney Disease. In: *Toxins* 12 (11). DOI: 10.3390/toxins12110684.
- Chioccioli, Maurizio; Hankamer, Ben; Ross, Ian L. (2014): Flow cytometry pulse width data enables rapid and sensitive estimation of biomass dry weight in the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella vulgaris*. In: *PloS one* 9 (5), e97269. DOI: 10.1371/journal.pone.0097269.
- Christian, Frank; Smith, Emma L.; Carmody, Ruaidhrí J. (2016): The Regulation of NF- $\kappa$ B Subunits by Phosphorylation. In: *Cells* 5 (1). DOI: 10.3390/cells5010012.
- Chu, Wen-Ming (2013): Tumor necrosis factor. In: *Cancer letters* 328 (2), S. 222–225. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.10.014.
- Cobo, Gabriela; Lindholm, Bengt; Stenvinkel, Peter (2018): Chronic inflammation in end-stage renal disease and dialysis. In: *Nephrology, dialysis, transplantation: official*

*publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 33 (suppl\_3), iii35-iii40. DOI: 10.1093/ndt/gfy175.

Corthay, A. (2009): How do regulatory T cells work? In: *Scandinavian journal of immunology* 70 (4), S. 326–336. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2009.02308.x.

Curran, Colleen S.; Kopp, Jeffrey B. (2022): Aryl Hydrocarbon Receptor Mechanisms Affecting Chronic Kidney Disease. In: *Frontiers in pharmacology* 13, S. 782199. DOI: 10.3389/fphar.2022.782199.

Dekker, Marijke J. E.; Marcelli, Daniele; Canaud, Bernard J.; Carioni, Paola; Wang, Yuedong; Grassmann, Aileen et al. (2017): Impact of fluid status and inflammation and their interaction on survival: a study in an international hemodialysis patient cohort. In: *Kidney international* 91 (5), S. 1214–1223. DOI: 10.1016/j.kint.2016.12.008.

Dekker, Marijke J. E.; van der Sande, Frank M.; van den Berghe, Florence; Leunissen, Karel M. L.; Kooman, Jeroen P. (2018): Fluid Overload and Inflammation Axis. In: *Blood purification* 45 (1-3), S. 159–165. DOI: 10.1159/000485153.

Derudder, Emmanuel; Dejardin, Emmanuel; Pritchard, Linda L.; Green, Douglas R.; Korner, Marie; Baud, Veronique (2003): RelB/p50 dimers are differentially regulated by tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin-beta receptor activation: critical roles for p100. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (26), S. 23278–23284. DOI: 10.1074/jbc.M300106200.

Espinoza, Valerie E.; Emmady, Prabhu D. (2024): StatPearls. Histology, Monocytes. Treasure Island (FL).

Gangji, Azim S.; Brimble, K. Scott; Margetts, Peter J. (2009): Association between markers of inflammation, fibrosis and hypervolemia in peritoneal dialysis patients. In: *Blood purification* 28 (4), S. 354–358. DOI: 10.1159/000232937.

Gonçalves, Simone; Pecoits-Filho, Roberto; Perreto, Sônia; Barberato, Silvio H.; Stinghen, Andréa E. M.; Lima, Emmanuel G. A. et al. (2006): Associations between renal function, volume status and endotoxaemia in chronic kidney disease patients. In: *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 21 (10), S. 2788–2794. DOI: 10.1093/ndt/gfl273.

Greite, Robert; Schmidt-Ott, Kai (2022): Was ist gesichert in der Therapie der chronischen Nierenerkrankung? In: *Innere Medizin (Heidelberg, Germany)* 63 (12), S. 1237–1243. DOI: 10.1007/s00108-022-01422-9.

Gutiérrez-Vázquez, Cristina; Quintana, Francisco J. (2018): Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. In: *Immunity* 48 (1), S. 19–33. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.12.012.

Han, Byoung-Geun; Lee, Jun Young; Kim, Mi Ryung; Shin, Hanwul; Kim, Jae-Seok; Yang, Jae-Won; Kim, Jong Yeon (2020): Fluid overload is a determinant for cardiac structural and functional impairments in type 2 diabetes mellitus and chronic kidney disease stage

5 not undergoing dialysis. In: *PloS one* 15 (7), e0235640. DOI: 10.1371/journal.pone.0235640.

Hauk, Andrea (2013): Quantifizierung von DNA durch Absorptionsmessung. In: *Biologie in unserer Zeit* 43 (5), S. 278. DOI: 10.1002/biuz.201390093.

Heine, G. H.; Ulrich, C.; Seibert, E.; Seiler, S.; Marell, J.; Reichart, B. et al. (2008): CD14(++) CD16+ monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients. In: *Kidney international* 73 (5), S. 622–629. DOI: 10.1038/sj.ki.5002744.

Hirayama, Daisuke; Iida, Tomoya; Nakase, Hiroshi (2017): The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. In: *International journal of molecular sciences* 19 (1). DOI: 10.3390/ijms19010092.

Hitomi, Junichi; Katayama, Taiichi; Eguchi, Yutaka; Kudo, Takashi; Taniguchi, Manabu; Koyama, Yoshihisa et al. (2004): Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. In: *The Journal of cell biology* 165 (3), S. 347–356. DOI: 10.1083/jcb.200310015.

Horn, Florian (2019): Biochemie des Menschen. Das Lehrbuch für das Medizinstudium. Unter Mitarbeit von Isabelle Moc, Paul Ziegler und Silke Berghold. 7., korrigierte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag (Thieme E-Book Library Studium & Lehre). Online verfügbar unter <https://eref.thieme.de/ebooks/2373922>.

Huang, Shih-Yu; Chen, Yi-Ann; Chen, Shih-Ann; Chen, Yi-Jen; Lin, Yung-Kuo (2016): Uremic Toxins - Novel Arrhythmogenic Factor in Chronic Kidney Disease - Related Atrial Fibrillation. In: *Acta Cardiologica Sinica* 32 (3), S. 259–264. DOI: 10.6515/acs20151116a.

Humphreys, M. H. (1994): Mechanisms and management of nephrotic edema. In: *Kidney international* 45 (1), S. 266–281. DOI: 10.1038/ki.1994.33.

Hung, Szu-Chun; Kuo, Ko-Lin; Peng, Ching-Hsiu; Wu, Che-Hsiung; Lien, Yu-Chung; Wang, Yi-Chun; Tarng, Der-Cherng (2014): Volume overload correlates with cardiovascular risk factors in patients with chronic kidney disease. In: *Kidney international* 85 (3), S. 703–709. DOI: 10.1038/ki.2013.336.

Imre, Gergely (2020): The involvement of regulated cell death forms in modulating the bacterial and viral pathogenesis. In: *International review of cell and molecular biology* 353, S. 211–253. DOI: 10.1016/bs.ircmb.2019.12.008.

Jacobs, Leo H.; van de Kerkhof, Jos J.; Mingels, Alma M.; Passos, Valéria Lima; Kleijnen, Vincent W.; Mazairac, Albert H. et al. (2010): Inflammation, overhydration and cardiac biomarkers in haemodialysis patients: a longitudinal study. In: *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 25 (1), S. 243–248. DOI: 10.1093/ndt/gfp417.

Jacque, Emilie; Tchenio, Thierry; Piton, Guillaume; Romeo, Paul-Henri; Baud, Véronique (2005): RelA repression of RelB activity induces selective gene activation downstream of TNF receptors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (41), S. 14635–14640. DOI: 10.1073/pnas.0507342102.

- Jung, T.; Schauer, U.; Heusser, C.; Neumann, C.; Rieger, C. (1993): Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. In: *Journal of immunological methods* 159 (1-2), S. 197–207. DOI: 10.1016/0022-1759(93)90158-4.
- Kang, Sujin; Tanaka, Toshio; Narazaki, Masashi; Kishimoto, Tadimitsu (2019): Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic. In: *Immunity* 50 (4), S. 1007–1023. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.03.026.
- Kany, Shinwan; Vollrath, Jan Tilmann; Relja, Borna (2019): Cytokines in Inflammatory Disease. In: *International journal of molecular sciences* 20 (23). DOI: 10.3390/ijms20236008.
- Kawai, Taro; Akira, Shizuo (2010): The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. In: *Nature immunology* 11 (5), S. 373–384. DOI: 10.1038/ni.1863.
- KfH-Nierenzentrum: <https://www.kfh.de/nierenzentrum/halle/startseite/>. Letzter Zugriff am 19.06.2024 um 15:07.
- Khehra, Nimrat; Padda, Inderbir S.; Swift, Cathi J. (2024): StatPearls. Polymerase Chain Reaction (PCR). Treasure Island (FL).
- Khukhlaeva, Julia: diss\_j.halkin.
- Kim, Chae Rim; Shin, Jung-Ho; Hwang, Jin Ho; Kim, Su Hyun (2018): Monitoring Volume Status Using Bioelectrical Impedance Analysis in Chronic Hemodialysis Patients. In: *ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs: 1992)* 64 (2), S. 245–252. DOI: 10.1097/MAT.0000000000000619.
- Kim, Hee Young; Yoo, Tae-Hyun; Hwang, Yuri; Lee, Ga Hye; Kim, Bonah; Jang, Jiyeon et al. (2017): Indoxyl sulfate (IS)-mediated immune dysfunction provokes endothelial damage in patients with end-stage renal disease (ESRD). In: *Scientific reports* 7 (1), S. 3057. DOI: 10.1038/s41598-017-03130-z.
- Kumar, S. (2007): Caspase function in programmed cell death. In: *Cell death and differentiation* 14 (1), S. 32–43. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402060.
- Lakshmanan, Umayal; Porter, Alan G. (2007): Caspase-4 interacts with TNF receptor-associated factor 6 and mediates lipopolysaccharide-induced NF-kappaB-dependent production of IL-8 and CC chemokine ligand 4 (macrophage-inflammatory protein-1). In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179 (12), S. 8480–8490. DOI: 10.4049/jimmunol.179.12.8480.
- Li, Jixi; Yin, Qian; Wu, Hao (2013): Structural basis of signal transduction in the TNF receptor superfamily. In: *Advances in immunology* 119, S. 135–153. DOI: 10.1016/B978-0-12-407707-2.00005-9.
- Libermann, T. A.; Baltimore, D. (1990): Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. In: *Mol. Cell. Biol.* 10 (5), S. 2327–2334. DOI: 10.1128/MCB.10.5.2327.

- Liu, Chao; Chu, Dewei; Kalantar-Zadeh, Kourosh; George, Jacob; Young, Howard A.; Liu, Guozhen (2021): Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. In: *Advanced science (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Germany)* 8 (15), e2004433. DOI: 10.1002/advs.202004433.
- Liu, Ting; Zhang, Lingyun; Joo, Donghyun; Sun, Shao-Cong (2017): NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. In: *Signal transduction and targeted therapy* 2, 17023-. DOI: 10.1038/sigtrans.2017.23.
- Lüllmann-Rauch, Renate; Asan, Esther (2015): Taschenbuch Histologie. 5., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Mackay, Ian M.; Arden, Katherine E.; Nitsche, Andreas (2002): Real-time PCR in virology. In: *Nucleic acids research* 30 (6), S. 1292–1305. DOI: 10.1093/nar/30.6.1292.
- MACS Miltenyi Biotec. 2018: <https://www.miltenyibiotec.com/DE-en/products/macsqant-analyzer-10.html>. Letzter Zugriff am 19.06.2024 um 18:36 Uhr.
- MACS Miltenyi Biotec. 2018: <https://www.miltenyibiotec.com/DE-en/resources/macshandbook.html>. Letzter Zugriff am 19.06.2024 um 14:40 Uhr.
- Marienfeld, R.; Berberich-Siebelt, F.; Berberich, I.; Denk, A.; Serfling, E.; Neumann, M. (2001): Signal-specific and phosphorylation-dependent RelB degradation: a potential mechanism of NF-kappaB control. In: *Oncogene* 20 (56), S. 8142–8147. DOI: 10.1038/sj.onc.1204884.
- Martinon, Fabio; Burns, Kimberly; Tschopp, Jürg (2002): The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. In: *Molecular cell* 10 (2), S. 417–426. DOI: 10.1016/s1097-2765(02)00599-3.
- Martinon, Fabio; Tschopp, Jürg (2004): Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. In: *Cell* 117 (5), S. 561–574. DOI: 10.1016/j.cell.2004.05.004.
- McIlwain, David R.; Berger, Thorsten; Mak, Tak W. (2013): Caspase functions in cell death and disease. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5 (4), a008656. DOI: 10.1101/cshperspect.a008656.
- McKinnon, Katherine M. (2018): Flow Cytometry: An Overview. In: *Current protocols in immunology* 120, 5.1.1-5.1.11. DOI: 10.1002/cpim.40.
- Merino, Ana; Buendia, Paula; Martin-Malo, Alejandro; Aljama, Pedro; Ramirez, Rafael; Carracedo, Julia (2011): Senescent CD14+CD16+ monocytes exhibit proinflammatory and proatherosclerotic activity. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186 (3), S. 1809–1815. DOI: 10.4049/jimmunol.1001866.
- Mo, Yenan; Lu, Zhaoyu; Wang, Lixin; Ji, Chunlan; Zou, Chuan; Liu, Xusheng (2020): The Aryl Hydrocarbon Receptor in Chronic Kidney Disease: Friend or Foe? In: *Frontiers in cell and developmental biology* 8, S. 589752. DOI: 10.3389/fcell.2020.589752.
- Murphy, Kenneth; Weaver, Casey: Die Entwicklung der B- und T-Lymphocyten. In: S. 377–440.

- Nagasawa, Yasuyuki (2021): Positive and Negative Aspects of Sodium Intake in Dialysis and Non-Dialysis CKD Patients. In: *Nutrients* 13 (3). DOI: 10.3390/nu13030951.
- Nakano, A.; Harada, T.; Morikawa, S.; Kato, Y. (1990): Expression of leukocyte common antigen (CD45) on various human leukemia/lymphoma cell lines. In: *Acta pathologica japonica* 40 (2), S. 107–115. DOI: 10.1111/j.1440-1827.1990.tb01549.x.
- Nave, H.; Hörsten, S. von; Brabant, G.; Helfritz, F.; Drube, J.; Pabst, R. (2000): Leukocyte mobilization induced by hypervolemia is due to a combined alpha- and beta-adrenoceptor activation. In: *Comparative medicine* 50 (5), S. 495–497.
- Nockher, W. A.; Scherberich, J. E. (1998): Expanded CD14+ CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. In: *Infection and immunity* 66 (6), S. 2782–2790. DOI: 10.1128/IAI.66.6.2782-2790.1998.
- Orning, Pontus; Lien, Egil (2021): Multiple roles of caspase-8 in cell death, inflammation, and innate immunity. In: *Journal of leukocyte biology* 109 (1), S. 121–141. DOI: 10.1002/JLB.3MR0420-305R.
- Parameswaran, Narayanan; Patial, Sonika (2010): Tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling in macrophages. In: *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 20 (2), S. 87–103. DOI: 10.1615/critreveukargeneexpr.v20.i2.10.
- Pecoits-Filho, Roberto; Gonçalves, Simone; Barberato, Silvio H.; Bignelli, Alexandre; Lindholm, Bengt; Riella, Miguel C.; Stenvinkel, Peter (2004): Impact of residual renal function on volume status in chronic renal failure. In: *Blood purification* 22 (3), S. 285–292. DOI: 10.1159/000078699.
- Pérez-Morales, Rosa; Donate-Correa, Javier; Martín-Núñez, Ernesto; Pérez-Delgado, Nayra; Ferri, Carla; López-Montes, Aurora et al. (2021): Extracellular water/total body water ratio as predictor of mortality in hemodialysis patients. In: *Renal failure* 43 (1), S. 821–829. DOI: 10.1080/0886022X.2021.1922442.
- Piccoli, Antonio (2014): Estimation of fluid volumes in hemodialysis patients: comparing bioimpedance with isotopic and dilution methods. In: *Kidney international* 85 (4), S. 738–741. DOI: 10.1038/ki.2013.434.
- Pobezinskaya, Yelena L.; Liu, Zhenggang (2012): The role of TRADD in death receptor signaling. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 11 (5), S. 871–876. DOI: 10.4161/cc.11.5.19300.
- Rahman, Adeeb H.; Taylor, Devon K.; Turka, Laurence A. (2009): The contribution of direct TLR signaling to T cell responses. In: *Immunologic research* 45 (1), S. 25–36. DOI: 10.1007/s12026-009-8113-x.
- Rapa, Shara Francesca; Di Iorio, Biagio Raffaele; Campiglia, Pietro; Heidland, August; Marzocco, Stefania (2019): Inflammation and Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease-Potential Therapeutic Role of Minerals, Vitamins and Plant-Derived Metabolites. In: *International journal of molecular sciences* 21 (1). DOI: 10.3390/ijms21010263.

- Rogacev, Kyrill S.; Seiler, Sarah; Zawada, Adam M.; Reichart, Birgit; Herath, Esther; Roth, Daniel et al. (2011): CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. In: *European heart journal* 32 (1), S. 84–92. DOI: 10.1093/eurheartj/ehq371.
- Rose-John, Stefan (2020): Interleukin-6 signalling in health and disease. In: *F1000Research* 9. DOI: 10.12688/f1000research.26058.1.
- Rosengren, Bert-Inge; Sagstad, Solfrid J.; Karlsen, Tine V.; Wiig, Helge (2013): Isolation of interstitial fluid and demonstration of local proinflammatory cytokine production and increased absorptive gradient in chronic peritoneal dialysis. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 304 (2), F198-206. DOI: 10.1152/ajprenal.00293.2012.
- Ruiz, Andy; Palacios, Yadira; Garcia, Irene; Chavez-Galan, Leslie (2021): Transmembrane TNF and Its Receptors TNFR1 and TNFR2 in Mycobacterial Infections. In: *International journal of molecular sciences* 22 (11). DOI: 10.3390/ijms22115461.
- Sabat, Robert; Grütz, Gerald; Warszawska, Katarzyna; Kirsch, Stefan; Witte, Ellen; Wolk, Kerstin; Geginat, Jens (2010): Biology of interleukin-10. In: *Cytokine & growth factor reviews* 21 (5), S. 331–344. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2010.09.002.
- Saccani, Simona; Pantano, Serafino; Natoli, Gioacchino (2003): Modulation of NF-kappaB activity by exchange of dimers. In: *Molecular cell* 11 (6), S. 1563–1574. DOI: 10.1016/s1097-2765(03)00227-2.
- Sauls, Ryan S.; McCausland, Cassidy; Taylor, Bryce N. (2024): StatPearls. Histology, T-Cell Lymphocyte. Treasure Island (FL).
- Sekar, Rajesh Babu; Periasamy, Ammasi (2003): Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. In: *The Journal of cell biology* 160 (5), S. 629–633. DOI: 10.1083/jcb.200210140.
- Shalini, S.; Dorstyn, L.; Dawar, S.; Kumar, S. (2015): Old, new and emerging functions of caspases. In: *Cell death and differentiation* 22 (4), S. 526–539. DOI: 10.1038/cdd.2014.216.
- Shlipak, Michael G.; Fried, Linda F.; Crump, Casey; Bleyer, Anthony J.; Manolio, Teri A.; Tracy, Russell P. et al. (2003): Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency. In: *Circulation* 107 (1), S. 87–92. DOI: 10.1161/01.cir.0000042700.48769.59.
- Sohn, Dennis: Modulation der Aktivierung von Initiator-Caspasen in der Apoptose-Induktion.
- Steffel, Jan (Hg.) (2014): Niere und Ableitende Harnwege. Mit 56 Tabellen. Berlin, Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch).
- Stenvinkel, P.; Heimbürger, O.; Paultre, F.; Diczfalusy, U.; Wang, T.; Berglund, L.; Jogestrand, T. (1999): Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. In: *Kidney international* 55 (5), S. 1899–1911. DOI: 10.1046/j.1523-1755.1999.00422.x.

- Stolpe, Susanne; Scholz, Christian; Stang, Andreas; Böger, Carsten; Jung, Bettina; Kowall, Bernd; Blume, Cornelia (2022): Eine chronische Niereninsuffizienz, auch in höherem Stadium, ist Patienten häufig unbekannt – aber warum wissen Frauen noch seltener von ihrer Erkrankung als Männer? In: *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 147 (17), e70-e81. DOI: 10.1055/a-1819-0870.
- Sun, Shao-Cong (2011): Non-canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway. In: *Cell research* 21 (1), S. 71–85. DOI: 10.1038/cr.2010.177.
- Sun, Shao-Cong (2017): The non-canonical NF- $\kappa$ B pathway in immunity and inflammation. In: *Nature reviews. Immunology* 17 (9), S. 545–558. DOI: 10.1038/nri.2017.52.
- Tanaka, Toshio; Narazaki, Masashi; Kishimoto, Tadamitsu (2014): IL-6 in inflammation, immunity, and disease. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6 (10), a016295. DOI: 10.1101/cshperspect.a016295.
- Tartaglia, L. A.; Pennica, D.; Goeddel, D. V. (1993): Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (25), S. 18542–18548.
- Thermo Fisher Scientific; 24 January 2018: Introduction to Gene Expression Getting Started Guide (Pub. No. 4454239 Rev B).
- Tsai, Yi-Chun; Tsai, Jer-Chia; Chiu, Yi-Wen; Kuo, Hung-Tien; Chen, Szu-Chia; Hwang, Shang-Jyh et al. (2013): Is fluid overload more important than diabetes in renal progression in late chronic kidney disease? In: *PloS one* 8 (12), e82566. DOI: 10.1371/journal.pone.0082566.
- Ulrich, Christof; Fiedler, Roman; Markau, Silke; Girndt, Matthias (2022): FC020: The Uraemic Toxin Indoxyl Sulfate is an Activator Of Caspase-4 but not of Caspase-1 in Monocyte-Like THP-1 Cells. In: *Nephrology Dialysis Transplantation* 37 (Supplement\_3), Artikel gfac098.003. DOI: 10.1093/ndt/gfac098.003.
- Ulrich, Christof; Wilke, Annegret; Schleicher, Nadja; Girndt, Matthias; Fiedler, Roman (2020): Hypervolemia-Induced Immune Disturbances Do Not Involve IL-1 $\beta$  but IL-6 and IL-10 Activation in Haemodialysis Patients. In: *Toxins* 12 (3). DOI: 10.3390/toxins12030159.
- van der Bruggen, T.; Nijenhuis, S.; van Raaij, E.; Verhoef, J.; van Asbeck, B. S. (1999): Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human monocytes involves the raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 pathway. In: *Infection and immunity* 67 (8), S. 3824–3829. DOI: 10.1128/IAI.67.8.3824-3829.1999.
- van Opdenbosch, Nina; Lamkanfi, Mohamed (2019): Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. In: *Immunity* 50 (6), S. 1352–1364. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.05.020.
- Vidal-Petiot, Emmanuelle; Metzger, Marie; Faucon, Anne-Laure; Boffa, Jean-Jacques; Haymann, Jean-Philippe; Thervet, Eric et al. (2018): Extracellular Fluid Volume Is an Independent Determinant of Uncontrolled and Resistant Hypertension in Chronic

Kidney Disease: A NephroTest Cohort Study. In: *Journal of the American Heart Association* 7 (19), e010278. DOI: 10.1161/JAHA.118.010278.

Wang, D.; Baldwin, A. S. (1998): Activation of nuclear factor-kappaB-dependent transcription by tumor necrosis factor-alpha is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (45), S. 29411–29416. DOI: 10.1074/jbc.273.45.29411.

Wang, D.; Westerheide, S. D.; Hanson, J. L.; Baldwin, A. S. (2000): Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (42), S. 32592–32597. DOI: 10.1074/jbc.M001358200.

Wang, Li; Xiang, Fangfang; Ji, Jun; Ding, Xiaoqiang; Shen, Bo; Chen, Jing et al. (2020): Indoxyl sulfate and high-density lipoprotein cholesterol in early stages of chronic kidney disease. In: *Renal failure* 42 (1), S. 1157–1163. DOI: 10.1080/0886022X.2020.1845731.

Zamyatina, Alla; Heine, Holger (2020): Lipopolysaccharide Recognition in the Crossroads of TLR4 and Caspase-4/11 Mediated Inflammatory Pathways. In: *Frontiers in immunology* 11, S. 585146. DOI: 10.3389/fimmu.2020.585146.

Zhang, Jun-Ming; An, Jianxiong (2007): Cytokines, inflammation, and pain. In: *International anesthesiology clinics* 45 (2), S. 27–37. DOI: 10.1097/AIA.0b013e318034194e.

Ziegler-Heitbrock, Loems (2014): Monocyte subsets in man and other species. In: *Cellular immunology* 289 (1-2), S. 135–139. DOI: 10.1016/j.cellimm.2014.03.019.

Ziegler-Heitbrock, Loems; Ancuta, Petronela; Crowe, Suzanne; Dalod, Marc; Grau, Veronika; Hart, Derek N. et al. (2010): Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. In: *Blood* 116 (16), e74-80. DOI: 10.1182/blood-2010-02-258558.

## 7. Thesen

1. Hypervolämie Hämodialysepatienten weisen erhöhte Entzündungs- (CRP) und Blutdruckwerte und sind häufiger von Diabetes betroffen.
2. Leukozyten, insbesondere die Granulozyten, kommen vermehrt in hypervolämischen Nierenkranken vor.
3. Die mRNA- und TNFR1-Expressionen sowie TNF- $\alpha$  in Zellüberständen und Seren unterscheiden sich in normo- und hypervolämen CKD-Patienten nicht.
4. Durch Endotoxin wird die TNF- $\alpha$ -Produktion in CD14<sup>+</sup>-Monozyten, nicht aber in T-Zellen, gefördert und verstärkt das Entzündungsgeschehen in überwässerten HD-Patienten.
5. Die monozytäre Aktivierung des inflammatorischen Signalings über RelA (Phospho-RelA (pS529)) ist zwischen Normo- und Hypervolämen nicht unterschiedlich.
6. Die monozytäre Aktivierung des NF $\kappa$ B-Regulators RelB (Phospho-RelB (Ser552)) ist in normovolämen HD-Patienten erhöht.
7. Die Caspase-4-Aktivität als bakterieller Entzündungssensor ist in hypervolämen Patienten erhöht.

## 8. Anhang

### 8.1 Publikationen

Ulrich, Christof; Canim, Zeynep; Herberger, Eva; Girndt, Matthias; Fiedler, Roman (2023): Inflammation in Hypervolemic Hemodialysis Patients: The Roles of RelB and Caspase-4. In: *International journal of molecular sciences* 24 (24). DOI: 10.3390/ijms242417550.

Ulrich, Christof; Fiedler, Roman; Herberger, Eva; Canim, Zeynep; Markau, Silke; Girndt, Matthias (2024): Hypervolemia in Dialysis Patients Impairs STAT3 Signaling and Upregulates miR-142-3p: Effects on IL-10 and IL-6. In: *International journal of molecular sciences* 25 (7). DOI: 10.3390/ijms25073719.

## 8.2 Erklärungen über frühere Promotionsversuche und Selbstständigkeitserklärung

- (1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.
  
- (2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.
  
- (3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

---

Datum

---

Unterschrift

### 8.3 Danksagungen

Zuallererst möchte ich diese Möglichkeit nutzen und mich bei jedem bedanken, mit deren Hilfe diese Promotion entstehen und fertiggebracht werden konnte:

An erster Stelle möchte ich meinen besonderen Dank an Herrn PD Dr. med. Roman Fiedler richten, der mir die Durchführung dieser Arbeit unter seiner Leitung ermöglicht hat. Ohne seine Unterstützung wäre diese Dissertation nicht so schnell auf die Beine gekommen.

Besonders danken möchte ich Dr. rer. nat. Christof Ulrich für die Themenfindung, seine ausgezeichnete Betreuung und Organisation sowie das mühevollen Korrekturlesen. Durch seine ständigen Ermutigungen nahm das Schreiben der Arbeit eine positive Wendung an.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Manuela Hajri für ihre hervorragende Unterstützung im Labor bedanken. Die langen Gespräche über unsere nächsten Reiseziele und unsere Lieblingsserien sowie auch über Verbesserungsmöglichkeiten der Arbeit lassen mich stets positiv auf die Promotionszeit zurückblicken.

Auch möchte ich mich bei allen Schwestern und Ärzten des KfH für die sehr gute Zusammenarbeit bedanken.

Einen ganz besonderen Dank verdienen auch meine beiden besten Freundinnen, die mich in allen Lebensabschnitten begleitet haben und stets an meiner Seite standen. Ohne euch wäre mein Leben halb so spannend. Danke für alles!

Und zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie für ihre Geduld, mentale Unterstützung und bedingungslose Liebe bedanken. Danke, dass ihr immer ein offenes Ohr für mich habt und stets für mich da seid. Ich habe euch lieb!

Vielen Dank!