



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
TUM School of Medicine and Health

Geschlechterspezifische Wirkung von Interleukin 8 in Hämodialysepatienten

Caroline Valerie Scheid

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizin (Dr. med.) genehmigten Dissertation.

Vorsitz: apl. Prof. Dr. Stefan Thorban

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Christoph Schmaderer
2. Priv.-Doz. Dr. Georg Lorenz

Die Dissertation wurde am 19.12.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Medicine and Health am 10.10.2023 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
1. Einführung	5
1.1 Chronische Niereninsuffizienz und Hämodialysetherapie	5
1.1.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie der Niereninsuffizienz.....	5
1.2 Hämodialysetherapie.....	10
1.2.1 Indikation und Verfahren	10
1.2.2 Dialysemembranen: FX60/FX80 und MCO Membranen.....	12
1.2.3 Mortalität, Prognose und chronische Inflammation	14
1.3 Chemokine und Interleukin 8.....	16
1.3.1 Definition und Funktion	16
1.3.2 Interleukin 8 Aufbau und Funktion.....	18
1.3.3 Wirkmechanismus Interleukin 8	20
1.3.4 Matrixmetalloproteinasen Aufbau und Funktion	21
1.4 Geschlechterspezifische Unterschiede in Pathogenese und Outcome	25
2. Fragestellung.....	27
3. Methoden und Material	28
3.1 Peripheral Blood Mononuclear Cells Isolation	28
3.2 Auftauen der PBMCs.....	31
3.3 Stimulation der PBMCs	32
3.4 ELISA	33
3.5 Westernblot	35
3.6 Bead Array Assay.....	39
3.7 RNA Isolation	42
3.8 Real-time PCR	43
3.9 Migrations- Assay.....	44
3.10 Auswertung und Statistische Analyse	46
3.11 Studienkollektive und Patientenproben	47

3.12 Material und Reagenzien	49
4. Ergebnisse.....	59
4.1 HD-spezifische geschlechterabhängige Unterschiede im IL-8 Signaling.....	59
4.1.2 HD- abhängiges geschlechterspezifisches IL-8 Signaling.....	62
4.1.3 Geschlechterspezifisches IL-8 abhängiges inflammatorisches Milieu in HD- Patienten.....	66
4.2 Geschlechterabhängige Mikroinflammation durch IL-8	71
4.2.1 Junge gesunde Männer zeigen stärkere Mikroinflammation nach IL-8 und HD Plasma Stimulation	71
4.2.2 Signifikant stärkere MMP-9 und MMP-2 Konzentration nach IL-8 Stimulation in männlichen HD- Patienten.....	74
4.3 Signifikant stärkere Migration durch männliches IL-8- induziertes mikroinflammatorisches Milieu	79
4.3.1 Kein signifikanter Migrationsreiz durch IL-8 Isoformen.....	79
4.3.2 Signifikante Migration in Richtung des männlichen mikroinflammatorischen Milieus.....	81
4.4 Erhöhte IL-8 Potenz in Männern durch verstärkte IL-8 Spaltung.....	84
4.4.1 Etablierung Interleukin 8 Spaltungs-Westernblot	84
4.4.2 Geschlechterabhängige Spaltung von Interleukin 8 in HD- Patienten nach Stimulation	85
4.5 Klinische Konsequenz? - Interleukin 8 in HD-Patienten korreliert mit Überleben	87
4.5.1 ISAR Kohorte zeigt signifikant höhere Mortalität bei erhöhtem IL-8 in Männern.....	87
4.5.2 MCO Filter als Therapieansatz der chronischen Inflammation.....	91
5. Diskussion	94
5.1 Geschlechterspezifische Inflammation in HD- Patienten.....	95
5.2 Spezifische geschlechterabhängige Interleukin 8 Wirkung in Dialysepatienten	98
5.3 Verbesserung des männlichen Outcomes durch HDx.....	102

5.4 Limitationen	104
6. Zusammenfassung	105
7. Literaturverzeichnis	106
8. Abkürzungsverzeichnis.....	112
9. Abbildungsverzeichnis.....	113
10. Danksagung	115

1. Einführung

1.1 Chronische Niereninsuffizienz und Hämodialysetherapie

1.1.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie der Niereninsuffizienz

Unter einer chronischen Niereninsuffizienz (CKD) versteht man eine irreversibel eingeschränkte Nierenfunktion, welche länger als 3 Monate besteht und mit einer Reduktion der geschätzten Glomerulären Filtrationsrate (eGFR) $<90 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ einhergeht. Darüber hinaus kann zusätzlich eine Veränderung der Serum- oder Urinwerte, welche auf eine Nierenschädigung hinweisen, vorliegen (Webster, Nagler et al. 2017).

Die GFR kann dabei entweder über das im Serum vorliegende Kreatinin, als auch über die Bestimmung von Cystatin C abgeschätzt werden, da beide Proteine frei filtriert werden, und damit Hinweis auf die Filtrationsleistung der Niere geben (Inker, Astor et al. 2014). Prognostische Aussagekraft in der CKD hat die Menge und Art der Proteinurie, allen voran die Albuminurie.

Eingeteilt wird die chronische Niereninsuffizienz in 5 Stadien nach der KDIGO (Kidney Disease- Improving Global Outcomes) (Inker, Astor et al. 2014). Darüber hinaus wird die CKD in der Klassifikation durch den Zusatz der Albuminurie ergänzt (siehe Abbildung 1).

Endstadium der Niereninsuffizienz ist die sogenannte ESKD (end stage kidney disease).

				Albuminurie-Stadien, Beschreibung und Ausmaß (mg/g)		
				A1	A2	A3
				normaler bis leichter Anstieg	moderater Anstieg, Mikroalbuminurie	starker Anstieg, Makroalbuminurie
				<30	30 – 300	>300
GFR-Kategorien, Beschreibung und Ausmaß (ml/min/1,73 m ²)	G1	normal oder hoch	≥90			
	G2	leichter Abfall	60–89			
	G3a	leichter bis moderater Abfall	45–59			
	G3b	moderater bis starker Abfall	30–44			
	G4	starker Abfall	15–29			
	G5	Nierenversagen	<15			

Abb.1: Klassifikation der CKD nach KDIGO aus Merker, Ebert et al. (2019)

Farbkodierung entsprechend: Grün=niedriges Risiko, Gelb= moderat erhöhtes Risiko, Orange=hohes Risiko, Rot=sehr hohes Risiko für terminale Niereninsuffizienz und kardiovaskuläre Komplikationen

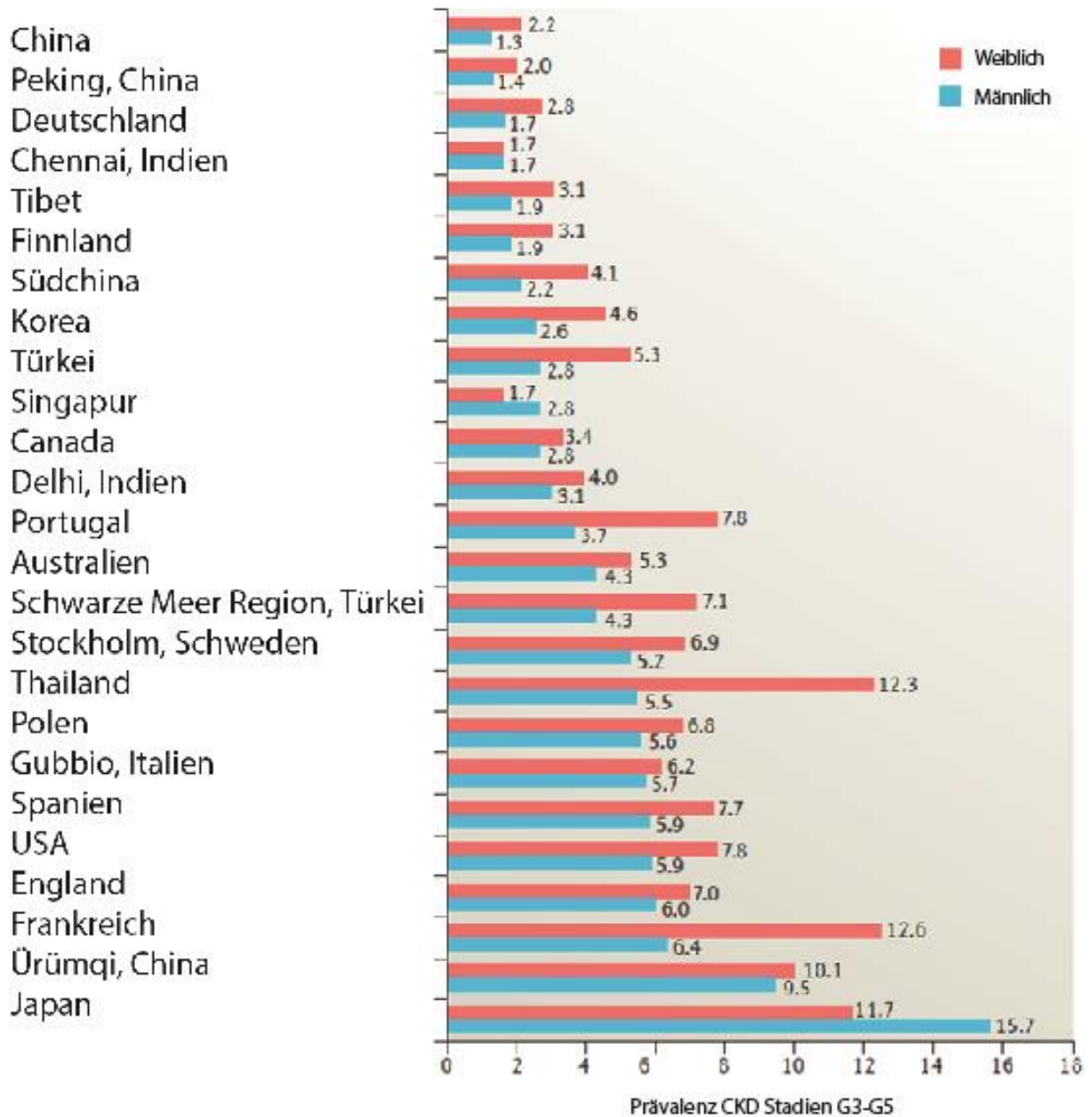


Abb. 2: Prävalenz der CKD ab G3-G5 nach Geschlecht und Land aus Carrero, Hecking et al. (2018)

Eine klinisch relevante chronische Niereninsuffizienz ab einer GFR <60 ml/min/1,73m² betrifft in Deutschland circa 2,3% in der Altersgruppe der 18-79 jährigen (Girndt, Trocchi et al. 2016). Weltweit liegt die Prävalenz der CKD im fortgeschrittenen Stadium 3-5 bei 10,6%, wobei sich bereits hier ein geschlechterspezifischer Unterschied mit einer höheren Prävalenz der CKD in Frauen beobachten lässt (Hill, Fatoba et al. 2016).

Bei steigender Prävalenz der CKD, wohl vor allem im Rahmen der steigenden Lebenserwartung, lassen sich weltweit nationale Verteilungsmuster der Erkrankung erkennen (s. Abbildung 2) (Carrero, Hecking et al. 2018).

Darüber hinaus kann man im Verlauf der Nierenfunktionseinschränkung zwischen einem akuten und einem chronischen Nierenversagen unterscheiden. Das akute Nierenversagen kann oft reversibel mit Regeneration der Nierenfunktion verlaufen jedoch ist das Risiko an einer chronisch eingeschränkten Nierenfunktion zu erkranken nach akutem Nierenversagen erhöht (Chou, Chu et al. 2018, Fiorentino, Grandaliano et al. 2018). Europaweit sind die Glomerulonephritis, Diabetes Mellitus und die arterielle Hypertonie die häufigsten Grunderkrankungen, die zu einer dialysepflichtigen Nierenersatztherapie führen (Kramer, Pippias et al. 2019) (s. Abbildung 3).

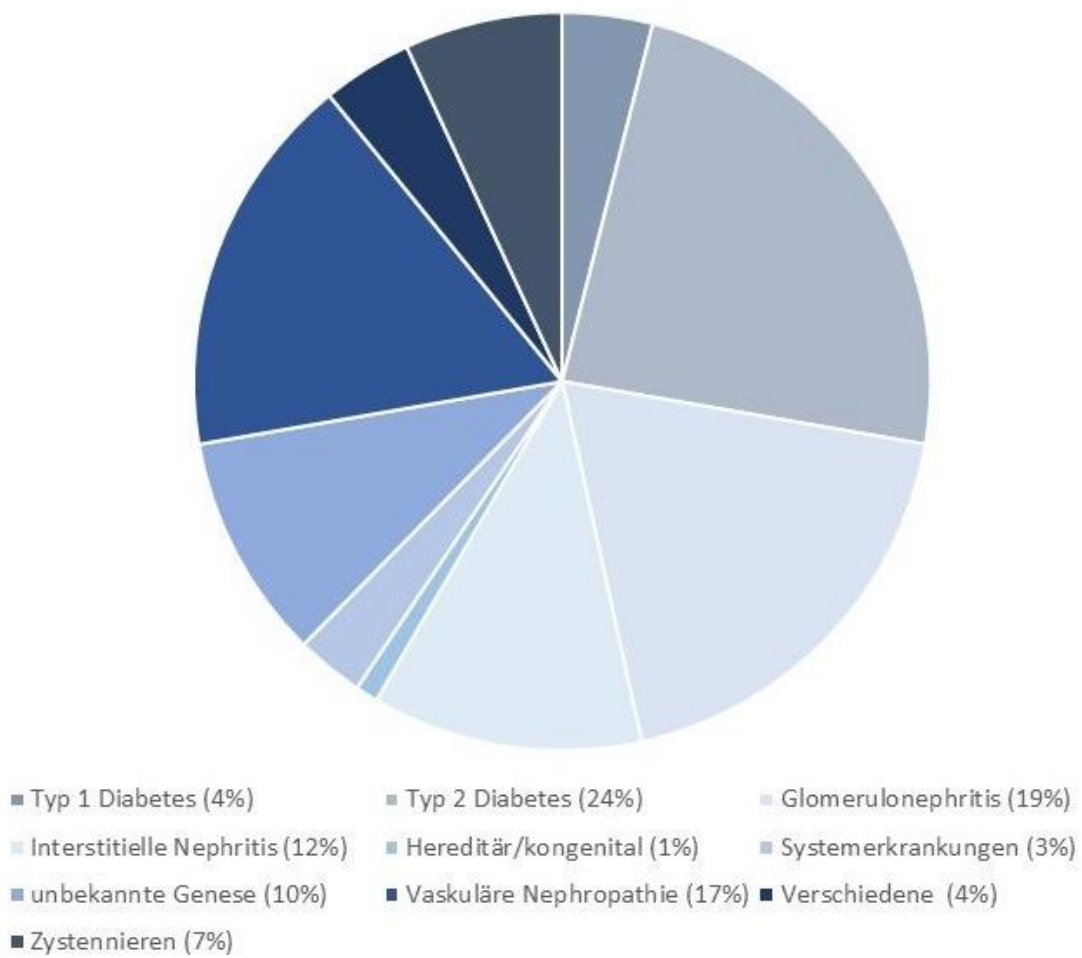


Abb. 3: Ätiologie der chronischen Niereninsuffizienz nach Segerer und Wanner (2014) (n=48.535 Dialysepatienten)

1.2 Hämodialysetherapie

1.2.1 Indikation und Verfahren

Die Indikation zur Einleitung einer Nierenersatztherapie wird sowohl im chronischen als auch im akuten Nierenversagen klinisch gestellt. Im Rahmen der chronischen Niereninsuffizienz stellen unter anderem eine Urämie mit Serositiden, Übelkeit/ Erbrechen und zerebraler Beteiligung, eine therapierefraktäre Hypertonie, sowie akute Elektrolytentgleisungen, eine metabolische Azidose und Diuretika resistente Hypervolämie eine Indikation zur Einleitung einer Dialyse dar (Steffen Geberth 2014).

In Deutschland wurde erstmalig 1924 in Giessen von Georg Haas ein extrakorporales Dialyseverfahren am Menschen durchgeführt. Die erste Dialyse, die ein Überleben im akuten Nierenversagen ermöglichte, gelang 1945 dem Niederländer Willem Kolff mit seiner Trommeldialyse (Wizemann und Benedum 1994, Enke 2007).

Der Stoffaustausch bei der modernen Nierenersatztherapie erfolgt über unterschiedliche Mechanismen. Diese sind die Konvektion, Adsorption, Filtration und Diffusion.

Im Rahmen der Diffusion kommt es durch einen Konzentrationsgradient entlang der semipermeablen Membran zwischen Blut und Dialysat zum Übertritt von vor allem kleinen Molekülen in die Dialysatflüssigkeit. Zweiter wichtiger Mechanismus des Stoffaustauschs ist die Konvektion, der Transport entlang des hydrostatischen Drucks an der Membran. Dieser ist vor allem für die Filtration mittelgroßer Moleküle, wie zum Beispiel β_2 Mikroglobulin (12kDa) entscheidend (Mitsides, Keane et al. 2014).

Die gängigen Hämodialyseverfahren sind die Hämodialyse (HD), die Hämofiltration (HF) und kombiniert die Hämodiafiltration (HDF). Das häufigste in Europa durchgeführte Verfahren ist die HD (Kramer, Pippias et al. 2019).

Dabei fließen Blut und Dialysat im Gegenstromprinzip getrennt von einer semipermeablen Membran, sodass durch die Osmolaritätsunterschiede der Flüssigkeiten die Diffusion harnpflichtiger Substanzen und Wasser in das Dialysat erfolgt.

Im Rahmen der HF wird die Dialysatflüssigkeit durch eine Hämofiltrationslösung

ersetzt, die intravenös verabreicht wird. Diese wird dann durch Ultrafiltration zusammen mit den harnpflichtigen Substanzen wieder entfernt. Hierbei können im Gegensatz zur HD auch größere Moleküle über 25kDa mit entfernt werden.

Die HDF stellt ein Kombinationsverfahren aus HD und HF dar, und gilt als das effektivste Verfahren zur Elimination mittelmolekularer Stoffe (Lameire, Van Biesen et al. 2009, Mitsides, Keane et al. 2014)

1.2.2 Dialysemembranen: FX60/FX80 und MCO Membranen

Die Dialysemembranen werden anhand ihres Materials, Porengröße und Porendichte unterschieden. Heute werden synthetisch hergestellte Membranen verwendet, die sich durch eine bessere Biokompatibilität gegenüber den Cellulose Membranen auszeichnen (Ronco und Clark 2018).

Die Einteilung in *highflux* und *lowflux* Membranen erfolgt nach der Permeabilität für Wasser. Lameire, Van Biesen et al. (2009) berichten in ihrem Review, dass die Studienlage eines fraglichen Vorteils in der Benutzung von *highflux* Membranen bezüglich des Outcomes gegenüber *lowflux* Membranen uneindeutig ist. Durch die größeren Poren kann ein größerer Anteil der Filtration über Konvektion stattfinden, und so eine bessere Elimination mittel-großer Moleküle wie des β_2 Mikroglobulins erreicht werden. Im Rahmen der HEMO Studie konnte hier zwar keine Signifikanz in Hinblick auf die Gesamtsterblichkeit zwischen high und low flux nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich ein möglicher positiver Effekt bezüglich der kardiovaskulären Mortalität (Cheung, Levin et al. 2003). Lameire, Van Biesen et al. (2009) folgerten wiederum ein besseres Outcome bei Risikopatienten mit *highflux* gegenüber den *lowflux* Dialysatoren, mit der Beschränkung, dass neben der angewandten Technik vor allem kardiovaskuläre Vorerkrankungen, die klinische Betreuung sowie der richtig gewählte Zeitpunkt des Dialysebeginns entscheidend für das Überleben der Patienten ist.

Eine neue Kategorie von Dialysemembranen sind *medium cut off* Filter (MCO) mit größeren Poren, die auch die Elimination von mittel- und hochmolekularen Stoffen bis 50kDa gewährleisten soll (Ronco und La Manna 2017). Die *HDx – die expanded Hämodialyse*, gilt als Überbegriff der neuen erweiterten Dialyse mit MCO Filtern. Auch Versuche mit *high cut off* Membranen mit einem noch größeren Porendurchmesser wurden gemacht. Durch den weiteren Porendurchmesser ist es möglich Proteine, wie Myoglobin, freie Leichtketten oder auch Zytokine zu filtrieren (siehe Abbildung 4). Durch den vermehrten Verlust von Albumin ist deren Nutzung jedoch neben einigen speziellen Indikationsstellungen auf wenige Anwendungen limitiert (Ronco 2017).

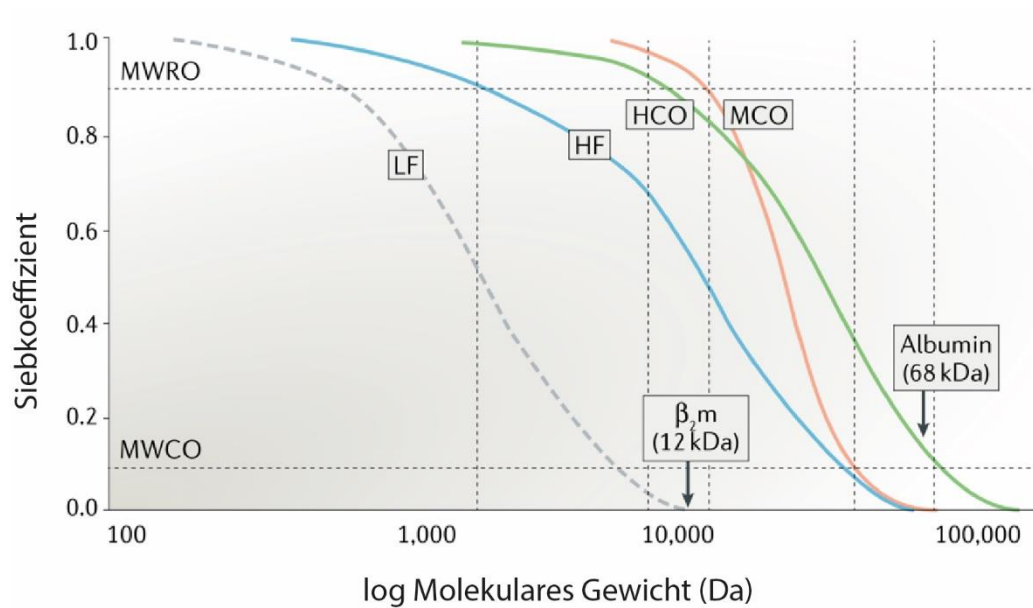


Abb 4.: Charakteristika unterschiedlicher Dialysemembranen

LF= low flux, HF=high flux, HCO= high cut off, MCO= medium cut off. MWRO= Molekulargewicht, welches nicht filtriert wird (molecular weight retention onset), MWCO= Cut off des Molekulargewichts (molecular weight cut off), SC= Siebkoeffizient (sieving coefficient) aus Ronco und Clark (2018)

1.2.3 Mortalität, Prognose und chronische Inflammation

Obwohl es durch die Dialysetherapie die Möglichkeit gibt, ein chronisches Nierenversagen mit dem Leben zu vereinbaren, bleibt die einzige kurative Therapie weiterhin die Nierentransplantation. Trotz der stetigen Weiterentwicklung der Dialysetechnik und Membranen, zeigt sich in der Kohorte der Hämodialysepatienten eine deutlich erhöhte Morbidität und Mortalität gegenüber der Normalbevölkerung (Ma und Zhao 2017, Msaad, Essadik et al. 2019).

Häufigste Todesursache bei Hämodialysepatienten sind kardiovaskuläre Ereignisse (CVD) mit einer circa 15-fach höheren kardiovaskulären Mortalität gegenüber der Normalbevölkerung (Sarnak und Levey 2000). Da die erhöhte kardiovaskuläre Mortalität im Dialysekollektiv nicht durch die klassischen Risikofaktoren dieser Erkrankungsgruppe allein erklärbar ist, stellten Locatelli, Canaud et al. (2003) die Hypothese des erhöhten oxidativen Stresses als Mitverursacher der erhöhten Mortalität auf. Dieser wird einerseits hervorgerufen durch den Kontakt des Blutes mit dem körperfremden Material der Dialysemembran. Andererseits stellen auch das fortgeschrittene Alter, eine erhöhte Inzidenz von Diabetes und das urämische Milieu im Blut der Patienten ein Trigger für das Immunsystem dar und führen zu einer verstärkten Aktivierung der Immunzellen.

Diese chronische Aktivierung entspricht einer konstant aufrechterhaltenen Entzündungsreaktion, welche auch im Rahmen der Ätiologie der endothelialen Dysfunktion und Arteriosklerose diskutiert wird (Locatelli, Canaud et al. 2003, Tsirpanlis, Bagos et al. 2004).

Im Rahmen der Pathogenese spielt neben anderen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen auch Interleukin 8 (IL-8) eine Rolle. Hier konnten Stinghen, Goncalves et al. (2009) *in vitro* zeigen, dass ein urämisches Milieu, wie es bei Dialysepatienten im Blut vorliegt, zu einer signifikant höheren Expression von Adhäsionsmolekülen, Monozyten-chemotaktischen Protein 1 (MCP-1) und auch von Interleukin 8 durch Endothelzellen in der Zellkultur führt. Die erhöhte Expression von IL-8 konnte auch bereits an arteriosklerotischen Plaques und Schaumzellen nachgewiesen werden (Packard und Libby 2008), wodurch das Risiko für kardiovaskuläre Events weiter steigt.

Unabhängig von der Urämie in HD-Patienten konnte gezeigt werden, dass auch die Volumenüberladung mit einer höheren Mortalität und Mikroinflammation assoziiert ist, da eine Volumenüberladung an sich schon zu einer verstärkten Expression von Markern einer endothelialen Dysfunktion, wie zum Beispiel das vaskuläre Zell-Adhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) führt (Onofriescu, Siriopol et al. 2015, Mitsides, Cornelis et al. 2017).

Des Weiteren ist die Inflammation an sich auch mit einer höheren Gesamtmortalität verbunden. Zimmermann, Herrlinger et al. (1999) zeigen, dass CRP als unabhängiger Prädiktor einer höheren kardiovaskulären und Gesamtmortalität gilt. Gleiches konnten Barreto, Barreto et al. (2010) für Interleukin 6 sowohl in HD als auch in CKD Patienten zeigen.

1.3 Chemokine und Interleukin 8

1.3.1 Definition und Funktion

Chemokine bilden eine Untergruppe der Zytokine. Sie zeichnen sich durch ihre Struktur und ihre Funktion Leukozyten „anzulocken“ (Chemotaxis), sowie die Steuerung der Migration von Leukozyten ins Gewebe zum Ort der Entzündung (Chemokinese) aus. Auf molekularer Ebene sind Chemokine kleine Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 8-12kDa, welche 2 Disulfidbrücken ausbilden (Luster 1998, Abbas 2012).

Um die Jahrtausendwende etablierten Zlotnik und Yoshie (2000) eine neue Klassifikation und Nomenklatur zur Vereinheitlichung der inzwischen mehr als 40 verschiedenen beschriebenen Chemokine. Die Klassifikation erfolgt in insgesamt 4 Untergruppen. Je nach Aufbau und Anzahl der N-terminalen Cysteingruppen werden die Chemokine in CXC-, CC-, C- und CX₃C unterteilt.

In der CXC Gruppe (zum Beispiel Interleukin 8 und Interferon γ induziertes Protein-10 (IP-10)) sind die beiden terminalen Cysteine durch eine Aminosäure getrennt, in der CC Gruppe (zum Beispiel Makrophagen induziertes Protein 1 α (MIP-1 α), MCP-1, RANTES) direkt aneinander angrenzend (Zlotnik und Yoshie 2000). Kleinere Untergruppen sind die C Chemokine mit einem einzelnen Cystein, wie zum Beispiel Lymphotactin, sowie die CX₃C Chemokine wie das Fractalkine, in dem die beiden Cysteine durch drei Aminosäuren voneinander getrennt sind. Vertreter der CXC- und CC- Untergruppe werden vornehmlich von Leukozyten, aber auch von Endothelzellen und Fibroblasten im Rahmen der angeborenen Immunabwehr sezerniert (Abbas 2012).

Chemokine entfalten ihre Wirkung über G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Diese sind in der Zellmembran lokalisiert und führen nach Bindung eines Liganden zur Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade. Die Rezeptoren werden in unterschiedlicher Dichte je nach Zelltyp exprimiert, wobei die größte Vielfalt an Rezeptoren auf T-Zellen beobachtet werden kann (Abbas 2012). Die Rezeptoren gestalten sich außerdem sehr spezifisch für die einzelnen Chemokin-Kategorien. In Bezug auf Interleukin 8 spielen zwei Rezeptoren eine Rolle: der CXCR 1 und CXCR 2 Rezeptor.

Der CXCR 1 Rezeptor ist hochspezifisch für Interleukin 8, während der CXCR 2 Rezeptor neben Interleukin 8 auch andere Chemokine, wie zum Beispiel CXCL 1,5 und 7 bindet (Alexander, Davenport et al. 2015). Darüber hinaus weist der CXCR 2 Rezeptor ebenfalls eine niedrigere Affinität für IL-8 im Vergleich zum CXCR 1 Rezeptor auf (Van den Steen, Proost et al. 2000).

1.3.2 Interleukin 8 Aufbau und Funktion

Interleukin 8 ist ein Chemokin der CXC Familie mit einem Molekulargewicht von 8 kDa. Es wurde erstmals Ende der Achtzigerjahre als „monocyte derived neutrophile chemotactic factor (MDNCF)“ (Yoshimura, Matsushima et al. 1987) und „neutrophile-activating factor (NAF)“ (Walz, Peveri et al. 1987) beschrieben. Walz, Peveri et al. (1987) gewannen das neue Molekül über Stimulation von mononukleären Zellen mit LPS für 24h und charakterisierten es als ein zwischen 5-10 kDa großes Molekül, welches zur Degranulation von neutrophilen Granulozyten führt, und in seiner chemotaktischen Wirkung ähnlich dem Komplementfaktor C5a ist. Yoshimura, Matsushima et al. (1987) beschrieben ihr MDNCF mit einer selektiven chemotaktischen Wirkung auf Leukozyten, nicht jedoch auf Monozyten. Schließlich erfolgte auf Vorschlag von Larsen, Anderson et al. (1989) die Benennung des „Neutrophil activating proteins“ (NAP-1) in Interleukin 8, nachdem sie in ihrer Arbeit zeigen konnten, dass die chemotaktische und proinflammatorische Wirkung neben neutrophilen Granulozyten auch auf T-Zellen Wirkung hat.

Die bekannteste Funktion des IL-8 ist die Fähigkeit vor allem neutrophile Granulozyten anzulocken und damit zu einer Migration der Immunzellen aus der Blutbahn in das periphere Gewebe zu führen. Schon Harada, Sekido et al. (1994) vermuteten eine entscheidende Rolle von Interleukin 8 in der akuten Inflammation, da sie durch spezifische Interleukin 8 Antikörper die Migration und Gewebeschädigung durch neutrophile Granulozyten mindern konnten.

Neben der Migration hat Interleukin 8 auch für die Zelladhäsion im Rahmen der Pathophysiologie der Arteriosklerose zum Beispiel von Monozyten an der Gefäßwand Bedeutung (Gerszten, Garcia-Zepeda et al. 1999). Auch für die Angiogenese, Tumorentstehung/-wachstum und Metastasierung spielt die Regulation beziehungsweise Expression von IL-8 und dessen Rezeptoren eine wichtige Rolle (Aihua Li 2003, Rosenkilde und Schwartz 2004, Waugh und Wilson 2008).

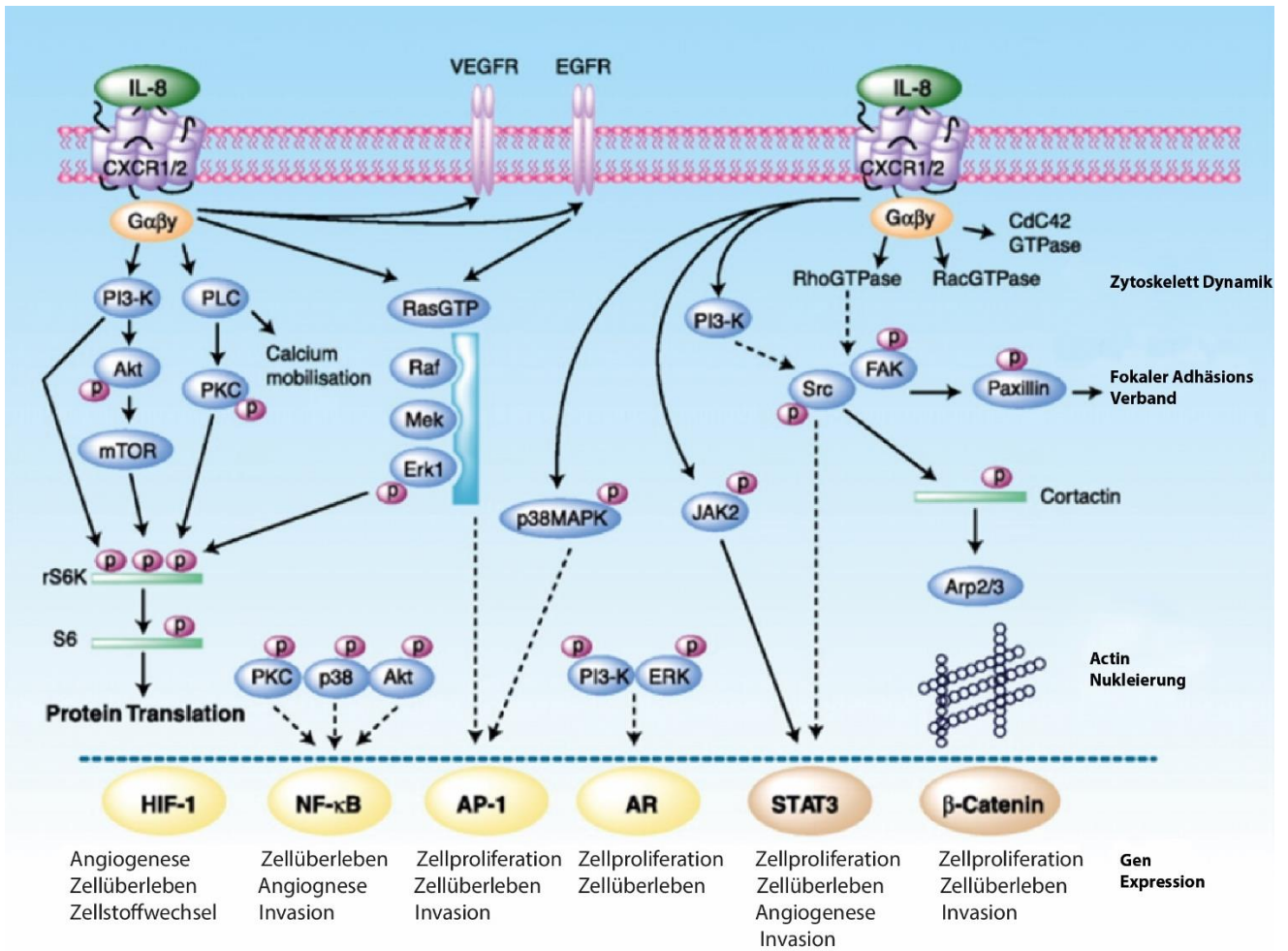


Abb. 5: Bekannte intrazelluläre Signalwege von Interleukin 8 über Wirkung am CXCR1/2 Rezeptor aus Waugh und Wilson (2008)

1.3.3 Wirkmechanismus Interleukin 8

Interleukin 8 wird als 99 Aminosäuren langes Polypeptid synthetisiert. Noch intrazellulär kommt es zur Abspaltung einiger Aminosäuren (AA), sodass Interleukin 8 entweder als 72 oder 77 Aminosäuren, im Menschen vor allem als [1-77] oder [6-77] AA- IL-8 großes Molekül sezerniert wird. In vivo kann Interleukin 8 sowohl als Monomer oder als Dimer vorliegen und entfaltet seine Wirkung über die G-Protein gekoppelten transmembranösen CXCR 1 und CXCR 2 Rezeptoren (siehe Abbildung 5) (Hoch, Schraufstatter et al. 1996, Waugh und Wilson 2008).

Interleukin 8 wird von unterschiedlichen Zelltypen synthetisiert, unter anderem von Monozyten, T-Lymphozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten, neutrophile Granulozyten und Tumorzellen (Benjamini 2000, Mortier, Van Damme et al. 2008). Die Länge des Interleukin 8 weist auf den zellulären Ursprung des Chemokins hin. Das 77 AA Interleukin 8 wird vornehmlich von Fibroblasten und Endothelzellen produziert (Gimbrone, Obin et al. 1989, Schroder, Sticherling et al. 1990). Bedeutung hat die Moleküllänge insbesondere in Hinblick auf die biologische Potenz. So ist das 72 AA IL-8 circa um das 10-fache potenter als das 77 AA IL-8 und zeigt eine höhere Affinität zur Bindung an IL-8 Rezeptoren auf neutrophilen Granulozyten (Nourshargh, Perkins et al. 1992).

Im Menschen sind unterschiedliche Proteasen bekannt, die in der Lage sind Interleukin 8 zu spalten. Hierzu zählt unter anderem Thrombin, welches das 77 AA in 72 AA Interleukin 8 spezifisch spalten kann. Andere Proteasen wie zum Beispiel Trypsin führen im Unterschied zu Thrombin zu einer multiplen Spaltung des Moleküls in kleine Fragmente und einem damit verbundenen Wirkverlust (Hebert, Luscinskas et al. 1990). Ein bekannter Vertreter der spezifischen IL-8 spaltenden Enzyme zur potenteren 72 AA Isoform sind die Matrix Metalloproteinasen (MMP). Speziell die Spaltung von IL-8 von der 77 in 72 AA Isoform, und damit eine Potenzierung der biologischen Aktivität um das 10-27fache in Bezug auf die Aktivierung neutrophiler Granulozyten und Chemotaxis ist für MMP-9 beschrieben (Van den Steen, Proost et al. 2000).

1.3.4 Matrixmetalloproteinasen Aufbau und Funktion

Als Matrix Metalloproteinasen (MMP) wird eine Gruppe von Zinkproteasen bezeichnet. Von ihnen sind bereits 23 verschiedenen MMPs beim Menschen bekannt. Sie lassen sich in nach ihrer Funktion in unterschiedliche Gruppen aufteilen. Man unterscheidet unter anderem die Gruppe der Collagenasen wie MMP-1 (Kollagenase 1), MMP-8 (Kollagenase 2) und MMP-13 (Kollagenase 3), deren spezifische Funktion die N-terminale Spaltung von interstitiellem Kollagen Typ I, II und III ist. MMP-2 (Gruppe A) und MMP-9 (Gruppe B) fallen in die Kategorie der Gelatinasen. Diese verdauen das bereits durch die Collagenasen denaturierte Kollagen (Visse und Nagase 2003).

Die Klassifikation der MMPs erfolgt anhand eines charakteristischen Aufbaus (siehe Abbildung 6). Dieser beinhaltet das im Propeptid enthaltene Cystein, welches über eine non kovalente Bindung mit dem Zink entscheidend für die Stabilität des Proenzym ist. An dieser Stelle des sogenannten „critical cystein residues“ findet die Abspaltung des Propeptids und damit die biologische Aktivierung statt, der sogenannte „Cystein-switch“ (Van Wart und Birkedal-Hansen 1990).

Ein weiteres Charakteristikum ist die bereits genannte Zinkbindungsstelle, die in der katalytischen Domäne lokalisiert ist. MMPs werden als inaktive Enzymvorstufen (Zymogene) intrazellulär gebildet und extrazellulär durch proteolytische Abspaltung des Propeptids biologisch aktiviert (siehe Abbildung 7). Für die Aktivierung notwendig sind einerseits Enzyme wie zum Beispiel Plasmin oder Urokinase.

Andererseits ist die gegenseitige Aktivierung der MMPs, zum Beispiel proMMP-9 → MMP-9 durch MMP-2 eine weitere Form der enzymatischen MMP Aktivierung (Chakraborti, Mandal et al. 2003, Ala-aho und Kahari 2005, Cheng, Limbu et al. 2017).

Neben der proteolytischen Spaltung führen noch weitere Mechanismen zur Aktivierung der MMPs. Hierunter zählen die Veränderung der Disulfidbrücken zum Beispiel mit Hilfe von Glutathion oder auch die Aktivierung im Rahmen von oxidativem Stress, dem „respiratory burst“, zu dem es bei Aktivierung und Degranulation von neutrophilen Granulozyten kommen kann (Peppin und Weiss 1986, Van Wart und Birkedal-Hansen 1990).

Als klassische Funktion der MMPs gilt die Spaltung und Denaturierung extrazellulärer Matrix- Proteine. Eine weitreichendere Rolle im Rahmen von physiologischen

Regulationsmechanismen aber auch in der Pathophysiologie von arteriosklerotischen, entzündlichen oder onkologischen Erkrankungen, spielen die MMPs durch die Spaltung und damit verbundener Aktivierung oder Inaktivierung von Wachstumsfaktoren und -rezeptoren, Zytokinen und Chemokinen, sowie Adhäsionsproteinen und -rezeptoren (Packard und Libby 2008, Nissinen und Kahari 2014).

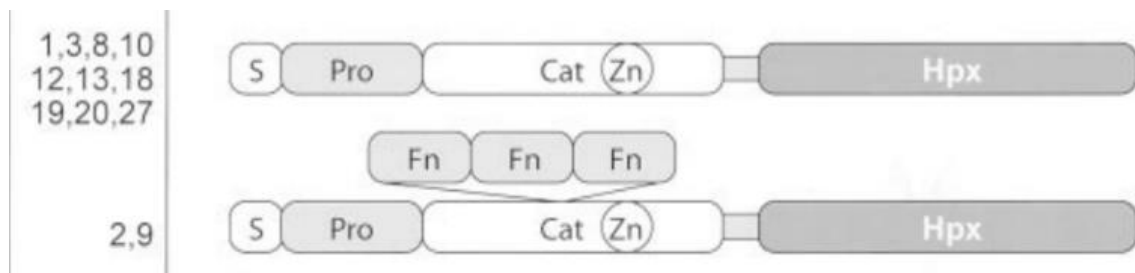


Abb. 6: Aufbau MMPs sortiert nach Nummern

MMP-2 und MMP-9 mit 3 Fibronektin Domänen (Fn) in katalytischer Domäne (Cat). Weitere Abkürzungen: S= Signalpeptid, Pro= Propeptid, Hpx= Hämopexin Domäne Ausschnitt aus Fig. 1 von Visse und Nagase (2003)

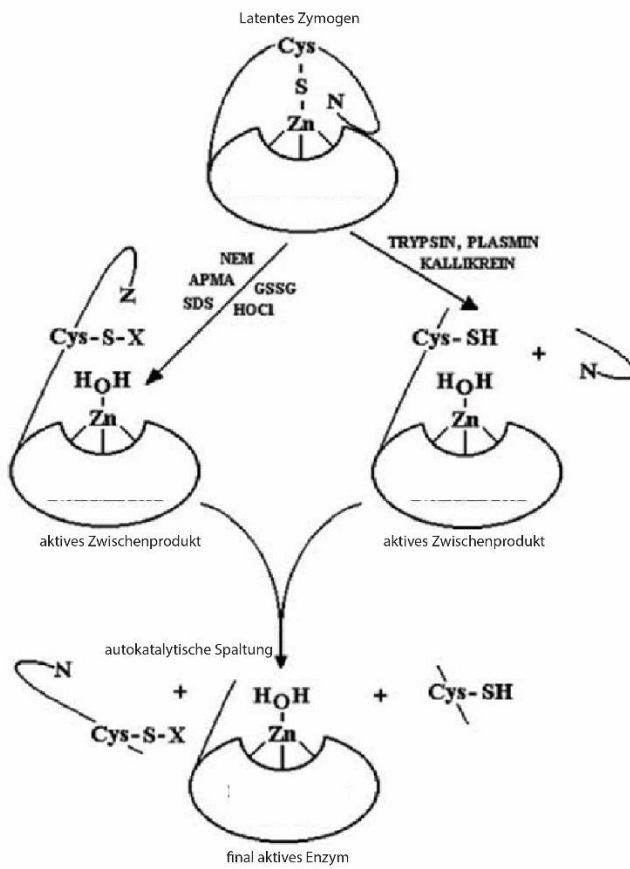


Abb. 7: Aktivierung des proMMP in biologisch aktives MMP – „Cystein-Switch“ aus Chakraborti, Mandal et al. (2003)

1.4 Geschlechterspezifische Unterschiede in Pathogenese und Outcome

Lange spielten geschlechterspezifische Unterschiede in der Wissenschaft keine große Rolle. Als Standardreferenz galt der durchschnittlich große, normalgewichtige Mann.

Jedoch gibt es schon in der Epidemiologie, zum Beispiel in Bezug auf die mittlere Lebenserwartung Unterschiede zwischen den Geschlechtern, sodass die Unterschiedlichkeit von Männern und Frauen inzwischen auch eine immer größere Rolle in der klinischen Forschung spielt.

Allgemein unterscheidet man sogenannte „sex-differences“, also Unterschiede zwischen Männern und Frauen aufgrund der Genetik, von den „gender-differences“, welche durch Unterschiede in der Lebensweise unabhängig vom biologischen Geschlecht hervorgerufen werden. In Bezug auf die Prävalenz, die Pathophysiologie und den Verlauf von Erkrankungen sind bereits geschlechterspezifische Unterschiede bekannt, wie zum Beispiel, dass Frauen häufiger an Autoimmunerkrankungen leiden als Männer (Ngo, Steyn et al. 2014). Auch in Bezug auf die Entstehung und das Voranschreiten kardiovaskulärer Erkrankungen wie Myokardinfarkte, Herzinsuffizienz oder Bluthochdruck konnten geschlechterspezifische Unterschiede festgestellt werden (Regitz-Zagrosek und Kararigas 2017). Clegg und Mauvais-Jarvis (2018) berichten in ihrem Review, dass auch bei Adipositas und Diabetes mellitus geschlechtsspezifische Mechanismen eine Rolle spielen.

Mögliche Ursachen hierfür liegen einerseits in der Genetik, da der unterschiedliche Chromosomensatz von Männern (XY) und Frauen (XX) zu einer unterschiedlichen Genexpression führt. Neben dem fehlenden Y-Chromosom kann bei Frauen auch eine unvollständige Aktivierung des zweiten X-Chromosoms zu einer erhöhten Expression einzelner Gene führen. Zweitens spielt auch die Epigenetik, also die Aktivierung oder Inaktivierung von Genabschnitten, durch zum Beispiel Histonmodulation, eine Rolle in der Varianz der Genexpression. Zuletzt sind auch die Sexualhormone wie Östrogen, Progesteron und Testosteron, sowie deren Rezeptoren, als wichtige Steroidhormone für die geschlechterabhängige Regulation des Organismus zu nennen (Regitz-Zagrosek und Kararigas 2017).

Betrachtet man unter dem Aspekt der Geschlechterunterschiede die chronische Niereninsuffizienz und Dialysepatienten fällt auf, dass zwar mehr Frauen an einer eingeschränkten Nierenfunktion erkranken, betrachtet man aber die chronisch dialysepflichtigen Patienten verlagert sich die Verteilung zu Ungunsten der Männer mit circa 60% (Carrero, Hecking et al. 2018). Kommt es zur Notwendigkeit einer Dialysetherapie haben Männer zwar weiterhin ein höheres Risiko in Bezug auf die Gesamt- und kardiovaskuläre Mortalität, jedoch steigt in Frauen das Risiko mit weiterhin sinkender GFR steiler gegenüber den Männern (Nitsch, Grams et al. 2013). Insgesamt beginnen im Vergleich zu Männern weniger Frauen eine Nierenersatztherapie und verzeichnen häufiger eine reduzierte Lebensqualität und weitere Nebenwirkungen unter der Therapie (Carrero, Hecking et al. 2018) Betrachtet man die Transplantationszahlen fällt auf, dass Frauen weniger häufig postmortale Nierenspenden erhalten, während der Zugang zu Lebendspenderorganen in manchen Ländern für Männer und Frauen ähnlich zu sein scheint (Carrero, Hecking et al. 2018). Andere Untersuchungen sprechen jedoch eher dafür, dass Frauen signifikant häufiger das Geschlecht sind, welches sich zur Lebendspende einer Niere für Verwandte oder Lebensgefährten bereit erklärt (Jindal, Ryan et al. 2005, Rota-Musoll, Brigidi et al. 2021).

2. Fragestellung

Die Dialysetherapie ist trotz allem Fortschritt und technischer Weiterentwicklung weiterhin mit einer stark erhöhten Mortalität verbunden. Diese ist vor allem auf eine erhöhte kardiovaskuläre Mortalität zurückzuführen. Zunehmend wird auch die chronische Inflammation als Motor eines schnelleren Voranschreitens arteriosklerotischer Erkrankungen und einer gleichzeitigen sekundären Immundefizienz, mit einem ebenfalls erhöhten Risiko an einer Infektionserkrankung zu versterben verstanden (Horl 2002).

Dieser Zustand der chronischen Inflammation in Dialysepatienten spielt also im Überleben und der Morbidität der Betroffenen eine wichtige Rolle. Für beide Geschlechter zeigt sich, dass ein erhöhtes CRP mit einer erhöhten Mortalität einhergeht. Jedoch führt es bei Männern signifikant häufiger zum Tod als bei Frauen (Stenvinkel, Wanner et al. 2002). Neben den klassischen Entzündungsmarkern wie das CRP und Interleukin 6, die auch im klinischen Alltag regelmäßig Anwendung finden, konnte auch für Interleukin 8 gezeigt werden, dass es als ein unabhängiger Prädiktor adjustiert nach Alter und Dialysedauer für die Gesamtmortalität, sowie für das Auftreten Kardiovaskulärer Ereignisse gesehen werden kann (Panichi, Taccola et al. 2006).

Aufgrund dieser Daten und der scheinbar höheren Mortalität von Männern im Zusammenhang mit Inflammation stellten wir uns die Frage, ob die Wirkung von IL-8 in Dialysepatienten geschlechterspezifischen Unterschieden unterliegt. Hieraus formierte sich unsere Arbeitshypothese, dass Männer auf Interleukin 8 eine, Frauen gegenüber, verstärkte inflammatorische Reaktion und damit verbunden eine höhere Morbidität aufweisen.

Unser Augenmerk im Beweis der Hypothese lag dabei auf der Untersuchung geschlechterspezifischer Unterschiede in der intrazellulären Zellaktivierung, der Wirkung und der Funktion von Interleukin 8, sowie der potenziellen Bedeutung für den klinischen Alltag von Dialysepatienten.

3. Methoden und Material

3.1 Peripheral Blood Mononuclear Cells Isolation

PBMC steht für periphere mononukleäre Zellen des Blutes. Unter diesen Überbegriff werden unterschiedliche Zelllinien wie die Lymphozyten und Monozyten, die eine tragende Rolle in der angeborenen und erworbenen Immunabwehr spielen, zusammengefasst.

Die Isolierung der PBMCs erfolgte nach folgendem Protokoll: Studienpatienten und gesunden Probanden als Kontrollgruppe wurde venöses Vollblut in CPT Vacutainer abgenommen. Die Abnahme erfolgte bei den Dialysepatienten vor Beginn der Dialyse entweder aus dem Dialyseshunt bei bereits gelegter Nadel, alternativ aus einem Vorhof- oder Shaldon-Katheter. Bei gesunden Probanden erfolgte die Abnahme durch eine intravenöse Punktion in der Ellenbeuge. Die CPT Röhren wurden direkt nach der Abnahme mehrfach auf und ab geschwenkt, um eine Mischung des Blutes mit dem in den Röhren vorhandenen Natriumcitrat zu gewährleisten und eine Gerinnung des Blutes zu verhindern. Direkt im Anschluss wurden die CPTs 20 min auf 1650 G ohne Bremse zentrifugiert. Durch die Gelbarriere kommt es durch die Zentrifugation zu einer Auftrennung der PBMCs von anderen zellulären Bestandteilen des Blutes. Die PBMCs bilden eine, vom Plasma optisch gut abgrenzbare weiße Schicht, den sogenannten „buffy coat“ oberhalb der Gelbarriere (siehe Abbildung 8).

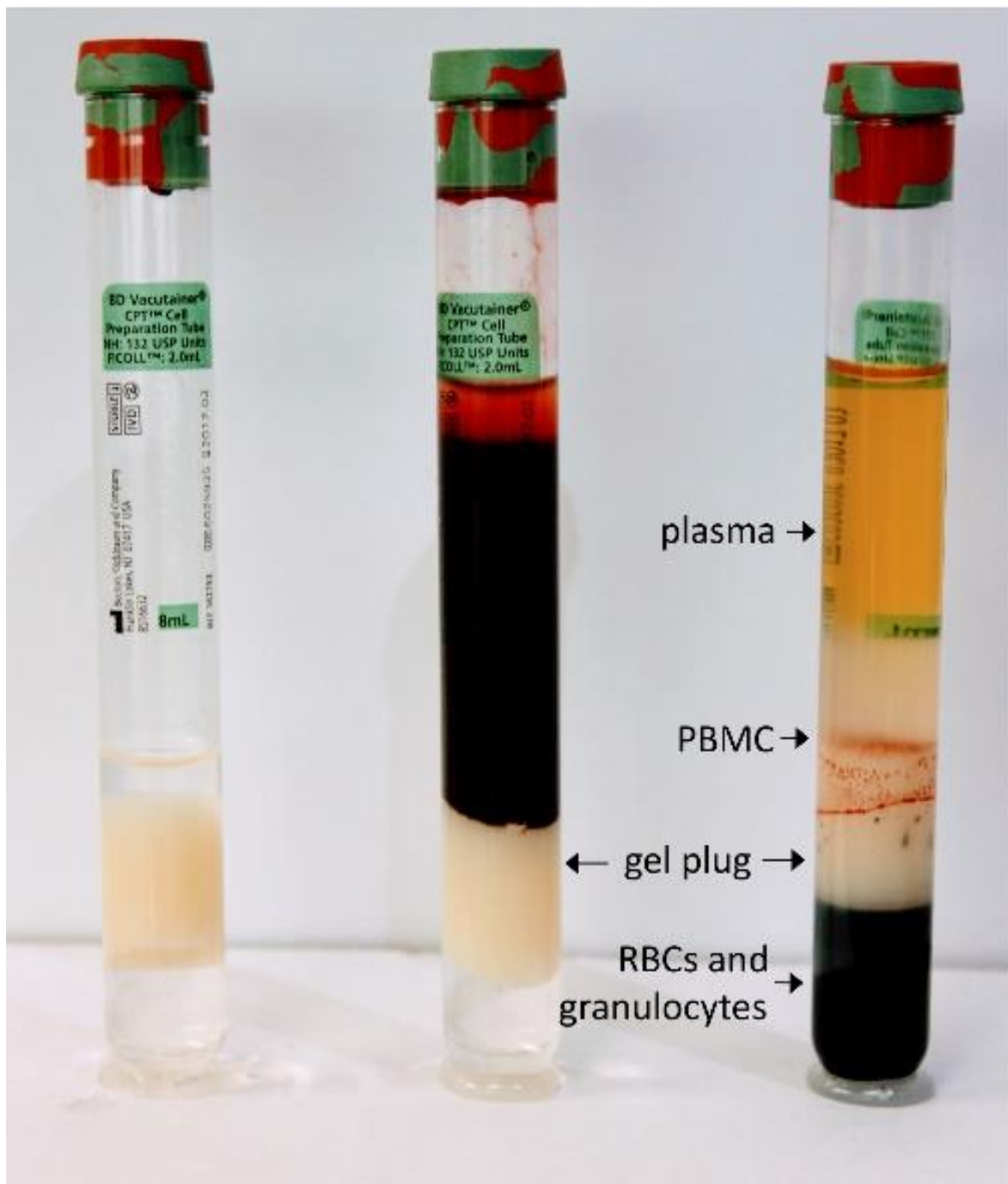


Abb. 8: CPT Röhren zu PBMC Isolierung

links leer, mitte nach Vollblutabnahme, rechts nach Zentrifugation (Puleo, Carroll et al. 2017)

Die weiteren Schritte wurden an einer sterilen Sicherheitswerkbank durchgeführt. Zuerst wurde Plasma separat abpipettiert und auf -80°C gelagert. Durch Schwenken der CPT Vacutainer wurde der „buffy coat“ und das restliche Plasma vermischt und in ein steriles 50ml Falcon überführt. Dieses wurde dann mit DPBS auf 50 ml aufgefüllt und bei 260 G 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet erneut in 5ml PBS resuspendiert und wieder auf 50ml aufgefüllt und erneut bei 260G 10 min zentrifugiert.

Nach diesem zweiten Waschschrift wurde der Überstand erneut verworfen, und die Zellen nun in 2ml RPMI 1640 Medium resuspendiert und gezählt. Die Zählung der Zellen erfolge in 1:20-1:30 Verdünnung mit Türk'scher Lösung (Zellsuspension: RPMI: Türk'sche Lösung in 1:9:10 – 1:14:15 Verdünnung) in einer Neubauer Zählkammer. Da für eine möglichst genaue Zählung die gezählte Zellzahl in der Kammer möglichst über 50 liegen sollte, wurde die Verdünnung je nach Zelldichte zwischen den oben genannten Konzentrationen angepasst. Die Inkubation erfolgte für 5min im Eppendorf-Gefäß, gefolgt von 3min in der Zählkammer mit Lagerung in einer feuchten Kammer.

Die Zellzahl errechnete sich mit folgender Formel wie vom Hersteller angegeben:

$$\text{Zellzahl gesamt in 2 ml RPMI} = \frac{\text{Zellen gezählt}}{4} \cdot 10000 \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 2\text{ml}$$

Um die Zellen für spätere Experimente zu konservieren, wurden die PBMCs nach Zentrifugation auf 260 G 10min und Verwerfen des RPMI, in Freeze-Medium resuspendiert. Letzteres setzt sich zusammen aus hitzeinaktiviertem FBS und 10% Dimethylsulfoxide (DMSO) um die Bildung von Kristallen und damit verbundene Zerstörung der Zellen beim Einfrierprozess zu verhindern (siehe Tabelle 4). Pro Aliquot wurden die Zellen in 1ml Freeze-Medium resuspendiert, wobei die Zellzahl pro Cryo-Tube zwischen 5 bis maximal 20 Millionen lag. Langsam herabgekühlt wurden die Zellen in einem Isopropanol-Behälter (Mr. Frosty, siehe Tabelle 1), welcher ein kontinuierliches Sinken der Temperatur von 1°C/Stunde im -80°C Tiefkühlschrank gewährleistet. Das Isopropanol wurde alle 5 Einfrierzyklen erneuert. Nach 24-48h wurden die Zellen in den Stickstofftank umgesetzt.

3.2 Auftauen der PBMCs

Das Auftauen der PBMCs erfolgte im Wärmebad bei 37°C für ca. 1 Minute bis auf ein kleines Eisstückchen im Gefäß. Das aufgetaute Aliquot wurde dann steril auf der Werkbank geöffnet und mit insgesamt 10ml Medium (RPMI 1640 mit 10% FBS und 2% Penicillin/Streptomycin, vorgewärmt auf 37°C, siehe Tabelle 4) zügig resuspendiert. Ziel war eine möglichst kurze Exposition der Zellen gegenüber des toxischen DMSO zu gewährleisten, da zu langer Kontakt der Zellen zu deren Absterben führen würde. Das zweimalige Waschen der PBMCs erfolgte durch Zentrifugation auf 500G für 5min gelöst in je 10 ml vorgewärmten Medium. Nach erneutem Resuspendieren des Zellpellets wurden die Zellen über Nacht im Inkubator in 10ml auf 37°C und 5% CO₂ mit locker zugedrehtem Deckel im 50ml Falcon ruhen gelassen.

Am nächsten Morgen wurden die Zellzahl der PBMCs bestimmt. Dafür erfolgte zunächst die Zentrifugation des Flacons mit 500G für 5min und anschließend nach Verwerfen des alten Mediums die Resuspension in 2 ml frischem Medium. Als Farbstoff wurde hier Trypanblau in 1:10 Verdünnung (Zellsuspension : Medium : Trypanblau = 1 : 4 : 5) genutzt, da dieser durch seine Eigenschaften nur in nicht vitalen Zellen angelagert wird und diese blau färbt (siehe Tabelle 4). Vitale Zellen sind durch eine Aufhellung im Zentrum von nicht mehr vitalen PBMCs zu unterscheiden. Die Zählung in der Neubauer Zählkammer erfolgte aufgrund der toxischen Eigenschaften des Farbstoffs direkt ohne Inkubationszeit. Die Errechnung der Zahl an vitalen Zellen erfolgte analog zur Formel in der PBMC Isolierung.

3.3 Stimulation der PBMCs

Nach dem Auszählen wurden die PBMCs in einer Konzentration von 0,5-2 Millionen Zellen /well ausplattiert. Für die Gewinnung von RNA oder Protein zur Durchführung eines Westernblot wurden 1-2 Millionen Zellen plattiert. In den Zellkulturexperimenten mit Gewinnung von Überständen wurde je mit 0,5-1 Millionen Zellen gearbeitet.

Stimuliert wurde mit IL-6 in [1ng/ml- 10ng/ml], recombinant Human IL-8/CXCL 8 in [1 ng/ml- 100ng/ml- 200 ng/ml- 250 ng/ml], recombinant endothelial cell derived IL-8 [200 ng/ml] und LPS [100 ng/ml].

Die Stimulationsexperimente in der Zellkultur wurden mit je einem kurzen und einem langen Stimulationsintervall durchgeführt. Die Überstände und Zellen wurden im kurzen Stimulationszeitraum nach 5-8 Stunden geerntet. Der lange Stimulationszeitraum betrug 24-36 Stunden.

Die RNA und Proteingewinnung erfolgte zusätzlich nach kürzeren Stimulationszeiträumen von 10-15 Minuten, um frühe Phosphorylierungen nachzuweisen.

Geerntet wurden die Überstände und Zellen unter sterilen Bedingungen. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

Darüber hinaus erfolgten weitere Stimulationen mit Plasma von HD- Patienten. Das Plasma wurde hierfür in einem Verhältnis von 1:10 mit RPMI Medium verdünnt. Die Plasmastimulation erfolgte über Nacht und pro Probe insgesamt 3 Mal: je einmal mit männlichen und weiblichen Plasma der HD-Patienten, sowie mit einer Plasmamischung aus den männlichen und weiblichen HD-Patienten in einem Mischungsverhältnis von 1:1. Am Folgetag wurden die Plasmastimulationen zusätzlich mit [100ng/ml] IL-8 für 15 Minuten vor dem Ernten der Überstände inkubiert. Diese wurden ebenfalls auf -80°C gelagert und die Zellen für den Westernblot in Ripa Puffer geerntet.

3.4 ELISA

Die Abkürzung ELISA steht für *Enzyme-Linked Immunosorbant Assay* und bezeichnet ein Testverfahren, welches Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper nachweist. In der Technik des Sandwich ELISAs binden zwei Antikörper gegen unterschiedliche Epitope des zu untersuchenden Antigens. Hierfür wird auf einer 96 well Platte (siehe Tabelle 2) ein Film aus einem spezifischen Antikörper gegen das nachzuweisende Protein erzeugt, indem die Platte mit dem ersten Antikörper, dem sogenannten ‚Capture Antibody‘ über Nacht inkubiert wird (Coating). Dieser wurde nach mindestens 12 Stunden Inkubationszeit von der Platte gewaschen (3x). Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, folgte das Blocken der Platte für mindestens 1 Stunde mit 1% BSA-Lösung (siehe Tabelle 4). Nach erneutem Waschen (3x) wurde die zu untersuchende Probe pipettiert. Im Anschluss an die 2-stündige Inkubation der Probe folgte nach 3x maligem Waschen der zweite Antikörper, der ‚Detection Antibody‘, welcher direkt an das Protein bindet und somit die ‚Sandwich‘ Technik des ELISAs komplettiert. Nach weiterer 2-stündiger Inkubation und Waschen der Platte folgt der eigentliche Detektor, das Enzym. Hierbei handelte es sich um die Streptavidin gekoppelte Meerrettichperoxidase (HRP). Streptavidin ist ein bakterielles Protein, welches die Eigenschaft besitzt, Biotin zu binden, und darüber an den biotinierten Detection-Antibody bindet. Nach 20 min lichtgeschützter Inkubation wurden die ungebundenen HRP Moleküle wieder durch 3maliges Waschen aus den Wells entfernt, und nun das Substrat hinzugegeben.

Das Substrat besteht aus zwei Reagenzien, welche kurz vor dem Pipettieren in gleichen Teilen zusammengesetzt werden. Teil A des Substrats besteht aus Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Teil B aus Tetramethylbenzidine ($C_{16}H_{20}N_2$). Tetramethylbenzidine wird durch die Meerrettichperoxidase aktiviert und führt zu einer Blaufärbung. Diese farbkodierte Enzymreaktion wird nach circa 15 bis 20 Minuten, nach abgrenzbarer Färbung der niedrigen Standards, durch die Zugabe von Schwefelsäure ($2 NH_2SO_4$) gestoppt. Dabei kommt es zu einem Farbumschlag ins Gelbe. Die Messung der Absorption im ELISA Reader (siehe Tabelle 1) erfolgte direkt im Anschluss bei 450nm und 560nm Wellenlänge. Zum Nachweis der MMP und des IL-8 per ELISA wurden die unten genannten Test-Kits genutzt (siehe Tabelle 3).

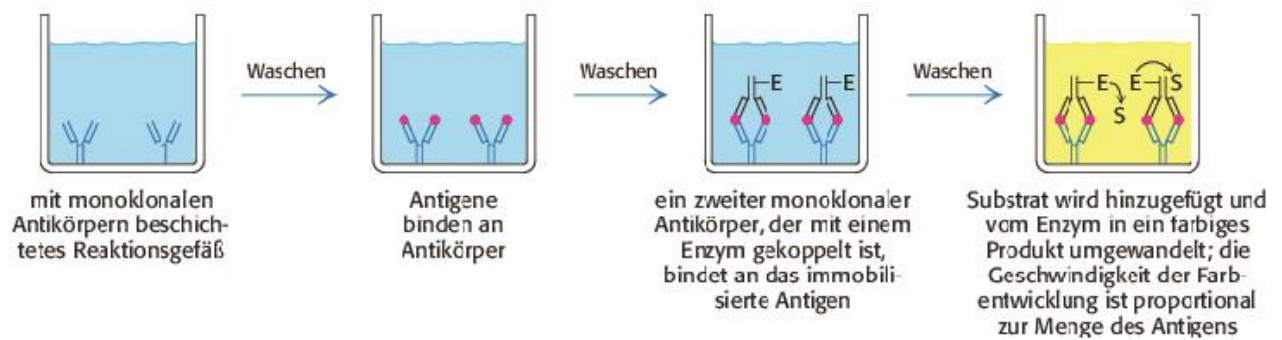


Abb. 9: Prinzip des Sandwich ELISAs Ausschnitt aus einer Abbildung von Berg, Tymoczko et al. (2018)

3.5 Westernblot

Proteingewinnung und Konzentrationsbestimmung: Zur Gewinnung von Probenmaterial wurden die PBMCs wie oben beschrieben in der Zellkultur stimuliert. Die Stimulation erfolgte einerseits für 5 Minuten, um über die Phosphorylierung der Proteine die frühe Aktivierung zu untersuchen, sowie für einen längeren Stimulationszeitraum über 8 bis maximal 36 Stunden. Die Zellkulturplatten wurden nach Ablauf der Stimulationsdauer für 5min auf 500G zentrifugiert, sodass die Zellen in der Mitte der Platte konzentriert waren. Nach Abpipettieren der Überstände wurden die Zellen in je 100-150µl RIPA Puffer (siehe Tabelle 5) lysiert und somit die intrazellulären Proteine gewonnen. Um phosphorylierte Proteine vor Degradation zu schützen, enthielt der RIPA Puffer zudem einen Phosphatase- und Protease-Inhibitor (siehe Tabelle 4).

Vor jedem Westernblot wurde mit Hilfe des BCA Protein Assay Reagent Kits die Proteinkonzentration der zu untersuchenden Proben bestimmt (siehe Tabelle 3). Jede Probe und Standard wurden doppelt pipettiert und gemessen. Nach der Zugabe des BCA Reagenz (im Verhältnis Reagenz A: Reagenz B = 50:1) wurde die Platte für 30 min auf 37°C inkubiert, und direkt im Anschluss die Absorption gemessen. Der Proteingehalt wurde durch Mittelung der Werte errechnet. Anhand dessen berechnete sich die benötigte Menge der Probe zum Beladen des Gels mit einer Gesamtproteinmenge zwischen 20-30 µg. Um die Disulfidbrücken zu lösen und die Proteine zu entfalten wurde ein Puffer und 1M-Dithiothreitol (DTT) hinzugefügt. Die Menge an Samplepuffer [µl] berechnete sich über die zu pipettierende Proteinmenge[µl] *0,25. Die benötigte Menge von 1M DTT errechnete sich dann aus (Proteinmenge [µl] +Samplepuffer [µl]) *0,07 (siehe Tabelle 5). Die Mischung aus Protein, Samplepuffer und 1M DTT wurde 3 Minuten auf 90°C erhitzt, um die Proteine vollständig zu denaturieren. Bis zum Beladen des Gels erfolgte die Lagerung auf Eis.

Gelelektrophorese: In der Gelelektrophorese können Proteine entlang einer elektrisch angelegten Spannung ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Hierfür verwendeten wir SDS Gele mit Puffern aus kommerzieller Herstellung, die mit gleicher Proteinmenge beladen wurden. Für die Westernblots mit Proteinen der

intrazellulären IL-8 Signalkaskade verwendeten wir ein 10% BisTris Gel mit MOPs Running Buffer, welches bei 200V für 1 Stunde und 40 Minuten lief. Für die Durchführung des IL-8 Spaltungswesternblot wurde ein 12% BisTris Gel mit einem MES Puffer bei erneut 200V und 1 Stunde Laufzeit genutzt. Als Marker wurde der Precision Dual Color Standard mit Banden von 10-250 kDa und der Precision Plus Protein Dual Xtra Standards mit Markerbanden von 2-250 kDa in einer Menge von 20-25 µl verwendet (siehe Tabelle 4 und 5).

Membrantransfer und Westernblot: Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine erfolgte der eigentliche Westernblot, das Übertragen der Proteine auf eine Membran. Die Membran (0,45µM PVDF) wurde mit Methanol aktiviert, in dem Blocking-puffer (5% BSA in TBST) geblockt und zum Transfer der Proteine („Blotten“) in einem nassen Minitransblot auf das Gel gelegt. Für den Transfer verwendeten wir einen kommerziellen Transferpuffer (siehe Tabelle 5), welcher mit destilliertem Wasser, TBST und 20% Methanol nach Herstellerangaben verdünnt wurde.

Der Transfer erfolgte über 16 Stunden bei 4°C und 30V (siehe Abbildung 10, Tabelle 1). Die Membranen wurden nach dem Transfer für mindestens eine Stunde in Blockingpuffer (TBST+5%BSA) erneut geblockt. Die primären Antikörper inkubierten jeweils über Nacht in einer Verdünnung von 1:1000- 1:500 in Blocking-Puffer. Die Inkubation von GAPDH erfolgte lediglich für 1 Stunde. Vor der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde die Membran für 30 min in TBST (siehe Tabelle 5) gewaschen. Dabei wurde das TBST immer nach 5min-10min-10min-5min erneuert. Der sekundäre Antikörper wurde ebenfalls in Blocking-Buffer im Verhältnis von 1:10000 verdünnt. Je nach Ursprungstier des primären Antikörpers wurde hier der passende sekundäre- HRP konjugierte- Antikörper gegen Hasen-, Ziegen-, oder Maus- Antikörper (siehe Tabelle 7) gewählt und die Membran für 40 min auf Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte ein weiterer Waschschrift für 30 Minuten. Die Entwicklung der Membran erfolgte mit Luminata Forte Western HRP Substrat beziehungsweise mit Luminata Classico Western HRP Substrat (nur GAPDH) mit einer Inkubationszeit von 5 Minuten (siehe Tabelle 4). Um mehrere Antikörper pro Membran gleichzeitig färben zu können wurden die Membranen entlang der Markerbande in 2 bis 3 Teile nach zu untersuchender Proteingröße geteilt. Als Ladungskontrolle diente GAPDH (37kDa) und Vinculin (124kDa).

Nach Entwicklung wurde das Substrat für 5 min in TBST von der Membran gewaschen und die gebundenen Antikörper mit einer Re-Blot Plus Strong Solution (siehe Tabelle 4) und Inkubationszeit von 15 Minuten entfernt. Nach nochmaligem Waschen für 5 min in TBST wurde die Membran entweder getrocknet und auf 4°C aufbewahrt, oder erneut für 1h geblockt und mit einem weiteren Antikörper inkubiert.

Technische Besonderheiten ergaben sich beim Proteinnachweis nach Plasmastimulation, da sich diese Proben aufgrund der erhöhten Viskosität nur schwer pipettieren ließen.

IL-8 Spaltungswesternblot: Zum Nachweis möglicher IL-8 spaltender Proteasen wurde der gewonnene Überstand aus der Zellkultur zunächst durch einen 30kDa Filter zentrifugiert, um mögliche Verunreinigung durch IL-8 Rückstände der Stimulation zu verhindern. Dabei wurde der Überstand aus der Stimulation mit IL-8 und LPS in einen autoklavierten Filter pipettiert und auf 14000G für 10 Minuten zentrifugiert. Der Teil der Probe, der sich nach Zentrifugation im Eppendorfgefäß befand, enthielt durch die Filtration alle Proteine des Überstands die die 30kDa passieren konnten, und wurde als untere Fraktion bezeichnet. Zum Lösen der verbliebenen oberen Fraktion wurde der Filter gedreht und erneut für 2 Minuten auf 1000G zentrifugiert.

Die obere Fraktion (Proteine >30kDa) wurde dann erneut mit IL-8 versetzt und auf 37°C für insgesamt 3 Stunden inkubiert. Zur Betrachtung des zeitlichen Verlaufs entnahmen wir Anteile direkt nach Stimulation (0 Stunden), sowie 1 und 3 Stunden nach Stimulationsbeginn.

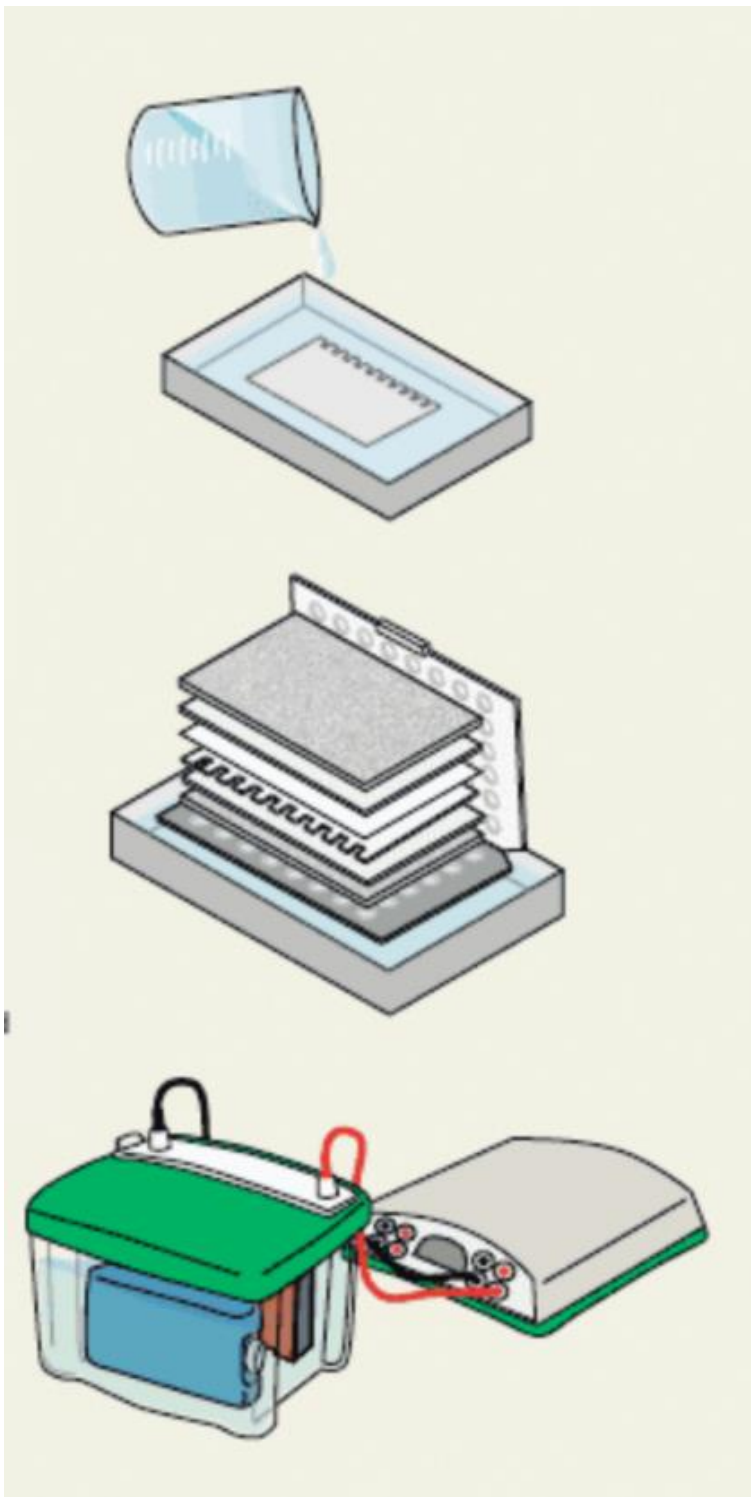


Abb. 10: Schematische Darstellung des Minitransblots- „Sandwich-Technik“

Gel und Membran werden zusammen in Transferpuffer äquilibriert und danach zusammen umgeben von Filterpapier in dem Sandwich aufeinander fixiert und von Transferpuffer umgeben an die Spannungsquelle angeschlossen

(https://www.biorad.com/webroot/web/images/lxr/solutions/technologies/protein_electrophoresis_blotting_and_imaging/western_blotting/technology_detail/pet24_general_wf.gif)

3.6 Bead Array Assay

Der Nachweis von Proteinen erfolgte neben dem Westernblot und ELISA auch über ein Bead Array Assay. Hier werden die Proteine über Beads gebunden und durch unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten in der Durchflusszytometrie (FACS) sichtbar gemacht.

Der Vorteil dieser Methode gegenüber einem ELISA ist, dass durch die unterschiedlichen spezifischen Beads mit 50 µl einer Probe direkt mehrere Zytokine nachgewiesen werden können, während der ELISA spezifisch nur ein Protein nachweist. Die Beads sind analog zum ELISA mit einem ‚Capture‘ Antikörper überzogen. Diese binden die zu untersuchenden Proteine. Daran bindet ein ‚Detection‘ Antikörper, der mit einem Reporter Protein konjugiert ist (siehe Abbildung 11). Es wurden zwei Test-Kits verwendet, welche die Proteine in unterschiedlichen Konzentrationen detektieren können. Einmal das Master Test Kit mit Konzentrationen in [pg/ml], und das Enhanced Test Kit in [fg/ml] (siehe Tabelle 3 und 7).

Für die Durchführung des Bead Arrays wurden die Standards und Proben mit je 50 µl pro Well ausplattiert und der Capture Bead Mix hinzugegeben. Die Dosierung der Beads erfolgte für das Master Test Kit mit 0,5 µl Beads pro Well, für das Enhanced Test Kit mit 1 µl Beads pro Well. Diese wurden mit einer Verdünnungslösung gemischt, sodass 50µl der Capture Antikörper Lösung pipettiert wurde. Der Capture Antikörper wurde für 1h im Master Test Kit und für 2h im Enhanced Test Kit bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. Anschließend wurde der Detektionsantikörper, der zuvor in gleicher Weise wie der Capture Antikörper vorbereitet wurde auf die Platten gegeben. Um eine bestmögliche Vermischung der Beads zu erreichen, wurde die Platte für 5 Minuten auf einer Platte geschüttelt und danach für 2h auf Raumtemperatur inkubiert.

Im Master Test Kit erfolgte danach eine Zentrifugation der Platte auf 350G für 5 Minuten, die Überstände wurden verworfen und die Platte zweimalig mit einem Waschpuffer gewaschen. Die Beads wurden dann in 200 µl resuspendiert und im FACS gemessen.

Im Enhanced Test Kit erfolgte nach der Zentrifugation der Platte und zweimaligem Waschen eine erneute Inkubation für 1h mit einem zusätzlichen Reaktionsreagenz. Die Platte wurde danach erneut gewaschen(1x) und die Beads zur Messung in 200 µl resuspendiert.

Die Messung der Beads erfolgt mit dem FACS Diva (siehe Tabelle 1). Die erhobenen Daten wurden mittels BD Bead Array Software ausgewertet, welche über die Intensität der Fluoreszenz der Reporter Proteine eine Standardkurve erstellt und die Menge der Zytokine in den Proben berechnet. Die Daten wurden zur Statistischen Analyse in Excel exportiert.

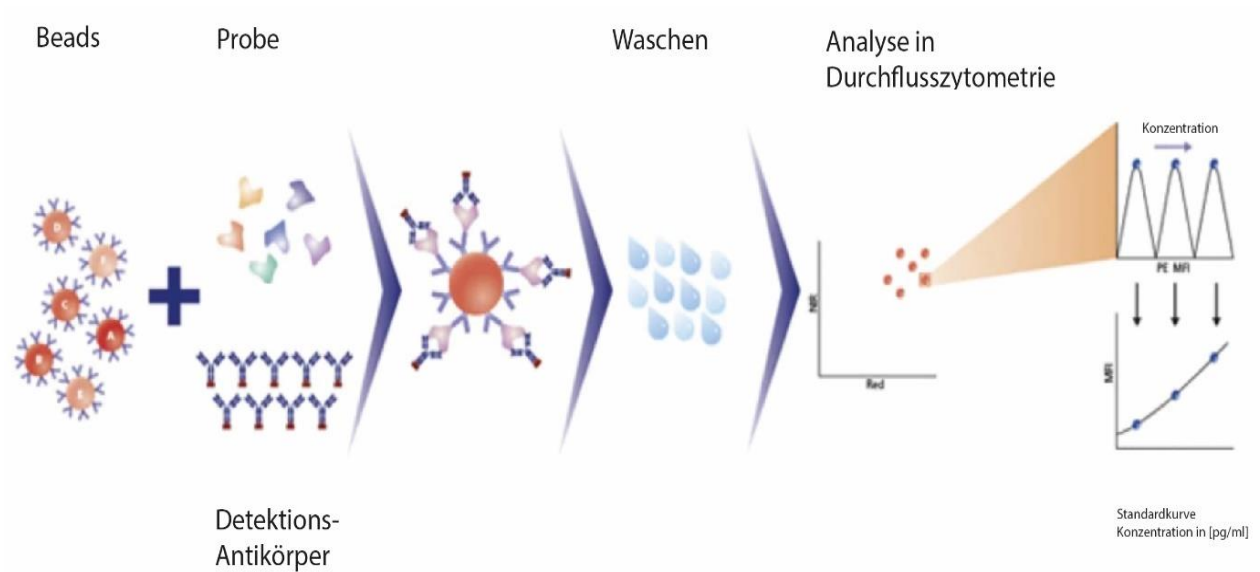


Abb. 11: Schematische Darstellung Bead Array Essay.

Die Beads werden mit Probe und Detektionsantikörper inkubiert. Die Detektionsantikörper sind mit einem Reporterprotein konjugiert (rot). Nach dem Waschen der Platte werden die Beads in der Durchflusszytometrie analysiert. Über die mittlere fluoreszierende Intensität (MFI) des Reporterproteins (PE) wird die Konzentration des vorhandenen Beads berechnet und darüber eine Standardkurve erstellt. (<https://www.bdbiosciences.com/en-us/applications/research-applications/bead-based-immunoassays>)

3.7 RNA Isolation

Die Gewinnung der RNA erfolgte mit dem PureLink®RNA Mini Kit von Ambion (siehe Tabelle 3). Bei Zellzahlen von 1-2Millionen wurde 300 µl Lysis Buffer verwendet und die lysierten Zellen in ein RNase- freies Eppendorf Gefäß überführt. Dazu wurde in gleicher Menge 70% Ethanol pipettiert und das Gefäß gevortext. Danach wurde die Lösung vollständig in ein Filter mit Sammeleppendorf pipettiert und auf 12000 G für 15 Sekunden auf Raumtemperatur zentrifugiert (siehe Tabelle 1). Die in das Sammeleppendorf zentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen und dieser Zentrifugationsschritt 3-4 fach wiederholt, bis die Probe vollständig verarbeitet war. Danach wurden 700 µl Waschpuffer I in den Filter hinzugegeben und das Gefäß erneut für 15 Sekunden auf 12000 G zentrifugiert. Der Filter wurde in ein neues Sammeleppendorf gesetzt. Nun wurden 500 µl vom mit Ethanol versetzten Waschpuffer II auf den Filter gegeben und erneut zentrifugiert. Nach dem erneuten Waschen mit dem zweiten Waschpuffer wurde der Filter für 2 Minuten auf 12000 G trocken zentrifugiert und anschließend in ein neues Eppendorf überführt. Mit 80µl RNase freiem Wasser wurde der getrocknete Filter für 1 min auf Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugieren auf 12000 G für 2 min wurde dann die isolierte RNA aus dem Filter in das Eppendorfgefäß gelöst. Diese wurde auf -80°C gelagert.

3.8 Real-time PCR

Die Real Time Polymerase Kettenreaktion dient zum quantitativen Nachweis von DNA. Die nach oben beschriebenenem Protokoll isolierte RNA musste zur Durchführung der PCR zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Dafür wurde die RNA auf Eis aufgetaut, für maximal 5min auf 65°C erhitzt und danach direkt wieder auf Eis gestellt. 5µl RNA wurde mit 5 µl cDNA Synthesis Mix bestehend aus Fs Buffer 5x, DTT, dNTPs, RNAsin, Acrylamide working solution, Hexa, H₂O und Superscript pipettiert. Der Mix wurde dann für 2h auf 42°C inkubiert. Um die Enzymreaktion zu stoppen, folgte nach 2h ein Erhitzen auf 85°C für 5 Minuten. Die nun in cDNA transkribierte RNA wurde bei -20°C gelagert.

Die Real Time PCR erfolgte mit der cDNA in 1:10 Verdünnung. Für die Durchführung der PCR wurde EvaGreen® mit 5% Reverse und Forward Polymerasen (siehe Tabelle 6) versetzt und mit der cDNA zusammen im Thermocycler gemessen (siehe Tabelle 1). Die Methodik beruht auf der Technik der DNA-Amplifikation. Dabei lässt sich über die Menge der amplifizierten DNA Rückschlüsse auf die ursprünglich vorhandene DNA- Menge ziehen. Die Messung erfolgt in mehreren Zyklen, wobei die Proben zunächst auf etwa 100°C erhitzt werden, um eine Denaturierung des DNA-Doppelstrangs zu erreichen. Die thermostabilen DNA-Polymerasen bleiben weiterhin intakt und können nach Herabkühlen der Probe an die jeweiligen DNA-Einzelstränge einen analogen Doppelstrang synthetisieren. Dieser Schritt wird für mehrere Zyklen wiederholt.

Der Vorteil der realtime PCR besteht darin, dass die Menge der sich vermehrenden DNA, direkt durch Fluoreszenz sichtbar gemacht werden kann, und eine Auftrennung der DNA mittels Gelelektrophorese nicht mehr notwendig ist.

3.9 Migrations- Assay

Zum Nachweis unterschiedlich starker Migration der PBMCs führten wir zwei Migrationsexperimente durch (siehe Tabelle 2). Hierfür wurden Proben von gesunden Kontrollpatienten und HD-Patienten verwendet. Die Durchführung der Migrationsversuche erfolgte mit der freundlichen Unterstützung des Laborbiologen Javier Carbajo.

Zunächst untersuchten wir die Migration in der unidirektionalen Migrationskammer (siehe Abbildung 12 links). PBMCs männlicher und weiblicher Dialysepatienten wurden gepaart pipettiert und als Stimulationsreiz, neben der Negativkontrolle mit normalem Medium, Interleukin 8 [100ng/ml] verwendet. Nach 6 und 24 Stunden wurde die Kammer unter dem Mikroskop fotografiert und die Zahl der Zellen pro Streckenabschnitt in Zusammenhang zur Gesamtzellzahl und des jeweils anderen Geschlechts gesetzt.

Im zweiten Experiment wurde nicht IL-8 allein als Stimulationsreiz genutzt, sondern es erfolgte ein bidirektionaler Experimentaufbau (siehe Abbildung 12 rechts): PBMCs gesunder Probanden wurden in die Mitte der Migrationskammer pipettiert. Rechts und links davon wurde als Stimulationsreiz der Überstand aus der Zellkultur, der mit Interleukin 8 stimulierten PBMCs männlicher und weiblicher Dialysepatienten, hinzugegeben.

Der Überstand wurde analog zum IL-8 Spaltungswesternblot (siehe Kapitel 3.5) mittels einem 30kDa Filter in eine obere Fraktion (Proteine >30kDa) und eine untere Fraktion (Proteine <30kDa) beziehungsweise auch als volle Fraktion mit allen Proteinen verwendet. Die obere Fraktion wurde erneute mit IL-8, sowie IL-8 und Proteinaseinhibitor versetzt und zur Migrationsstimulation verwendet. Analog zum unidirektionalen Experiment wurde nach 6, 12 und 24 Stunden die Kammer unter dem Mikroskop fotografiert und die Zellzahlen auf der Seite der männlichen mit der auf weiblicher Seite verglichen.



Abb. 12: Verwendete Migrationskammern für unidirektionale Migration (links) für je 6 Proben und bidirektionale Chemotaxis (rechts) für je 3 Proben

(https://ibidi.com/img/cms/products/labware/channel_slides/S_8060X_Slide_VI04/S_8060X_Slide_VI04_RGB.jpg und

https://ibidi.com/img/cms/products/labware/channel_slides/S_8032X_Chemotaxis/S_8032X_Chemotaxis_RGB.jpg)

3.10 Auswertung und Statistische Analyse

ELISA: Die gezeigten Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte der jeweils in Männern und Frauen gemessenen Proteinmengen nach Stimulationsmodus mit dem dazugehörigen „Standard Error of the Mean“ (SEM). Die Auswertung erfolgte in Microsoft Excel. Test auf Signifikanz erfolgte mit dem T-Test.

Westernblot: Die Entwicklung der Westernblots erfolgte mit der INTAS Kamera und dazugehöriger Software. Die Dauer der Entwicklung betrug je nach Antikörper zwischen 2-15 Minuten.

Bead Array: Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit der Software von BD Systems, die ein Export der berechneten Daten in Microsoft Excel ermöglicht. In Excel erfolgte die Analyse analog zur Auswertung des ELISAs.

ISAR Kohorte: Der ISAR Datensatz wurde mit Hilfe der Auswertungssoftware SPSS statistisch analysiert. Die IL 8 Daten konnten unter Anwendung des natürlichen Logarithmus [statistischer Ausdruck: $\ln(\text{value}+1)$] die Normalverteilung erreichen. Neben der Überlebenskurve (Kaplan-Meier-Analyse) wurden Logrank und Chi-Quadrat-Tests durchgeführt und auf ihre Signifikanz hin geprüft. Relevante klinische Parameter wurden vom ISAR Konsortium gesammelt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

3.11 Studienkollektive und Patientenproben

ISAR Kohorte: Die Isar-Kohorte (Risikostratifikation in ESRD- die ISAR Studie NCT01152892) bildet ein Dialysekollektiv von insgesamt 519 Patienten aus 17 Dialysezentren in und um München, welches zwischen September 2010 bis Januar 2014 rekrutiert wurde und bis zum heutigen Datum jährlich nachverfolgt wird (Stand 2020). Neben den klinischen Daten wurden auch Serum und EDTA Blut gewonnen, eine 24h Blutdruckmessung mit Bestimmung der Pulswellengeschwindigkeit, ein 24h EKG, sowie die statische und dynamische Messung der retinalen Gefäße und eine neurokognitive Testung mit dem MoCa Test durchgeführt. Ziel der prospektiven Studie war es eine neue Risikostratifizierung bezüglich der erhöhten Gesamtmortalität sowie der kardiovaskulären Mortalität von Dialysepatienten zu erstellen (Schmaderer, Tholen et al. 2016). In die hier vorliegende Auswertung konnten mangels Serummaterialien und nach Ausschluss farbiger Patienten aus der Analyse zu IL-8 letztendlich 465 Patienten eingeschlossen werden (Männer n= 321, Frauen n=144) (Daten erhoben und zur Verfügung gestellt durch das ISAR Konsortium).

Citrat-Acetat-Studie: Im Rahmen Citrat-Acetat-Studie (NCT02745340) wurden die Unterschiede zwischen Acetat und Citrat im Dialysat untersucht. Die Studie wurde im cross over Design durchgeführt und Citrat im experimentellen Arm als Ersatz für Acetat untersucht. Die Studienarme wurden bezüglich der Morbidität und Lebensqualität miteinander verglichen. Dabei wurden im Gegensatz zur ISAR Kohorte neben den klinischen Daten und Serum auch PBMCs und Plasma isoliert. Die PBMCs aus dieser Studie dienten in dieser Arbeit als Dialysepatientenmaterial der Stimulationsexperimente mit Interleukin 8 (n=39).

MCO Filter Studie: Diese Dialysestudie (NCT03270371) wurde von Juli 2017 bis Februar 2018 beziehungsweise Januar 2018 bis August 2018 an insgesamt 46 Dialysepatienten (ambulante HD- Patienten des Klinikum rechts der Isar und Patienten des KfH-Dialysezentrums in Dachau) durchgeführt. Das Studiendesign entsprach einer Cross-over Studie. Die Patienten wurden randomisiert in 2 Gruppen eingeteilt- eine Gruppe erhielt den Medium-cut-off Filter bereits im ersten Abschnitt der Studie, die zweite Gruppe im zweiten Studienabschnitt. Der Aufbau gliederte sich in eine 1-monatige „Run in“ und „Wash-out“ Phase zu Beginn und zwischen den 3 -

monatigen Studienarmen, in denen alle Patienten mit dem Vergleichsfilter FX80 oder FX60 dialysiert wurden.

Im ersten Studienabschnitt erhielten die Patienten der ersten Gruppe für 90 Tage den experimentellen Medium Cut off Filter (Theranova 400), während die Patienten der Kontrollgruppe weiter mit dem Vergleichsfilter dialysiert wurden. Im zweiten Abschnitt der Studie wurden die Gruppen gemäß des Cross-over Design nun getauscht.

Im Studienverlauf, jeweils zum Beginn und Ende des 90-tägigen Abschnitts, erfolgte die Abnahme eines 24h-Urinsammelurin und Stuhlproben, als auch Blutproben vor Dialysebeginn sowie Dialysat, das kontinuierlich über die gesamte Dialysedauer gesammelt wurde. Auch sequenziell während der Dialyse wurde 1h, 2h und 4h nach Dialysebeginn erneut Blut abgenommen.

Aus diesem Studienkollektiv wurde im Rahmen der Untersuchung der Inflammation durch IL-8 die sequenziellen Serumproben verwendet und der FX80/60 gegenüber dem Theranova 400 verglichen. Dabei wurden 34 Patienten, die die Studie erfolgreich beendet haben in die Berechnung eingeschlossen (10 Frauen, 24 Männer)

Probenmaterial Patienten und gesunde Kontrolle des experimentellen Teils: Die im Folgenden gezeigten Ergebnisse wurden an insgesamt 39 Dialysepatienten aus dem Kollektiv der Citrat Acetat Studie erhoben. Davon waren 19 Patienten weiblichen, 20 Patienten männlichen Geschlechts gepaart nach Alter und Komorbiditäten.

Die auf die Dialysepäarchen, nach Alter und Komorbiditäten gepaarte, gesunde Kontrolle beinhaltete insgesamt 31 Patienten, davon 16 weibliche und 15 männliche.

Im Rahmen der Etablierung verschiedener Methoden, wurden gesunde Kontrollproben von Mitarbeitern des Klinikums rechts der Isar gesammelt. Diese junge gesunde Gruppe beinhaltete insgesamt 26 Probanden, davon 14 weibliche und 12 männliche, die nach Alter gepaart wurden.

3.12 Material und Reagenzien

Tabelle 1 **Laborgerätschaften**

Gerät	Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
ELISA-Reader	Multiscan FC	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA
Durchfluss- zytometer	CytoFLEX	Beckman Coulter, Californien, USA
	BD FACS Canto™	Becton Dickinson, New Jersey, USA
Analysesoft-ware	FlowJo software	TreeStar, Ashland, US
	FCAP Array Software v3.0	BD Biosciences, New Jersey, USA
Inkubator	Heracell™ 150i CO2 Incubator	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA
Sicherheitswerk- bank	HeraSafe®	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mr. Frosty	Qualifreeze Cryo- Einfriergerät	Qualilab®, Olivet, Frankreich
Zentrifuge Eppendorf	Centrifuge 5424 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Tubes	Multifuge 3 L-R	Heraeus, Hanau, Deutschland
pH- Meter	pH-Meter	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Vortex	Vortex Mixer 7-2020	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph, Schwabach, Deutschland BioRad Laboratories, Californien, USA
Spannungs-quelle	PowerPac 1000 EC3000P	Thermo EC, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA
Heizplatte	Thriller	Peqlab/VWR International, Pennsylvania, USA
Heizblock	HBT 130	HLC BioTech/DITABIS, Pforzheim, Deutschland
Schwenker	Duomax 1030	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Kamera Westernblot	ChemoStar INTAS	Intas Science Imaging GmbH, Göttingen, Deutschland
Mikroskop	OptTech	OptTECH Germany

PCR Cycler	Lightcycler	Roche, Basel, Schweiz
Manuelle Pipettierhilfe	eppendorf Research 200, 100, 10 µl eppendorf research plus 1000, 100, 10µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Corning Lambda Plus Single Channel Pipettor 1000, 200, 100, 20, 10 µl	Sigma Aldrich, Missouri, USA
Wasserbad- Inkubator	SW 21	Julabo Labortechnik, Seelbach, Deutschland
Zählkammer	C-CHIP Neubauer Improved Einweg- Zählkammer Art. Nr. DHC-N01	NanoEnTek Inc., Seoul, Korea
Stickstofftank		

Tabelle 2 Einwegmaterialien

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller
eppendorf Tubes	0,5ml, 1,5ml, 2ml	eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tubes	15ml, 50ml Cellstar TUBES	greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
12 /24 Well-Platten Zellkultur	12/24 Well ZellkulturTestPlatte	TPP, Trasadingen, Schweiz
96 well PlattenELISA 96 well Platten FACS	96 well plate, flat bottom ELISA Platte, Medium Bind. V-Bottom	Thermo Scientific, Massachusetts, USA Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Westernblot-membran	PVDF Membran 0,45 µm	Merck Millipore, Massachuettes, USA
Vollblut für PBMC Isolation	BD Vacutainer® CPT™ Röhrchen Art. Nr.: 362782	Becton Dickinson, New Jersey, USA
Serumaquisition	S-Monovette® 7,5 ml Z Art. Nr. 01.1601	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Cryo-Tubes	Cryo Tubes 1,6ml Art. Nr. 72.380	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen	SurPhob Spitzen 1000, 200,10 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Migrationskammer	Channel slides Cat.no. 80606, 80326	Ibidi, Gräfelfing, Deutschland

Tabelle 3 Kits

Verwendung	Kit	Hersteller
Elisa	Human MMP-9 DuoSet ELISA (DY911) Human MMP-2 DuoSet ELISA (DY902) Human Total MMP-8 DuoSet ELISA (DY908) Human Total MMP-1 DuoSet ELISA (DY901B) Human IL-8/CXCL8 DuoSet ELISA (DY208) Human IL-6 Quantikine ELISA kit (S6050)	R&D Systems, Minnesota, USA
RNA Isolierung	ambion by life technologies™ PureLink® RNA Mini Kit	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Proteinbestimmung	Pierce™ BCA Protein Assay Kit (#23227)	
Bead Array Assay	BC Cytometric Bead Array (CBA) (558265) BC Cytometric Bead Array (CBA) (561523)	BD Biosciences, New Jersey, USA

Tabelle 4 Chemikalien, Reagenzien, Medien, Liganden

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller
Zellfärbung für Zählung	Türk'sche Lösung zur Leukozytenzählung Art. Nr. 11651.00500	Morphisto Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
	Trypanblau Lösung (0,4%) Art. Nr. T8154	Sigma Aldrich, Missouri, USA
Zellfreezing	Bovine Calf Serum Art.Nr. 12133C Dimethylsulfoxid (DMSO) Art. Nr. D2660 Freezemedium: 10% FCS +(1%DMSO)	
Waschpuffer/ FACS Puffer	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Art. Nr. D8537	
Medium Zellkultur	RPMI 1640 Medium Art. Nr. R875	
Antibiotika	Penicillin-Streptomycin 10000 units/10mg/ml Art. Nr. P4333	
Liganden (CXCR)	IL-8 recomb. Art.Nr. 208-IL	R&D Systems, Minnesota, USA
	IL-8 endothelial cell derived Art. Nr. 618-IL/CF	
Liganden (TLR)	IL6 Art. Nr. 8904LF	Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA
	LPS	
Bovines Serum Albumin (BSA)	BSA Art. Nr. A9647	Sigma Aldrich, Missouri, USA
Proteinase Inhibitor	PhosphoSTOP EASYpack Art. Nr. 04906837001	Roche, Basel, Schweiz
Phosphatase Inhibitor	complete ULTRA Tablets, Mini EASYpack, Art. Nr. 05892970001	
Protein- Marker	Precision Dual Color Standards Art. Nr. #161-0374 Precision Dual Color standards Art. Nr. #161-0377	Bio-Rad, Californien, USA

Substrat Westernblot	Luminata Classico Western HRP Substrat Art. Nr. WBLUC0500 Luminata Forte Western HRP Substrat Art. Nr. WBLUF0500	Merck Millipore, Massachusetts, USA
Reblotting Westernblot	Reblot Solution (10x) Art. Nr. 2488967	
rt-PCR	Superscript	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
andere Chemikalien	Tween 20 H ₂ SO ₄ Isopropanol, Methanol	Sigma Aldrich, Missouri, USA

Tabelle 5 Pufferzusammensetzung

Verwendung	Puffer	Zusammensetzung/Hersteller
Protein-extraktion	RIPA Puffer Art. Nr. R0278	Sigma Aldrich, Missouri, USA
Sample-buffer	NuPAGE™, LDS SampleBuffer (4x) Art. Nr. NP0007 DL-Dithiothreitol solution (DTT) Art. Nr. 646563	invitrogen, Thermofisher Scientific, Massachusetts, USA Sigma Aldrich, Missouri, USA
Gelelektrophorese	NuPAGE™ 10% Bis-Tris Gel 1,5mm; 12% Bis-Tris Gel 1,0mm	invitrogen, Thermofisher Scientific, Massachusetts, USA
Westernblot	TBS (10x)	24,23g TRIS-hydrochlorid, 80,06g NaCl, 800ml dd Wasser, pH 7,6
Wasch-puffer	TBS-T	100ml TBS (10x) + 900ml dd Wasser + 1ml Tween 20
	MOPs SDS Running Buffer	novex by life technologies Art. Nr. NP0001 Thermofisher
	MES SDS Running Buffer	novex by life technologies Art. Nr. NP0002 Thermofisher 50 ml Running Buffers verdünnt mit 950 ml dd Wasser
	Transferbuffer	novex by life technologies Art. Nr. NP0006-1 Thermofisher 50 ml Transfer Buffers verdünnt mit 750 ml dd Wasser+200ml Methanol
	Blocking Buffer	novex by life technologies Art. Nr. NP0006-1 Thermofisher 50 ml Transfer Buffers verdünnt mit 750 ml dd Wasser+200ml Methanol 5% BSA in TBST
ELISA Kits	Reagent Diluent R&D ELISA Kits Stop Solution H ₂ SO ₄	Reagent Diluent (10x) Art. Nr. DY995, R&D Systems

Tabelle 6 Primer RT PCR

Gen	Accession Nr.	Sequenz
18S	NM_014716	forward primer: 5'-GCAATTATTCCCCATGAACG-3' reverse primer: 5'-AGGGCCTCACTAAACCATCC-3'
GAPDH	NM_002046	forward primer: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' reverse primer: 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTCC-3'
IL-8	NM_000584	forward primer: 5'-GGTGCAGTTTTTGCCAAGGAG-3' reverse primer: 5'-TTCCTTGGGGTCCAGACAGA-3'
CXCR 1	NM_000634	forward primer: 5'-ATCTGTCCCTGCCCTTCTTC-3' reverse primer: 5'-GACGACAGCAAAGATGACCC-3'
CXCR 2	NM_001557	forward primer: 5'-CAGTTACAGCTCTACCCTGCC-3' reverse primer: 5'-CCAGGAGCAAGGACAGACCC-3'
MMP-2	NM_004530	forward primer: 5'-AGCGAGTGGATGCCGCCTTTAA-3' reverse primer: 5'-CATTCCAGGCATCTGCGATGAG-3'
MMP-8	NM_002424	forward primer: 5'-TGGACCCAATGGAATCCTTGC-3' reverse primer: 5'-ATAGCCACTCAGAGCCCAGTA-3'
MMP-9	NM_004994	forward primer: 5'-CACTGTCCACCCCTCAGAGC-3' reverse primer: 5'-GCCACTTGTCGGCGATAAGG-3'
MMP-12	NM_002426	forward primer: 5'-TGGACCTGGATCTGGCATTG-3' reverse primer: 5'-GTGGGGAACATTACGGCCTT-3'
TIMP-1	NM_003254	forward primer: 5'-GACGGCCTTCTGCAATTCC-3' reverse primer: 5'GTATAAGGTGGTCTGGTTGACTT-3'

Tabelle 7 Antikörper

Verwendung	Bezeichnung/Zielstruktur	Hersteller	
Primäre Antikörper WB	Phospho-p38MAP Kinase Art. Nr. #9211	Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA	
	Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) Art. Nr. #9101		
	Phospho-Akt (Ser473) Art. Nr. #9275		
	Akt (pan) (40D4) Art. Nr. #2920		
	Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) Art.Nr. #9251		
	Stat3 (79D7) Art. Nr. # 4904		
	Phospho-Stat3 (Tyr705) (D3A7) Art. Nr. #9145		
	GAPDH (D16H11) Art. Nr. #5174		
	Human Phospho Src (Y416) Art. Nr. MAB2685		R&D Systems, Minnesota, USA
	Human IL-8/CXCL8 Antibody Art. Nr. AF-208-NA		
	IL-8 (1-77) (CXCL8) Monoclonal Antibody (N11) Art. Nr. 14-7189-80	eBioscience™, Thermofisher Scientific, Massachusetts, USA	
Sekundäre Antikörper Westernblot	rabbit anti-goat IgG-HRP sc-2768	Santa Cruz Biotechnology, Californien, USA	
	goat anti-mouse IgG-HRP sc-2005		
	goat anti-rabbit IgG-HRP sc-2004		
Beads soluble Proteins Master Kit	IP-10 Art. Nr. 558280	BD Biosciences, New Jersey	
	Rantes Art. Nr. 558324		
	Fractalkine Art. Nr. 560265		
	Granzyme B Art. Nr. 560304		
	VEGF Art. Nr. 558336		
	MCP-1 Art. Nr. 558287		
	IL-8 Art. Nr. 558277		
	IL-12p70 Art. Nr. 558283		
	IL-6 Art. Nr. 558276		
	MIP-1a Art. Nr. 558325		
	MIP-1b Art. Nr. 558288		
	IL-11 Art. Nr. 560228		
	IL-13 Art. Nr. 558450		
	Eotaxin Art. Nr. 558329		
	MIG Art. Nr. 558286		

Beads
Enhanced
Human
Soluble
Proteins
Master Kit

eIL-2 Art. Nr. 561517
eIL-4 Art. Nr. 561510
eIL-17A Art. Nr. 562261
eIL-10 Art. Nr. 561514
eIFN- γ Art. Nr. 561515
TNF α Art. Nr. 560112
eIL-6 Art. Nr. 561212

BD Biosciences, New
Jersey, USA

4. Ergebnisse

4.1 HD-spezifische geschlechterabhängige Unterschiede im IL-8 Signaling

4.1.1 Junge gesunde Vergleichsgruppe zeigt keine geschlechterspezifischen Unterschiede im IL-8 Signaling nach Stimulation

Interleukin 8 zeichnet sich durch vielfältige, vornehmlich proinflammatorische, Wirkung und Funktion im menschlichen Organismus aus. Die bekannteste Funktion ist die Migration neutrophiler Granulozyten zum Ort der Entzündung, sowie die Induktion von weiteren Proteasen und Adhäsionsmolekülen, darunter vor allem MMP-9, die die Diapedese durch Degradation der extrazellulären Matrix erleichtert (Baggiolini, Walz et al. 1989, Baggiolini und Clark-Lewis 1992).

Um die Frage nach geschlechterspezifischen Unterschieden in der Wirkung von IL-8 in Dialysepatienten zu beantworten, begannen wir zunächst mit einer jungen gesunden Vergleichsgruppe und stimulierten PBMCs mit Interleukin 8 und LPS. Um die Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade zu untersuchen, lysierten wir die Zellen nach circa 10-minütiger Stimulationsdauer, um die frühe Phosphorylierung im Rahmen der Aktivierung dieses Signalweges darzustellen. Im Westernblot zeigte sich bei insgesamt 4 männlichen und 3 weiblichen Probanden ähnlich starke Banden für pJNK, pSTAT3, sowie auch AKT und pMAPK in Frauen und Männern (siehe Abbildung 13A). Auch in der Messung der mRNA nach längerer Stimulationsdauer über 6 Stunden konnten keine signifikanten Unterschiede der Geschlechter in der Expression von IL-8, MMPs, und CXCR1/CXCR 2 festgestellt werden. Lediglich MMP-8 wies eine signifikant höhere Expression nach IL-8 Stimulation in Frauen auf (siehe Abbildung 13B).

Zusammenfassend konnte in der jungen gesunden Vergleichsgruppe kein signifikanter Unterschied in der Intensität der intrazellulären Aktivierung durch Interleukin 8 Stimulation nach kurzer Stimulationsdauer gezeigt werden. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch nach langer Stimulation (nicht gezeigt).

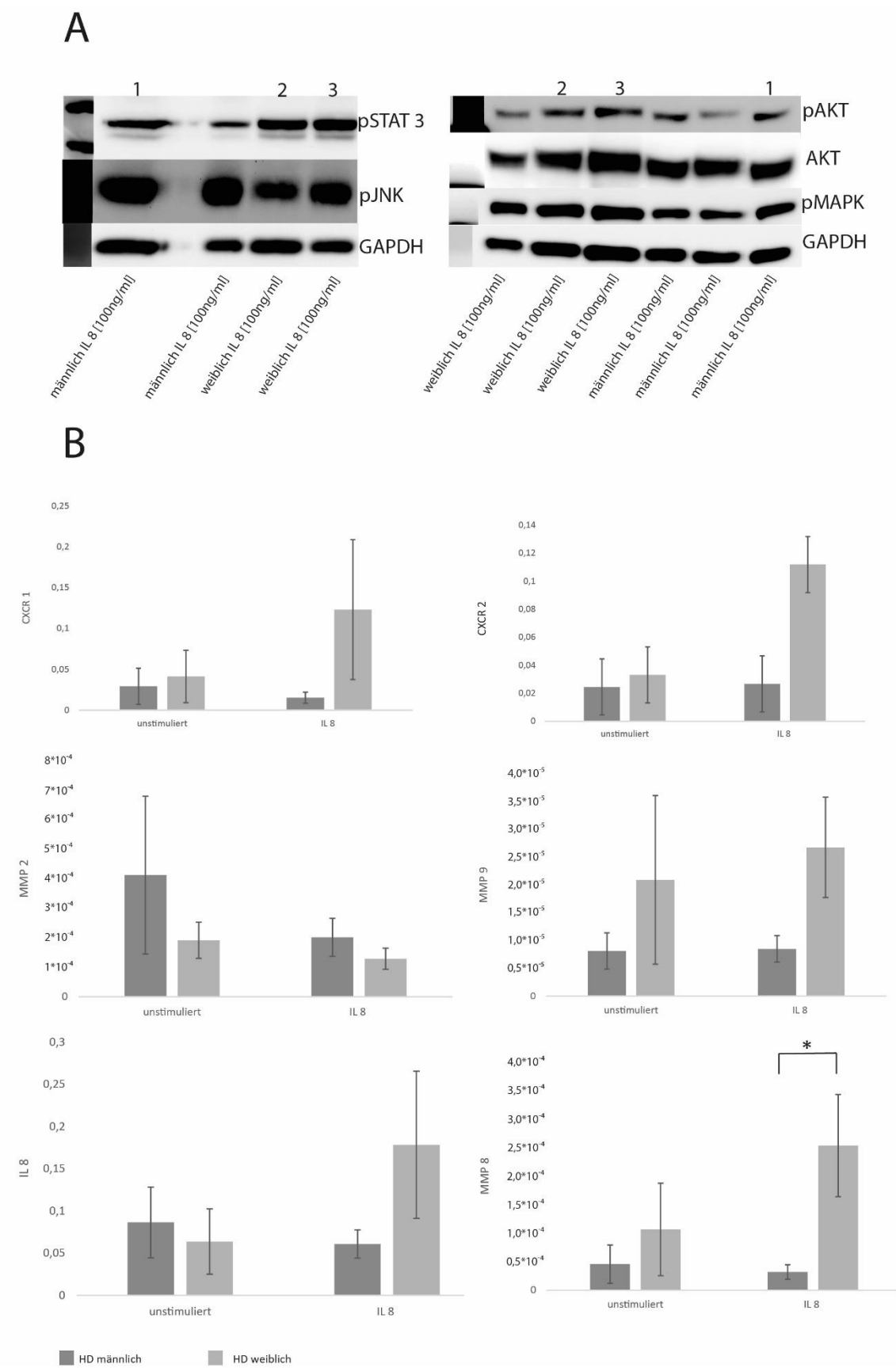


Abb. 13: Geschlechterspezifische Unterschiede nach IL-8 Stimulation in junger gesunder Vergleichsgruppe

A: Westernblot: Proteine der IL-8 Signalkaskade- pSTAT3 (79,86 kDa), pAKT (60 kDa), AKT (60 kDa), pJNK (46,54 kDa), pMAPK (43 kDa), Loadingkontrolle mit GAPDH (37 kDa)
Zahlen (1-3) kennzeichnen identische Patienten IDs (Männer n=4, Frauen n=3)

B: mRNA Expression (Männer n=7, Frauen n=5): geschlechterabhängige signifikanter Unterschiede nach Stimulation mit IL-8 in der MMP-8 Expression

Statistischer Vergleich mittels T-Test für unabhängige Stichproben, mit Signifikanzniveau * $p=0,02$

Auf der X-Achse männliche und weibliche HD-Patienten in der unstimulierten Negativkontrolle und nach Stimulation mit IL-8, $mRNA = (\text{Zyklusanzahl (RNA)} - \text{Zyklusanzahl (18S)})^2$ normiert auf GAPDH

4.1.2 HD- abhängiges geschlechterspezifisches IL-8 Signaling

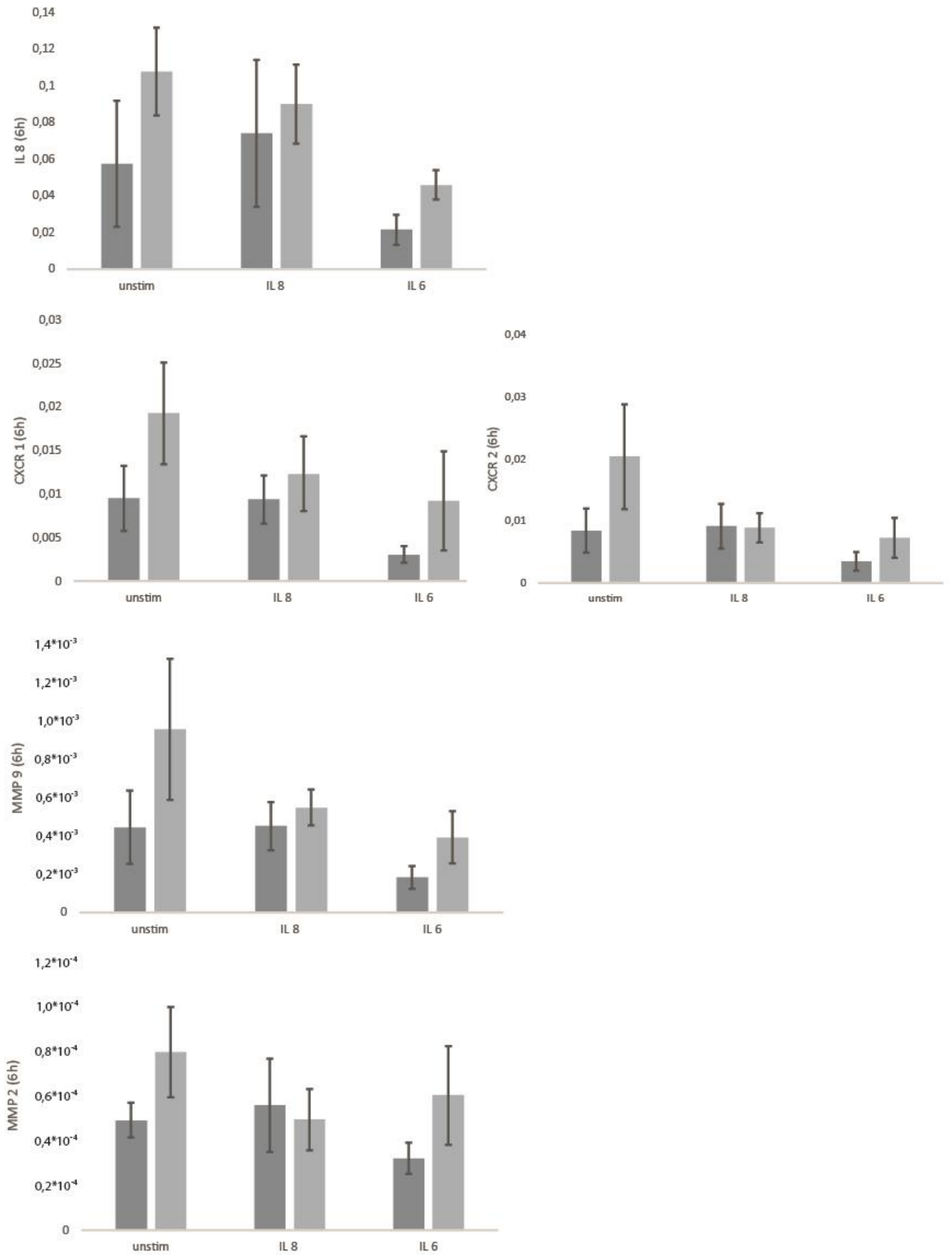
Nachdem in der jungen gesunden Vergleichsgruppe kein geschlechterspezifischer Unterschied im IL-8 Signalweg sowohl auf RNA als auch auf Proteinebene festgestellt werden konnte, untersuchten wir die PBMCs von HD- Patienten. Im analogen Versuchsaufbau zur jungen gesunden Gruppe erfolgte die mRNA Bestimmung nach 6 und 24h Stimulationsdauer. Auf RNA Ebene konnte auch bei HD-Patienten kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. (siehe Abbildung 14A+B).

Die verstärkte MMP-8 RNA-Expression ließ sich bei den HD- Frauen nicht reproduzieren (Daten nicht gezeigt).

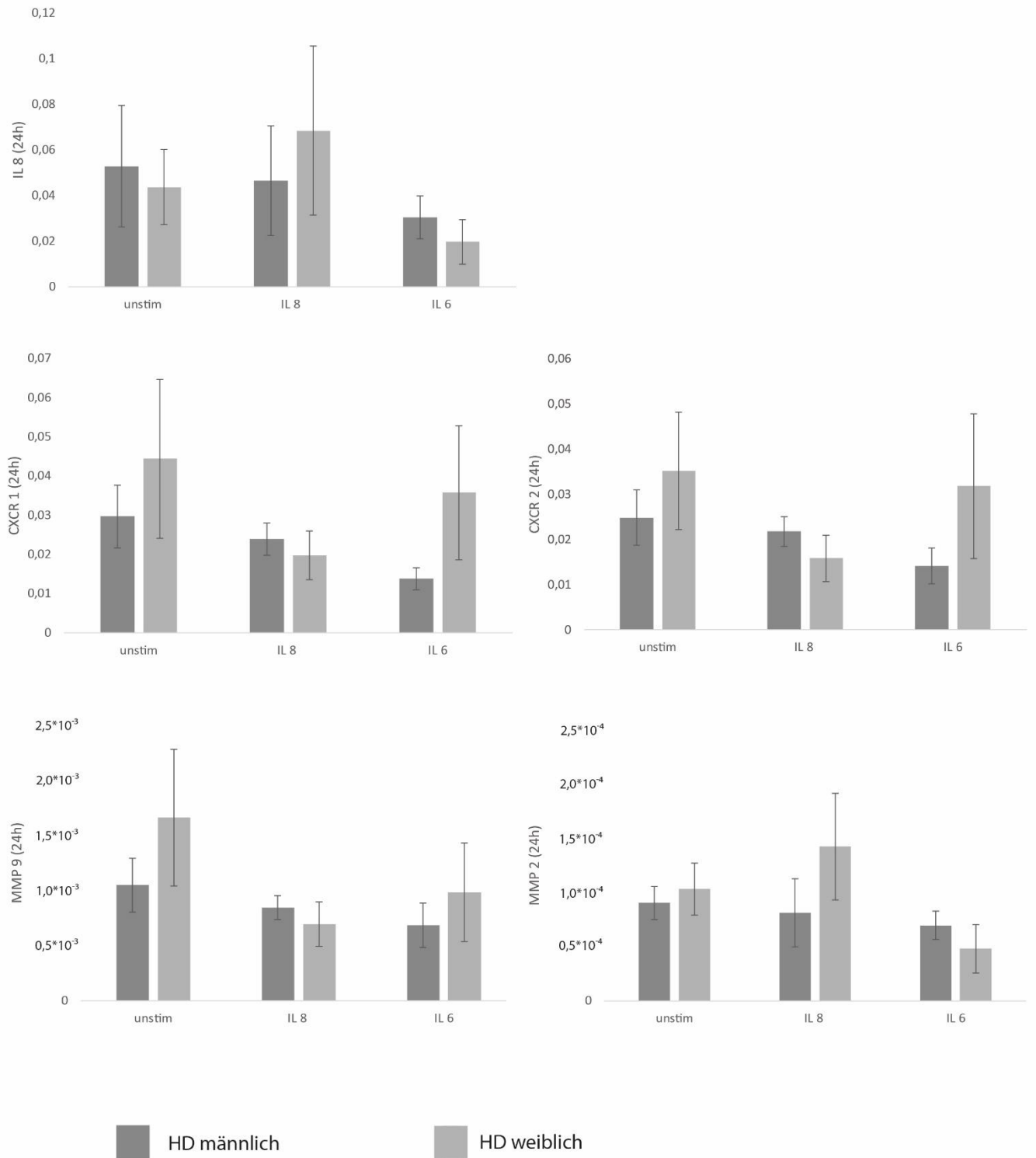
Auf Proteinebene im Westernblot zeigte sich nach langer Stimulationsdauer (20h) eine verstärkte Bande von pSTAT3 und pMAPK in Männern gegenüber Frauen, während nach 15-minütiger Stimulation (nicht gezeigt) kein Unterschied in der Phosphorylierung feststellbar war (siehe Abbildung 14C).

Zusammenfassend sind in der Expression der mRNA auch bei HD- Patienten keine signifikanten Unterschiede nachweisbar. Auf Proteinebene zeigt sich aber eine stärkere Ausprägung der intrazellulären IL-8 Signalproteine nach langer Stimulationsdauer in den Männern. Dies spricht für eine stärkere intrazelluläre inflammatorische Reaktion auf IL-8.

A



B



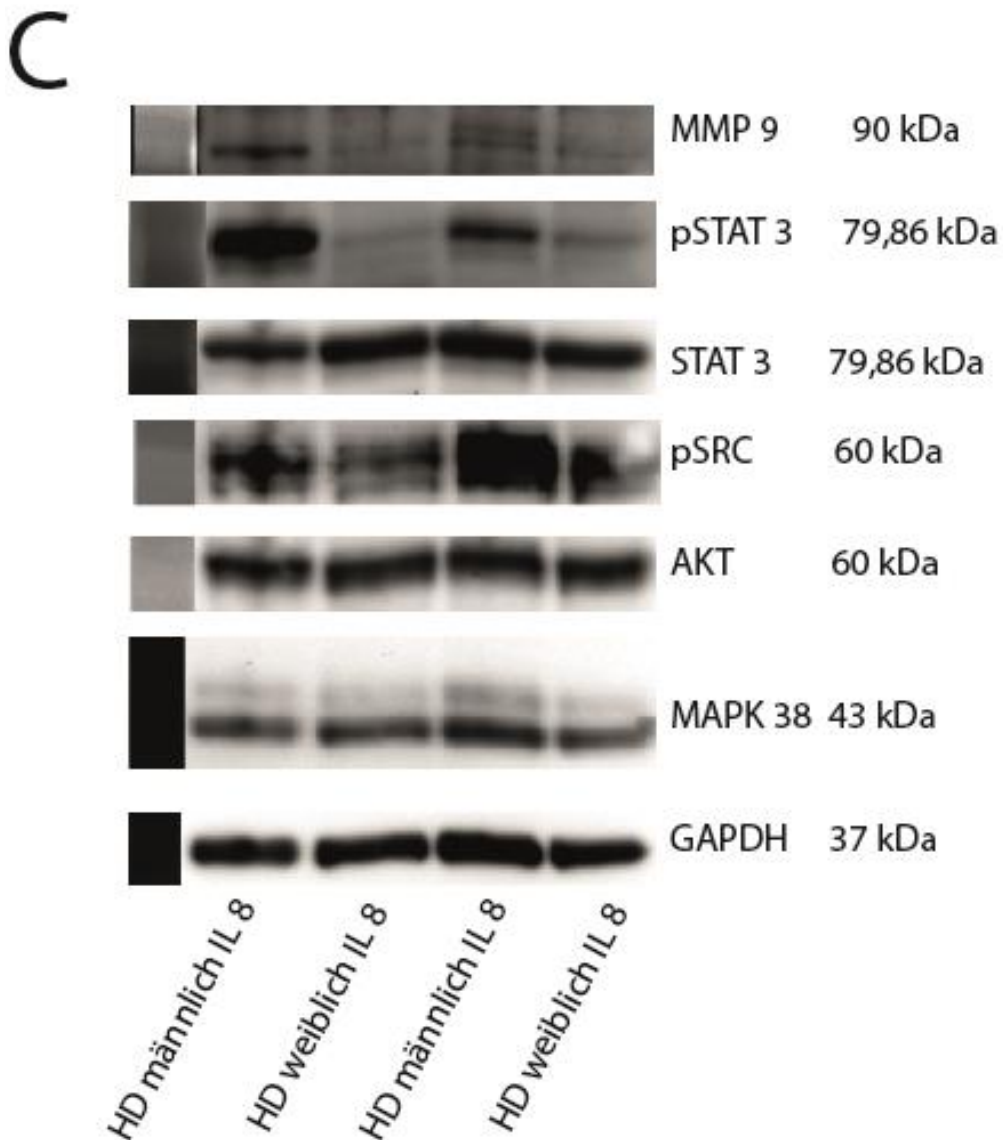


Abb. 14: Geschlechterspezifische Unterschiede nach IL-8 Stimulation in HD-Patienten

A: mRNA in HD-Patienten nach 6h Stimulation (Männer n=7, Frauen n=7): Keine geschlechterabhängigen Unterschiede in der Expression von IL-8, CXCR1/2 und MMPs. Statistischer Vergleich mittels T-Test für unabhängige Stichproben auf der X-Achse männliche und weibliche HD-Patienten in der unstimulierten Negativkontrolle und nach Stimulation mit IL-8 und IL-6, mRNA = $(\text{Zyklusanzahl (RNA)} - \text{Zyklusanzahl (18S)})^2$ normiert auf GAPDH.

B: mRNA in HD-Patienten nach 24h Stimulation (Männer n=5, Frauen n=5): Keine geschlechterabhängigen Unterschiede in der Expression von IL-8, CXCR1/2 und MMPs.

C: Westernblot: nach 20h Stimulationsdauer mit IL-8 [250ng/ml] (jeweils n=2): Im Vergleich zeigt sich eine stärkere Aktivierung des pSTAT3 sowie der pMAPK Kinase Signalwege in männlichen Proben.

4.1.3 Geschlechterspezifisches IL-8 abhängiges inflammatorisches Milieu in HD- Patienten

Im weiteren Verlauf führten wir Experimente mit HD PBMC Pärchen durch, die in Alter und Komorbiditäten gepaart wurden (je 10 weibliche und 10 männliche). Um unsere Hypothese der stärkeren inflammatorischen Reaktion von Männern zu untersuchen stimulierten wir zunächst PBMCs der HD-Patienten mit IL-8 in einer niedrigen und einer hohen Dosierung. Neben einer unstimulierten Negativkontrolle wurden als positive Kontrolle Interleukin 6 sowie LPS und eine Kombination von IL-8 + LPS verwendet.

Aus dem Überstand nach 14h Stimulationsdauer erfolgte die Messung von insgesamt 14 Zytokinen in 2 Multiplexanalysen (siehe Kapitel 3.6). Bestimmt wurden Rantes, Fractalkine, IP-10, Granzyme B, VEGF, MCP-1, IL-8, IL 2, IL 4, IL 17A, TNF α , IL-6, IL 10 und Interferon γ .

Die Monostimulation mit IL-8 ergab keine relevante (gegenüber unstimulierter Kontrolle) Induktion der untersuchten Mediatoren (siehe Abbildung 15). Eine signifikante Erhöhung oder signifikante Unterschiede zwischen Männern und Frauen konnte demnach bei keinem untersuchten Zytokin durch alleinige IL-8 Monostimulation sowohl in niedriger als auch in hoher Konzentration erzielt werden.

Interessanterweise fand sich aber ein signifikanter geschlechterspezifischer Unterschied in der Konzentration an IL-6, der nach Kombistimulation mit IL8 + LPS in Männern signifikant höher war als in Frauen (***) $p= 0,03$). Diese Daten weisen auf einen Kontext spezifischen Geschlechterdimorphismus der Funktion von IL-8, zumindest ex-vivo hin (siehe Abbildung 15).

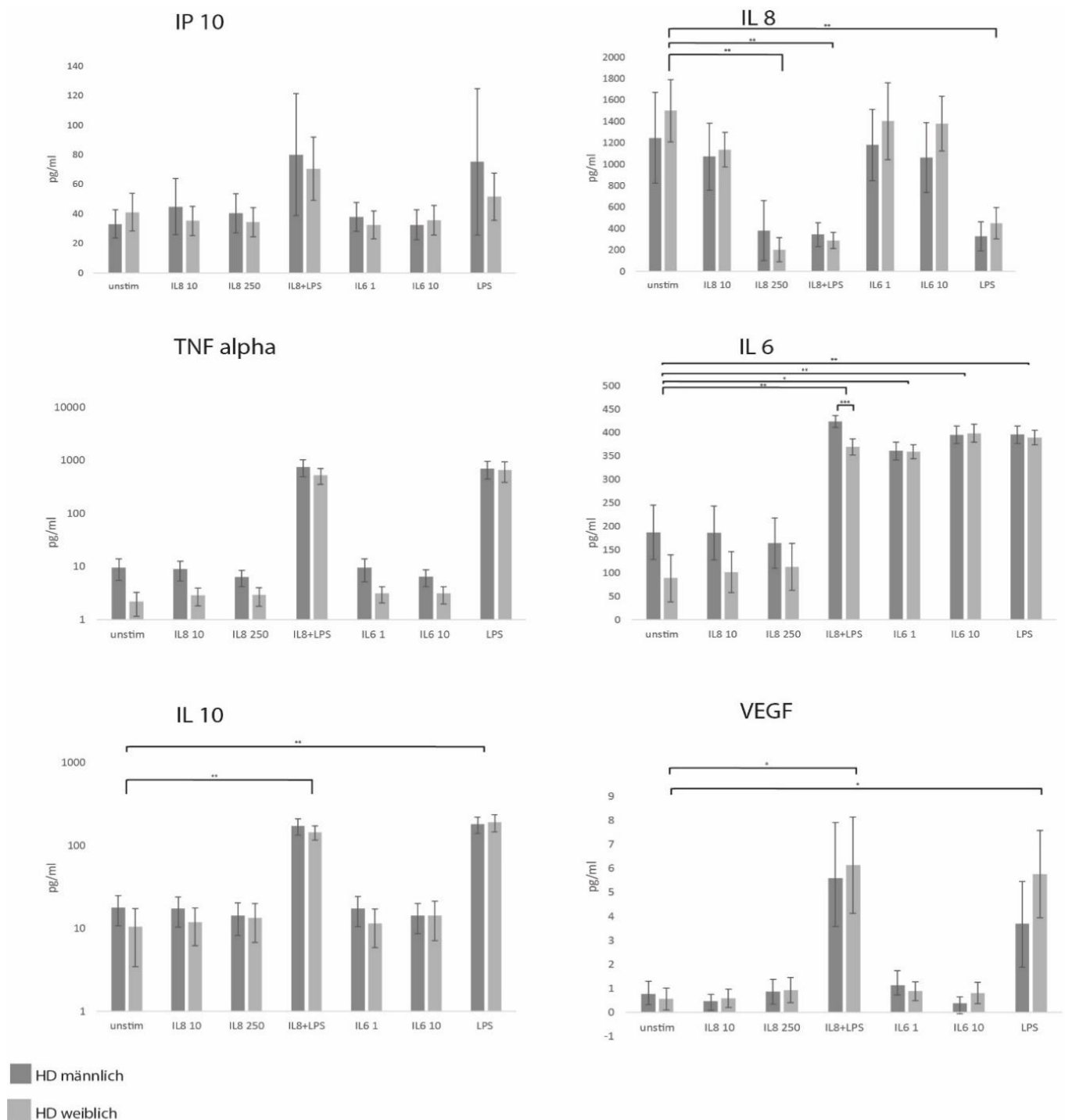


Abb. 15: Zytokinproduktion durch Stimulation mit IL-8 im Vergleich zu IL-6 und LPS in HD-Patienten

Überstände der Zellkultur von HD-Patienten (10 männl. und 10 weibl.) nach Stimulation (14 Stunden) mit IL-8 in [10 ng/ml + 250ng/ml], IL-8 [10ng/ml] +LPS [100ng/ml], IL-6 [1ng/ml + 10ng/ml], LPS [100ng/ml], unstim. = Negativkontrolle.

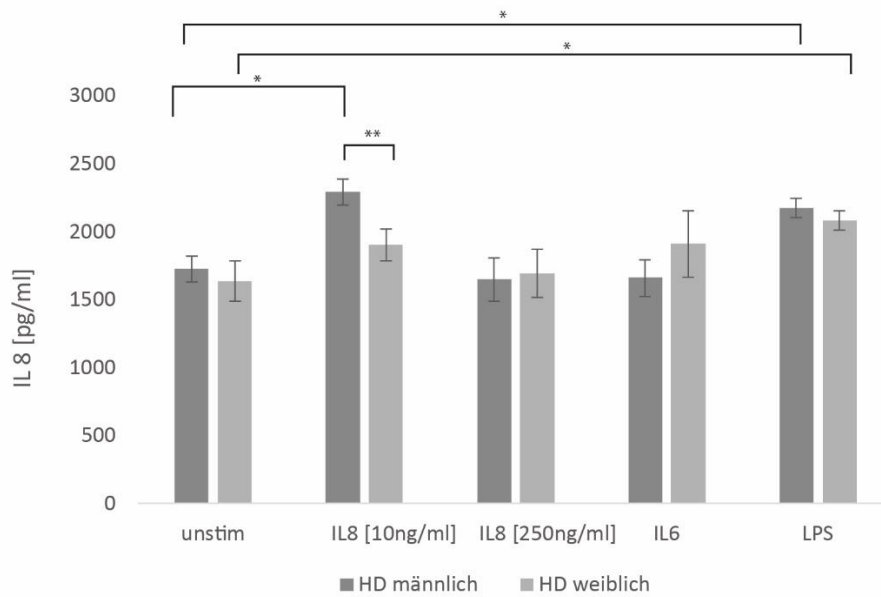
In der Abbildung gezeigt ist die Auswahl an Zytokinen und Chemokinen, die entweder in Männern oder Frauen durch die Stimulation mit [250 ng/ml] IL-8 ein Quotient von (Stimulation/unstimulierte Kontrolle) >1 hatten. Interleukin 8 zeigt eine signifikante Reduktion (** $p < 0,007$) in Frauen durch die

Stimulation. Es zeigt sich eine signifikante Induktion von IL-6 und IL 10 durch LPS Stimulation sowohl allein als auch in Kombination mit IL-8 (** $p < 0,007$, * $p < 0,02$) in beiden Geschlechtern. Außerdem ist ein signifikant höheres IL-6 bei Männern im Vergleich zu den Frauen nach IL8+LPS Kombistimulation mit *** $p = 0,03$ messabr. Der VEGF wird nur in Frauen signifikant stärker nach LPS+IL-8 und LPS Stimulation (* $p < 0,02$) exprimiert. Der statistische Vergleich erfolgte mittels T-Test für unverbundene Stichproben.

In einem unabhängigen Experiment bestimmten wir die IL-8 Konzentration im Überstand der Zellkultur mittels ELISA. Im IL-8 - ELISA zeigt sich eine signifikant höhere IL-8 Konzentration in Männern nach Stimulation mit der niedrigen IL-8 - Konzentration. Dieser Effekt verlor sich in der Stimulation mit hohen IL-8 Konzentrationen. Als Positivkontrolle wurde erneut IL-6 und LPS verwendet. In Bezug auf die Induktion zeigen sich keine stimulations- oder geschlechterspezifischen signifikanten Unterschiede, jedoch zeigten die Männer eine stärkere Induktion nach Stimulation mit [10ng/ml] IL-8, während die Frauen in der hohen IL-8, sowie auch in der IL-6 und LPS Stimulation eine stärkere Induktion von IL-8 gegenüber den Männern hatten (s. Abb. 16 A+B).

Zusammenfassend reagieren HD- Männer auf die Stimulation mit niedriger IL-8 Konzentration mit einer signifikant höheren IL-8 Menge im Überstand der Zellkultur. In den weiteren Stimulationen zeigt sich aber entgegen unserer Erwartung, dass Frauen tendenziell eine stärkere IL-8 Induktion zeigen, welche jedoch zu keiner signifikant höheren IL-8 Konzentration führt.

A



B

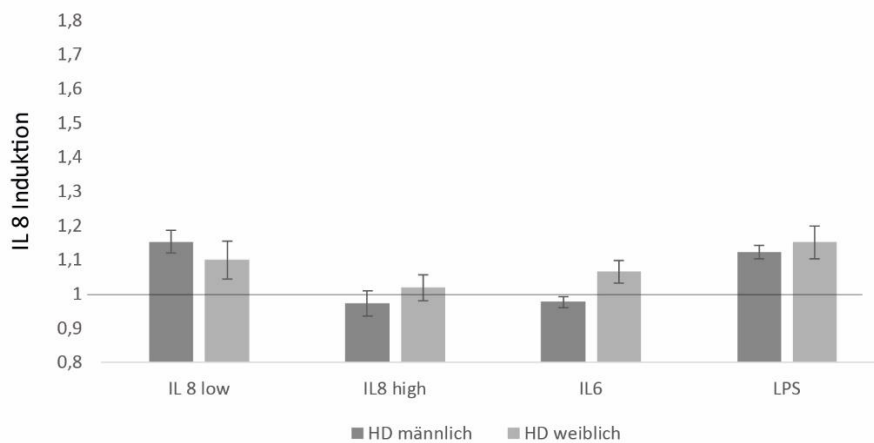


Abb. 16: Geschlechterabhängige IL-8 Expression in HD-Patienten

HD-Patienten (n= 8 männliche HD-Patienten, n= 9 weibliche HD-Patientinnen)

A: IL-8 ELISA: IL-8 in [pg/ml] - nach 8h Stimulationsdauer präsentiert sich ein signifikanter Unterschied in der IL-8 Konzentration der Männer nach IL-8 Stimulation in niedriger Konzentration gegenüber unstimulierter Kontrolle (* $p < 0,003$) sowie gegenüber den Frauen nach IL-8 Stimulation (** $p < 0,001$). Wie nach Ergebnissen des Multiplex Bead Arrays zu erwarten, zeigte sich auch eine signifikante Induktion in beiden Geschlechtern durch LPS Stimulation.

B: IL-8 ELISA: Induktion von IL-8- durch niedrigere IL-8 Konzentration stärker als durch hohe IL-8 Konzentration- hier nur schwache Induktion

4.2 Geschlechterabhängige Mikroinflammation durch IL-8

4.2.1 Junge gesunde Männer zeigen stärkere Mikroinflammation nach IL-8 und HD Plasma Stimulation

Durch die IL-8 Stimulation in HD- Patienten zeigte sich bereits, dass männliche HD PBMCs langfristig eine stärkere intrazelluläre Aktivierung sowie zu signifikant höheren IL-8 Konzentrationen als die der HD-Frauen führen. Tsirpanlis, Bagos et al. (2004) zeigte in einer longitudinalen Studie, dass bei HD- Patienten eine persistierende periodisch schwankende Mikroinflammation im Blut im Sinne eines erhöhten hsCRP vorliegt, welches wiederum zur Einteilung der Patienten in eine Hochrisiko-Gruppe für kardiovaskulärer Events führt. Im Folgenden liegt unser Augenmerk daher nicht auf der mittelbaren Stimulation der PBMCs, sondern auf das die PBMCs umgebende inflammatorische Milieu.

Um hier potenziell geschlechterspezifische Unterschiede im mikroinflammatorischen Milieu nachzuweisen, erfolgte die Isolation und Untersuchung junger gesunder PBMCs auf deren Reaktivität auf HD-Plasma und Überstände der IL-8 Stimulation. Repräsentativ für das inflammatorische Milieu erfolgte der Proteinnachweis von MMP-9 aus den jeweiligen Überstand der Zellkultur. Hier zeigt sich eindrücklich die stärkste MMP-9 Expression nach der männlichen Plasmastimulation und der Stimulation mit einer Mischung (1:1) von männlichen und weiblichen HD Plasma (siehe Abbildung 17A). In Abbildung 17B sind repräsentativ je zwei junge gesunde Frauen und Männer gezeigt, die mit ihren eigenen Überständen aus der IL-8 [250ng/ml] Stimulation inkubiert wurden. Die Frauen zeigen stärkere Banden bei Inkubation mit männlichen Überständen. In der ersten männlichen Probe (Bande 3 und 4) zeigt sich eine stärkere Bande bei Inkubation mit dem weiblichen Überstand, während die Zweite (Bande 7 und 8) tendenziell passend zu den Frauen eine stärkere Bande bei Inkubation mit dem männlichen Überstand zeigt.

Zusammenfassend zeigt sich in der Stimulation mit Überständen der IL-8 Stimulation bei den männlichen PBMCs eine stärkere Zellaktivierung im Westernblot.

In der Zusammenschau sprechen die Ergebnisse für eine stärkere IL-8 abhängige inflammatorische Reaktivität in Männern gegenüber Frauen in der jungen gesunden Kontrolle.

Darüber hinaus konnten wir ebenso eine stärkere Induktion der MMP Expression nach Stimulation mit männlichen HD Plasma in der jungen gesunden Kontrolle zeigen.

Dies bestärkt weiterhin unsere Hypothese der stärkeren Inflammation und IL-8 Wirkung in männlichen HD-Patienten, repräsentativ dargestellt anhand der MMP-9 Expression.

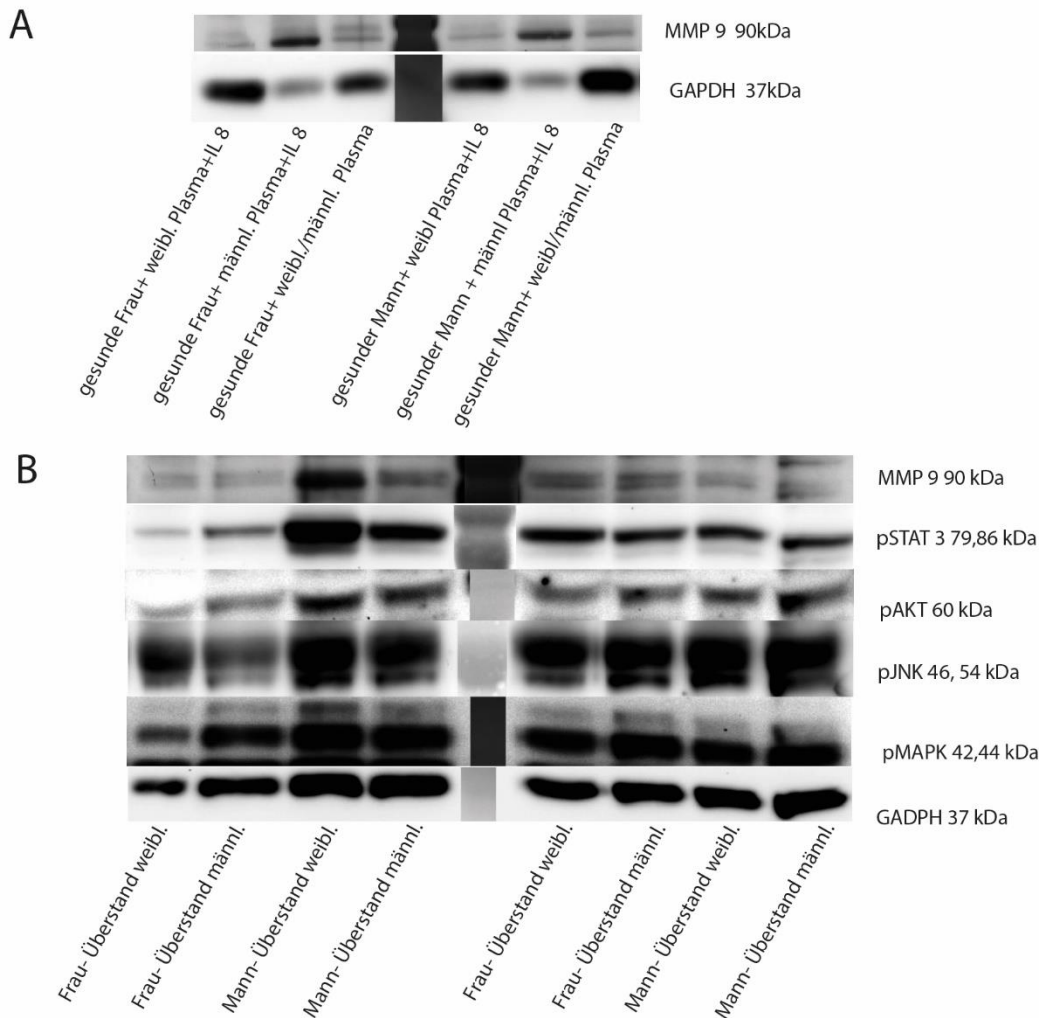


Abb. 17: Zellaktivierung junger gesunder Kontrollgruppe durch HD Plasma und Überstände der Zellkulturstimulation

A: PBMCs junger gesunder Probanden (je eine männliche und eine weibliche Probe) wurden mit HD Plasma in 1:10 Verdünnung über Nacht inkubiert und anschließend mit IL-8 [100ng/ml] für 15 Minuten stimuliert. Die Ladungskontrolle mit GAPDH ist bei erhöhter Viskosität der Proben nur ungleichmäßig. Banden der Stimulationen mit männlichem HD Plasma zeigen deutliches MMP9, bei Proben in Plasmagemisch von Männern und Frauen ohne zusätzliches IL-8 ist die Bande nur schwach ausgeprägt, wie auch bei den mit weiblichem Plasma und IL-8 stimulierten Zellen.

B: PBMCs junger gesunder Probanden (n=2 je Geschlecht) wurden mit dem Überstand aus der IL-8 [250ng/ml] Stimulation inkubiert. Es wurden beide Geschlechter sowohl mit ihren eigenen als auch mit dem Überstand des anderen Geschlechts inkubiert. Es zeigen sich stärkere Banden der Proben, die mit männlichen Überständen stimuliert wurden. Bande Nr.3 auch mit starker Aktivierung durch weiblichen Überstand. pMAPK, pAKT, pSTAT und MMP9 sind in männlichen Überständen stärker exprimiert.

4.2.2 Signifikant stärkere MMP-9 und MMP-2 Konzentration nach IL-8 Stimulation in männlichen HD- Patienten

Die bereits erhobenen Ergebnisse zeigen, dass sowohl IL-8 allein als auch das inflammatorische Milieu im Plasma von männlichen Dialysepatienten zu einer stärkeren Aktivierung der PBMCs einer gesunden Vergleichsgruppe führt. Weiterführend stellte sich uns die Frage, ob diese Beobachtung ebenfalls im Dialysekollektiv reproduzierbar ist, und ob diese verstärkte Zellaktivierung auch durch eine stärkere Induktion von Matrixmetalloproteinasen in Erscheinung tritt. Interleukin 8 ermöglicht die Diapedese der Immunzellen unter anderem durch die Induktion von Matrixmetalloproteinasen, welche in ihrer Funktion als Kollagenasen zu einer Auflockerung der extrazellulären Matrix führen. Im Allgemeinen liegen die MMPs in niedrigen Konzentrationen vor und unterliegen einer strengen Regulation (Parks, Wilson et al. 2004). Neben Interleukin 8 spielen auch Wachstumsfaktoren und weitere Zytokine in der Induktion und Regulation der MMPs und deren Beitrag in inflammatorischen Prozessen eine Rolle (Chakraborti, Mandal et al. 2003, Ala-aho und Kahari 2005).

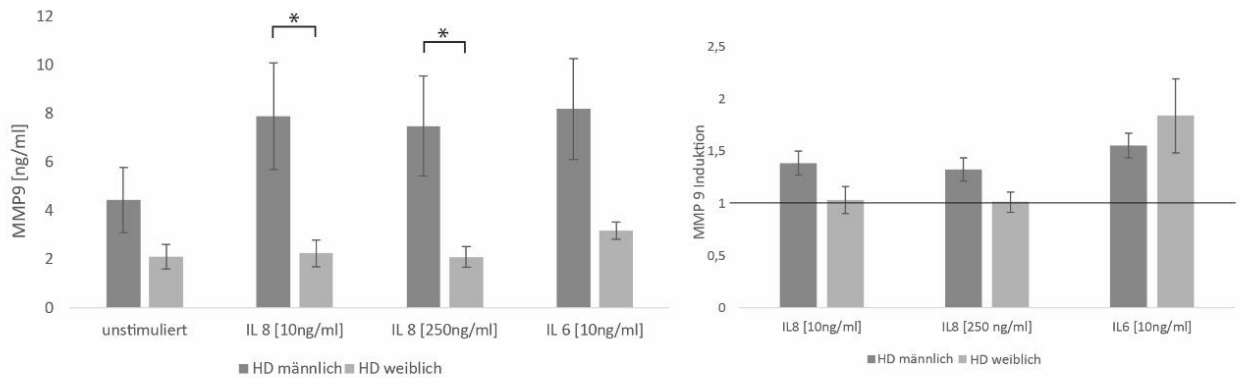
Für den Zusammenhang von MMPs und IL-8 sind vor allem die Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) interessant, da die Induktion von MMP-9, eine der bekanntesten Wirkungen von IL-8 ist (Aihua Li 2003, Mortier, Van Damme et al. 2008). Da MMP-9 auch als prädiktiver Marker, welcher mit einem schlechteren Outcome in unterschiedlichsten Erkrankungen assoziiert ist, gilt (Malemud 2006), lag auf MMP-9 in der Untersuchung geschlechterspezifischer Unterschiede ein besonderes Augenmerk. Zum Nachweis einer stärkeren MMP Expression in männlichen HD-Patienten untersuchten wir die Überstände der Zellkultur nach unterschiedlichen Stimulationszeiträumen.

Im kurzen Stimulationszeitraum von 8h zeigt sich, dass IL-8 sowohl in hoher als auch niedriger Konzentration zu einem deutlichen Anstieg der MMP-9 Konzentration in den Überständen führt. Signifikant zeigte sich dieser Anstieg nur in den männlichen Proben nach hochkonzentrierter IL-8 Stimulation sowie nach IL-6 Stimulation. Insgesamt zeigten die Frauen im kurzen Stimulationszeitraum höhere MMP-9 Konzentrationen als die Männer jedoch ohne Signifikanz (Daten nicht gezeigt).

Betrachtet man die Ergebnisse aus dem längeren Stimulationszeitraum, zeigt sich, dass Männer höhere MMP-9 Konzentrationen aufweisen. Sowohl in der niedrigen als

auch in der hohen IL-8 Stimulation präsentieren die Männer signifikant höhere MMP-9 Konzentrationen. Auch in der Darstellung der Induktion lässt sich beobachten, dass IL-8 in Frauen kaum zu einer vermehrten MMP-9 Expression führt, während bei den Männern weiterhin eine signifikant stärkere Induktion von MMP-9 vorliegt (siehe Abbildung 18A). Aufgrund dieser Beobachtung untersuchten wir MMP-2 nur nach dem langen Stimulationszeitraum. In der IL-8 [10ng/ml] Stimulation zeigt sich eine signifikant höhere MMP-2 Konzentration in den Männern gegenüber den Frauen. Auch durch die IL-6 Stimulation zeigt sich bei den Männern sowohl eine deutlichere Induktion als auch höhere Konzentration von MMP-2, jedoch ohne signifikanten Unterschied zu den Frauen. Alles in allem war die Induktion von MMP-2 durch IL-8 Stimulation nur schwach ausgeprägt (siehe Abbildung 18B).

A



B

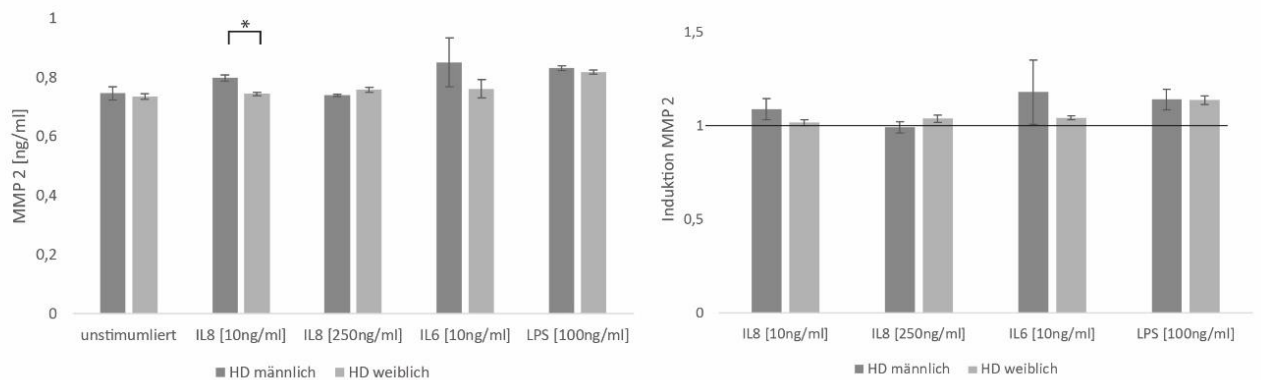


Abb. 18: MMP-9 und MMP-2 in Überständen von HD- PBMCs über langen Stimulationszeitraum(20-36h)

X-Achse: Stimulation mit IL 8, IL 6 und LPS in jeweiliger Konzentration, Y-Achse: Konzentration (ng/ml) und relative Induktion durch Stimulation im Vergleich zur Negativkontrolle (Stimulation/Unstimuliert)

A: MMP 9 ELISA (n=14 Männer, n= 8 Frauen) signifikant höhere Konzentrationen des MMP-9 in Männern, in Bezug zur MMP-9 Induktion ist diese über die Stimulationsdauer nachlassend. (T-Test für unabhängige Stichproben * p=0,04)

B: MMP-2 ELISA (n=2 Männer, n=8 Frauen) Frauen weisen nach IL-8 [10ng/ml] Stimulation signifikant niedrigere MMP-2 Mengen auf (T-Test für unabhängige Stichproben Signifikanzniveau *p=0,03)

Bezüglich weiterer MMPs untersuchten wir exemplarisch MMP-8 sowie MMP-1 aus der Gruppe der Kollagenasen. Interleukin 8 führt in unserem ELISA (siehe Abbildung 19 A) zu keiner verstärkten Expression von MMP-8 in Männern, Frauen zeigen nur eine gering verstärkte Expression von MMP-8 durch IL-8 Stimulation.

Im MMP-1 ELISA zeigt sich, dass wie in der Literatur beschrieben (Samnegard, Hulthe et al. 2009) Frauen ein niedrigeres MMP-1 als Männer in der Negativ-Kontrolle haben. Ein signifikanter Anstieg des MMP-1 in Frauen konnte durch LPS Stimulation erreicht werden. Auch die Induktion von MMP-1 zeigt sich nach Interleukin 8 Stimulation in hoher Konzentration in Frauen signifikant stärker als in Männern (siehe Abbildung 20 B). Diese Beobachtung ist analog zum Dialysekollektiv auch in der gesunden Kontrollgruppe der Frauen nach IL-8 Stimulation mit 250 ng/ml (Daten nicht gezeigt).

In Zusammenschau der ELISAs konnten wir, der Literatur entsprechend zeigen, dass Interleukin 8 Stimulation ein Reiz zur MMP Sekretion ist. Eine signifikant höhere Konzentration konnten wir für MMP-9 im Überstand der Zellkultur männlicher Dialysepatienten sowohl nach kurzer (5h, Daten nicht gezeigt) als auch nach langer Stimulationsdauer (siehe Abbildung 18 A) mit IL-8 zeigen. Auch in Bezug auf MMP-2 kann eine signifikant höhere MMP-2 Konzentration in Männern nach IL-8 [10ng/ml] Stimulation beobachtet werden (siehe Abbildung 18 B).

Diese Ergebnisse sprechen insoweit für unsere Hypothese der stärkeren Immunaktivierung nach IL-8 Stimulation in Bezug auf die MMP-9 Induktion und Produktion. Wie zu erwarten konnten wir in der MMP-8 Menge keinen signifikanten Unterschied durch Interleukin 8 Stimulation nachweisen. In Bezug auf MMP-1 zeigt sich in unserer Stichprobe eine signifikant höhere Induktion von MMP-1 durch Interleukin 8 Stimulation bei den Frauen.

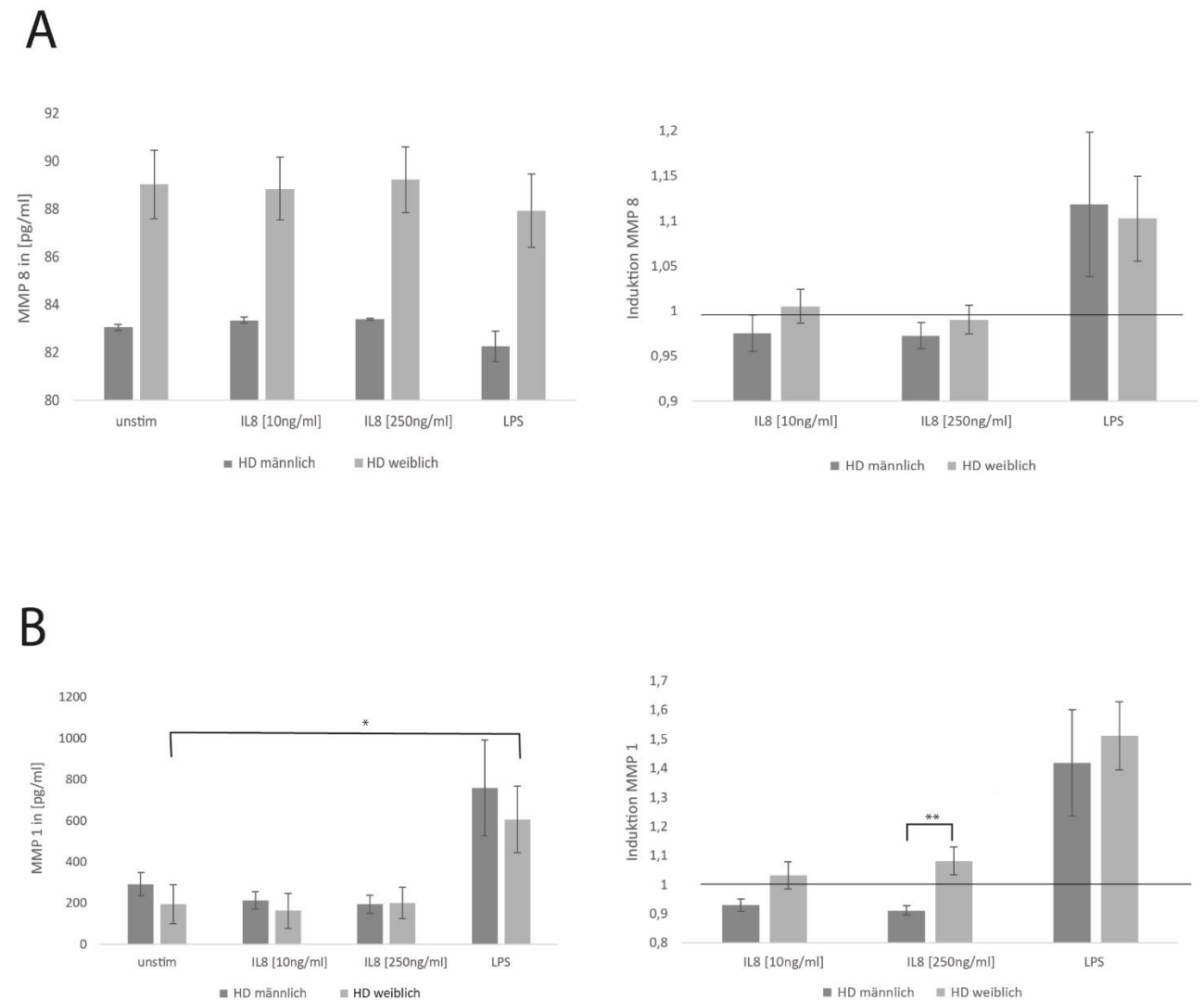


Abb. 19: MMP8 und MMP-1 nach Interleukin 8 und LPS Stimulation im Überstand der Zellkultur (HD-PBMCs)

X-Achse HD-Patienten aufgetrennt nach männlich und weiblich und Stimulanz mit Konzentration, Y-Achse links absolute Konzentration gemessen im ELISA in [pg/ml], rechts relative Induktion durch Stimulation im Verhältnis zur unstimulierten Probe (Stimuliert/Unstimuliert)

A: MMP-8 ELISA (n=2 Männer, n=7 Frauen) MMP-8 absolut in pg/ml, sowie Induktion von MMP-8 durch Stimulation: keine signifikanten Unterschiede zwischen Männern und Frauen, keine Induktion von MMP-8 durch IL-8 Stimulation

B: MMP-1 ELISA (n=7 Männer, n=9 Frauen) MMP-1 absolut in pg/ml, signifikante MMP-1 Steigerung in Frauen durch LPS Stimulation mit $*p=0,038$ (T-Test für unabhängige Stichproben), sowie Induktion von MMP-1, Männer zeigen durch IL-8 Stimulation keine Induktion, Frauen signifikant höhere Induktion von MMP-1 durch IL-8 Stimulation [250ng/ml] $** p=0,013$ (T-Test für unabhängige Stichproben)

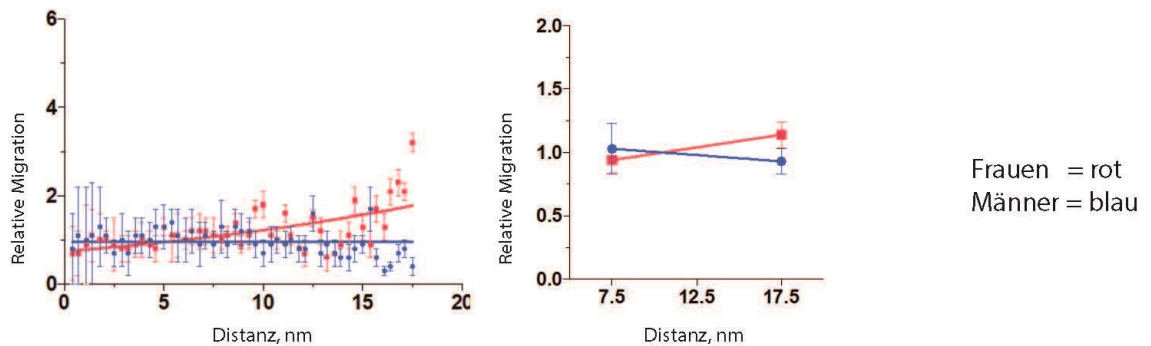
4.3 Signifikant stärkere Migration durch männliches IL-8-induziertes mikrophilammatorisches Milieu

4.3.1 Kein signifikanter Migrationsreiz durch IL-8 Isoformen

Die erstmalig beschriebene Wirkung von Interleukin 8 ist die Migration von vor allem neutrophilen Granulozyten ins periphere Gewebe. Neben den neutrophilen Granulozyten übt IL-8 auch auf andere Zelltypen, wie zum Beispiel T-Zellen, einen Migrationsreiz aus (Larsen, Anderson et al. 1989). Um eine differentielle Wirkung auf die Migration nachzuweisen, nutzten wir zunächst eine unidirektionale Migrationskammer. In diesem Experimentaufbau konnte neben einer Negativkontrolle mit reinem Zellkulturmedium, ein Migrationsreiz mit Interleukin 8 gesetzt werden. Die Auszählung der Zellen erfolgte nach 6 Stunden. Zur Darstellung der Auswertung der Migrationsbewegung wurde ein Quotient aus Negativ-Kontrolle und der mit IL-8 Stimulierten Zellzahl gebildet (siehe Abbildung 21).

In diesem Experimentaufbau konnten wir durch IL-8 in seiner Isoform keinen signifikanten Migrationsreiz setzen. Es zeigten sich keine geschlechter- oder stimulationsspezifischen Unterschiede in der Migration der HD PBMCs.

A unidirektionale Migration [10ng/ml] IL8



B unidirektionale Migration [100ng] IL8

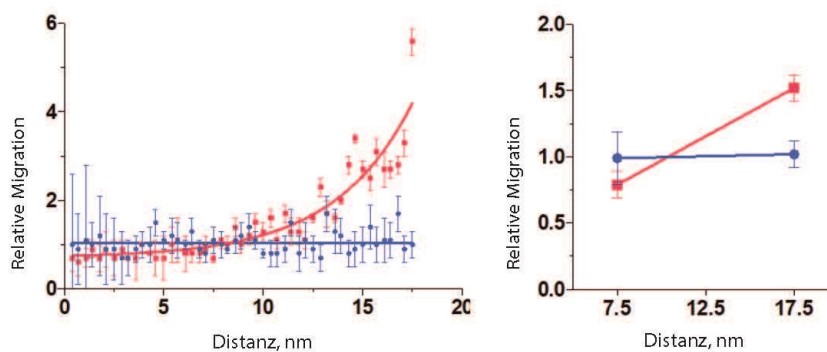


Abb. 20: Unidirektionale Migration der PBMCs von HD-Patienten (n= jeweils 6)

Migrationsreiz mit [10ng/ml] und [100ng/ml] IL-8, die Zahl der migrierten Zellen wurde im Verhältnis zur Zellbewegung der unstimulierten negativ Kontrolle aufgetragen. X-Achse: zurückgelegte Migrationsdistanz in Migrationskammer (nm), Y-Achse: relative Migration der Zellen mit Stimulationsreiz (IL-8) gegenüber Negativkontrolle (Zellkulturmedium)

A: unidirektionale Migration bei [10ng/ml] IL-8 – sowohl in Männern und Frauen keine signifikante Migrationsbewegung zu IL-8 Stimulus

B: unidirektionale Migration [100ng/ml] IL-8 – Männer erneut ohne nachweisbare Migration, Frauen hier mit stärkerer Migration, jedoch keine Signifikanz gegenüber der Negativ-Kontrolle oder zwischen Geschlechtern

4.3.2 Signifikante Migration in Richtung des männlichen mikroinflammatorischen Milieus

Die Ergebnisse führten uns zu dem Schluss, dass das rekombinante Interleukin 8 allein keine unterschiedliche geschlechterabhängige Reaktion bezüglich der Migration hervorruft.

Daher untersuchten wir im Folgeexperiment die chemotaktische Wirkung von männlichen und weiblichen Überständen der Zellkultur nach 24-stündiger IL-8 Stimulation. Die Überstände wurden mittels einem 30kDa cut off Filter in einer oberen und eine untere Fraktion getrennt (siehe Kapitel 3.9). Als Migrationsreiz wurde erneut IL-8 für insgesamt 1h in der oberen Fraktion inkubiert. Um gezielt mögliche enzymatische Mechanismen, welche zu einem höheren inflammatorischen Potential im Überstand führen, indirekt nachzuweisen erfolgten Negativkontrollen mit Zellkulturmedium und durch den Zusatz eines Proteaseinhibitors. Als Migrationszellen fungieren frisch isolierte PBMCs eines jungen gesunden Mannes. Die Migrationskammern wurden nach 6h, 12h und 24h unter dem Mikroskop fotografiert und die Zahl der Zellen ausgezählt (siehe Methoden: Abbildung 12). Zur Darstellung der Auswertung wurden die Zellen auf Seiten des männlichen Überstandes durch die auf Seite des weiblichen Überstandes geteilt. In Zusammenschau der Ergebnisse nach 6h lässt sich eine signifikant stärkere Migration in Richtung der männlichen Überstände mit IL-8 Stimulation gegenüber der Negativkontrolle zeigen. Ebenfalls signifikant zeigt sich der Unterschied zwischen der IL-8 stimulierten oberen Fraktion und jener, die mit einem Proteaseinhibitor versetzt wurde. Auch nach 12h Stunden bestätigte sich die Beobachtung erneut. Hier zeigte sich ebenfalls eine signifikant stärkere Migration in Richtung der männlichen oberen Fraktion mit IL-8 gegenüber der Negativkontrolle und jener mit Proteaseinhibitor. Nach 24h zeigte sich das gleiche Ergebnis, jedoch schwächt sich die Signifikanz zunehmend ab.

Nachdem sich in der unidirektionalen Migration unsere Hypothese mit einer stärkeren Migration der männlichen PBMCs auf den IL-8 Stimulus nicht zeigte, sondern sogar entgegengesetzt ausfiel, konnten wir mit dem bidirektionalen Experimentaufbau eindrucklich die stärkere chemotaktische Potenz in der oberen Fraktion des männlichen Überstandes zeigen

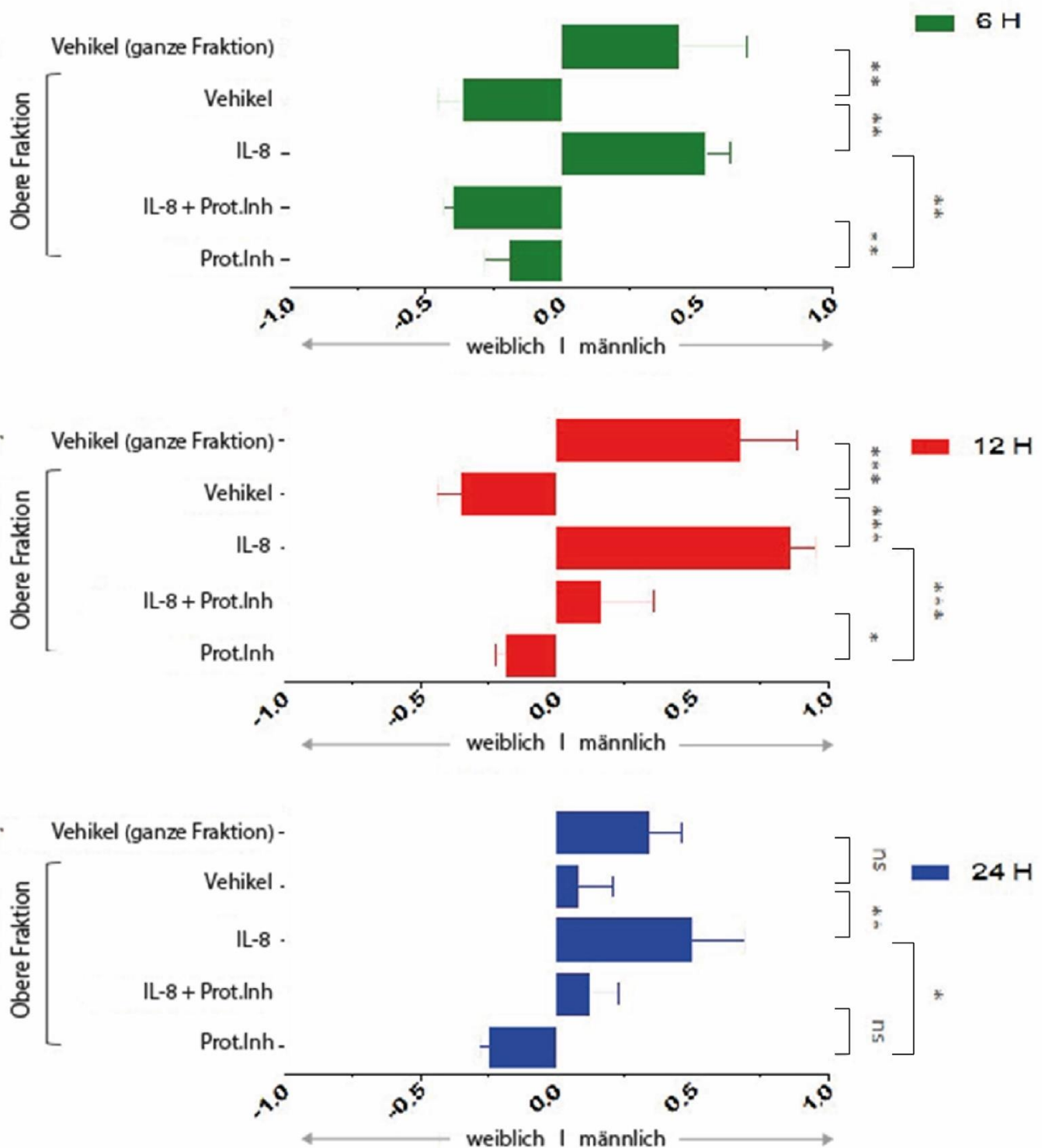


Abb. 21: Bidirektionale Migration der PBMCs eines jungen gesunden Mannes in Richtung des inflammatorischen HD-Milieus nach IL-8 Stimulation. (jeweils n=6 HD männlich und weiblich Überstände)

Der Migrationsreiz wurde mit dem Überstand aus der Zellkultur von einem männlichen und einer weiblichen HD-Patientin nach IL-8 Stimulation gesetzt (s. Kapitel 3.9, Abbildung 12). Dieser wurde durch Filtration nach Molekülen > 30kDa aufgetrennt (obere Fraktion). Zum Nachweis einer enzymvermittelten Reaktion wurde in einer Probe ein Proteaseinhibitor+IL8 und einmal nur ein

Proteaseinhibitor zugesetzt. Dargestellt ist die relative Bewegung der Zellen auf die Seite des jeweils männlichen beziehungsweise des weiblichen Überstandes, indem die Anzahl der Zellen im männlichen Überstand durch die Anzahl im weiblichen Überstand geteilt wurde. Im Zeitverlauf von 6-24h zeigt sich eine signifikante Migration der Zellen auf IL-8 Stimulation der oberen Fraktion in die männliche Seite (Berechnung des Signifikanzniveaus per T-Test $**p < 0,001$, $*** p < 0,0001$). Durch Zusatz des Proteaseinhibitor zeigt sich ebenfalls eine signifikant geringere Migration in Richtung des männlichen Überstandes.

4.4 Erhöhte IL-8 Potenz in Männern durch verstärkte IL-8 Spaltung

4.4.1 Etablierung Interleukin 8 Spaltungs-Westernblot

Die Ergebnisse aus dem bidirektionalen Migrationsexperiment sprechen dafür, dass die männlichen Zellen auf den Stimulationsreiz durch Interleukin 8 ein verstärkt inflammatorisches Milieu bilden, welches einen stärkeren chemotaktischen Reiz gegenüber den weiblichen Überständen darstellt.

Wie bereits erwähnt entfaltet IL-8 in seiner 72 AA Isoform eine vielfach stärkere Potenz als in der 77 AA Isoform (Nourshargh, Perkins et al. 1992, Mortier, Van Damme et al. 2008). Da die MMPs in unseren Untersuchungen nach kurzer Stimulation mit IL-8 nicht signifikant stärker in Männern exprimiert wurden, mussten weitere Mechanismen in Frage kommen, die geschlechterabhängig zu einer vermehrten Spaltung von 77 in 72 AA Interleukin 8 führen. Da dafür eine schiere Menge an Proteasen in Frage gekommen wäre (Padrines, Wolf et al. 1994), entschlossen wir uns die Spaltung von 77 in 72 AA IL-8 indirekt im Westernblot nachzuweisen.

Zur Etablierung des gezielten Nachweises von 77 und 72 AA IL-8 begannen wir zunächst mit zwei verschiedenen rekombinanten Interleukin 8 Isoformen. Die eine enthielt sowohl die 77 als auch die 72 AA Isoform während das andere rekombinante IL-8 nur die 72 AA Isoform enthielt. Zum Nachweis der einzelnen Isoformen nutzen wir zwei Antikörper gegen Interleukin 8- ein polyklonalen, welcher beide Isoformen nachweist und einen monoklonalen Antikörper spezifisch gegen das 77AA IL-8 (siehe Tabelle 7). In den Probeexperimenten zeigte sich eine gute Nachweisbarkeit durch den polyklonalen Antikörper in einer Menge von 10ng des 72 + 77 AA IL-8, und des 72 AA IL-8 ab eine Menge von 6 ng. Wie zu erwarten war kein Nachweis des 72 AA IL-8 in allen getesteten Konzentrationen mit dem Monoklonalen 77 AA IL-8 möglich (siehe Abbildung 23A)

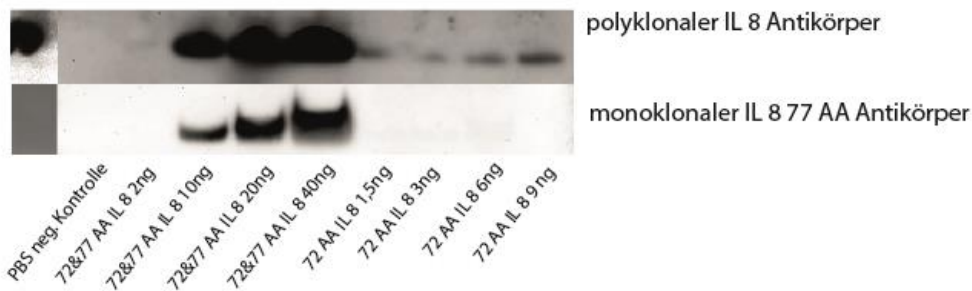
4.4.2 Geschlechterabhängige Spaltung von Interleukin 8 in HD-Patienten nach Stimulation

Da wir für die Spaltung vor allem Enzyme, die in ihrer Molekulargröße über dem Interleukin 8 liegen in Betracht zogen, und eine Kontaminierung der Überstände mit IL-8 aus der vorherigen Stimulation bestmöglich minimieren wollten, wurde der Überstand der Zellkultur erneut in eine obere Fraktion mit Proteinen >30kDa getrennt.

Die obere Fraktion wurde nun mit rekombinantem IL-8 (72,77AA) beimpft. Im ersten Versuchsaufbau mit je einem HD-Pärchen zeigte sich, dass die Menge an 77 AA IL-8, die durch den monoklonalen IL-8 Antikörper nachgewiesen wird, über die Dauer von 3 Stunden im Vergleich zum Gesamt-IL-8, an welches der polyklonale IL-8 Antikörper bindet, verstärkt abgebaut wird.

Zusammenfassend konnten wir somit zeigen, dass in unseren zwei Probenpärchen die obere Fraktion der Überstände des männlichen Patienten das Interleukin 8 über die Zeit von 3 Stunden im Vergleich zu den Frauen stärker spaltet.

A Etablierung IL 8 Spaltung Westernblot mit poly- und monoklonalem IL 8 Antikörper



B

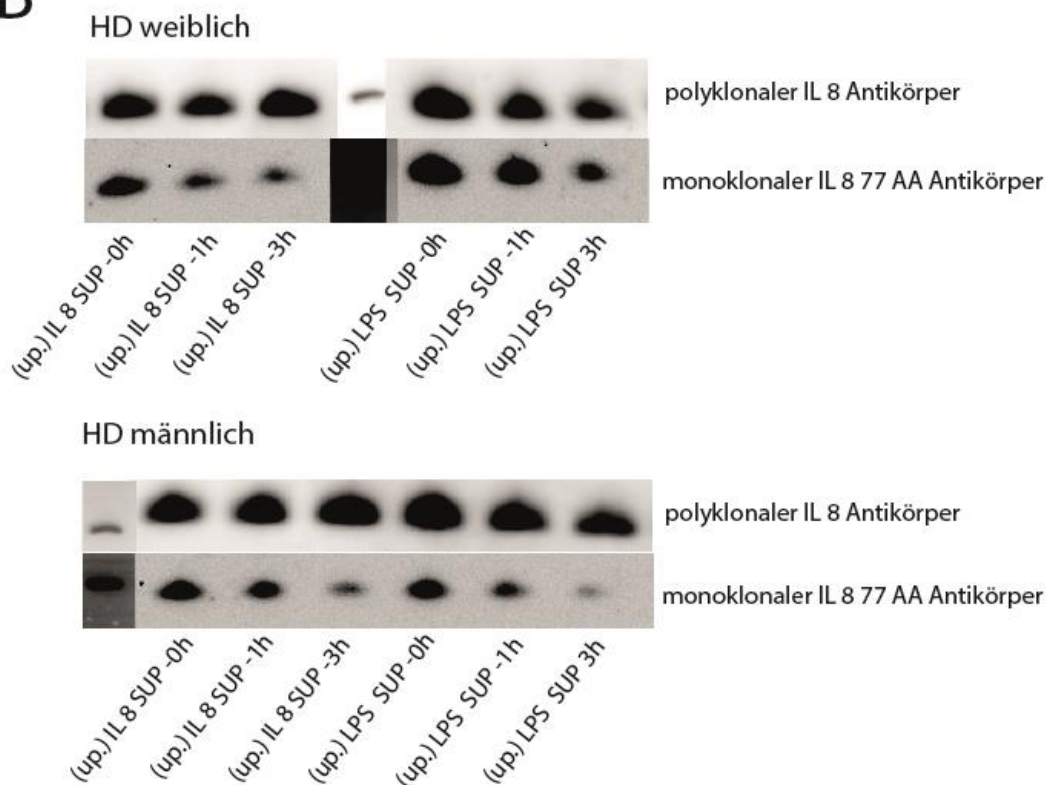


Abb. 22: Geschlechterabhängige IL-8 Spaltung in HD-Patienten

A: Etablierung des Nachweises der unterschiedlichen IL-8 Isoformen durch spezifische Antikörper-Abgrenzung von reinem 77 AA IL-8 und polyklonalem 72 und 77 AA IL-8. Gute Detektion von 72&77 AA IL-8 mit beiden AK ab 10ng, spezifischer Nachweis von 72 AA IL-8 nur durch polyklonalen AK möglich

B: IL-8 Spaltungswesternblot: es wurde die obere Fraktion des Überstandes (= (up.) SUP) aus der IL-8 Stimulation oder der LPS Stimulation in der Zellkultur erneut mit IL-8 versetzt und für 0, 1 und 3 Stunden inkubiert. Im zeitlichen Verlauf zeigt sich in der männlichen Probe ein deutlich geringerer Nachweis von IL-8 77 AA gegenüber den Frauen bei relativ weniger reduzierter Gesamt-IL-8 Menge (polyklonaler AK) (exemplarisch für ein HD-Pärchen n männlich=1, n weiblich=1)

4.5 Klinische Konsequenz? - Interleukin 8 in HD-Patienten korreliert mit Überleben

4.5.1 ISAR Kohorte zeigt signifikant höhere Mortalität bei erhöhtem IL-8 in Männern

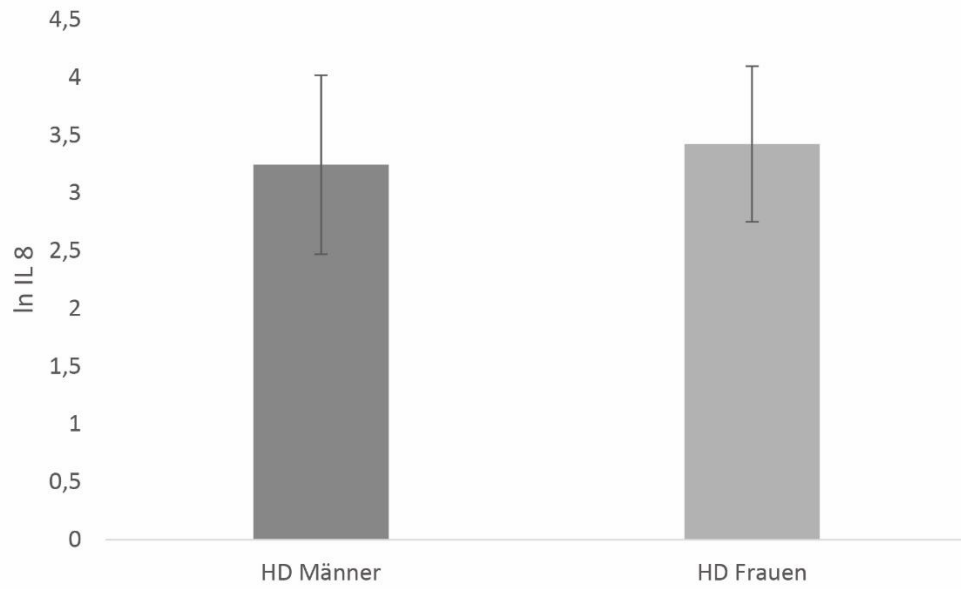
In Zusammenschau der bisherigen erhobenen Daten, stellte sich die Frage, ob Interleukin 8 auch klinisch eine relevante geschlechterspezifische Auswirkung bezüglich der Mortalität in Dialysepatienten hat.

Um diese Frage zu beantworten, bestimmten wir in der ISAR Kohorte, einer Datenbank von Dialysepatienten, welche über circa 4 Jahre nachverfolgt wurde, die Serumkonzentration von IL-8. In der statistischen Analyse der durchschnittlichen IL-8 Werte im Blut der HD-Patienten zeigte sich, dass in der IL-8 Menge an sich kein signifikanter Unterschied zwischen Männern und Frauen festzustellen war (siehe Abbildung 23 A).

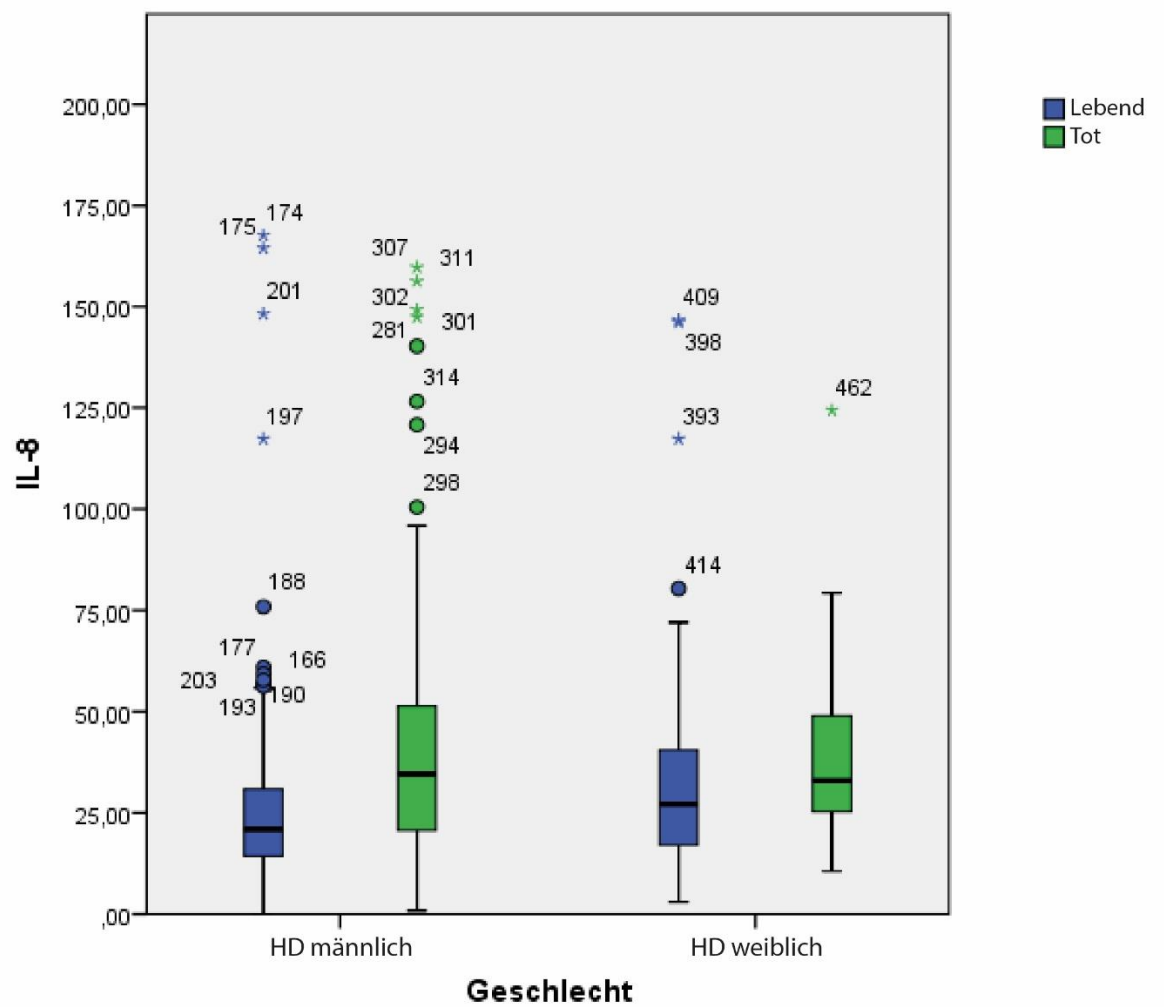
Betrachtet man die Gesamtmortalität in Bezug auf den medianen Interleukin 8 Wert wird deutlich, dass die toten Männer einen erhöhten medianen IL-8 Wert aufweisen. Frauen zeigen unabhängig ob lebend oder tot eine stabile mediane IL-8 Menge. In den Kaplan Meier Graphen nach Tercilen getrennt nach männlichem und weiblichem Geschlecht erkennt man eine Korrelation von IL-8 mit Gesamtmortalität selektiv für das männliche Patientengut. Gleichzeitig verlaufen die Überlebenskurven der Frauen unabhängig von der gemessenen IL-8 Menge.

Die Daten der Isarkohorte zeigen, dass Interleukin 8 in Dialysepatienten in Bezug auf den klinischen Alltag insoweit relevant ist, als dass erhöhte Interleukin 8 Werte in Männern mit einer erhöhten Mortalität korrelieren, während die Mortalität von Frauen nicht mit erhöhten IL-8 Werten zusammenhängt. Limitierend muss erwähnt werden, dass die Anzahl der verfügbaren Frauen deutlich geringer war als die der Männer.

A

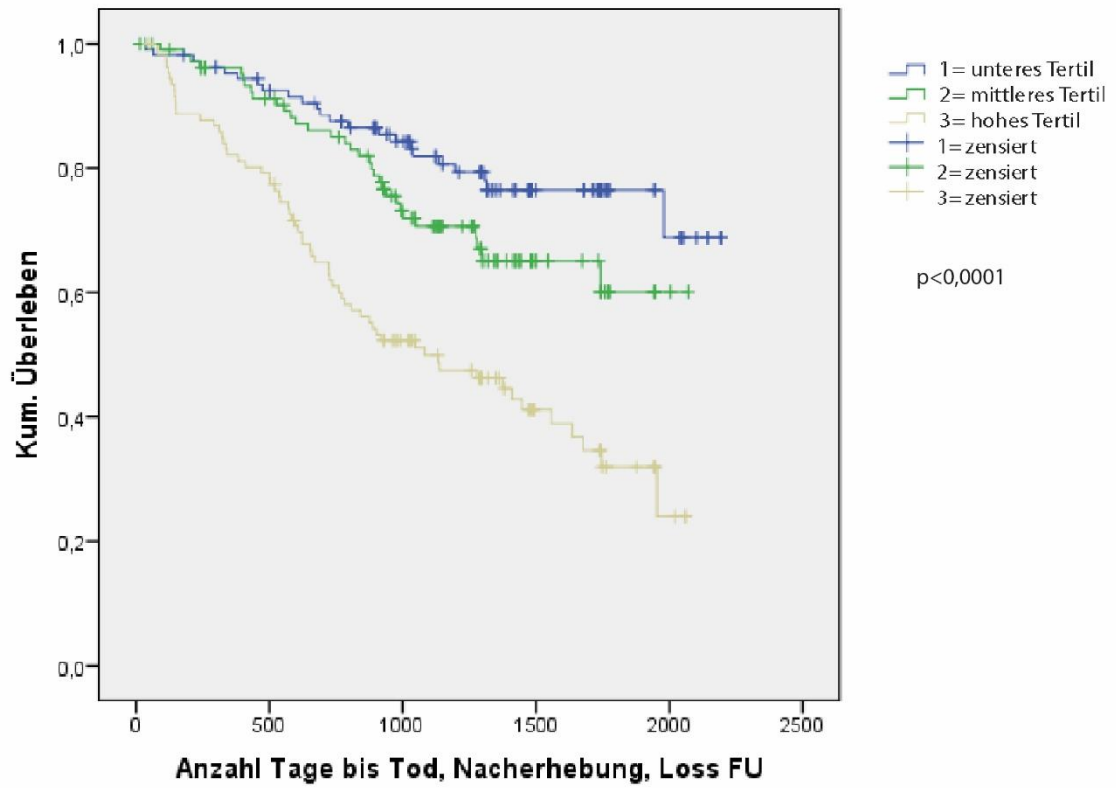


B



C

HD Männer



HD Frauen

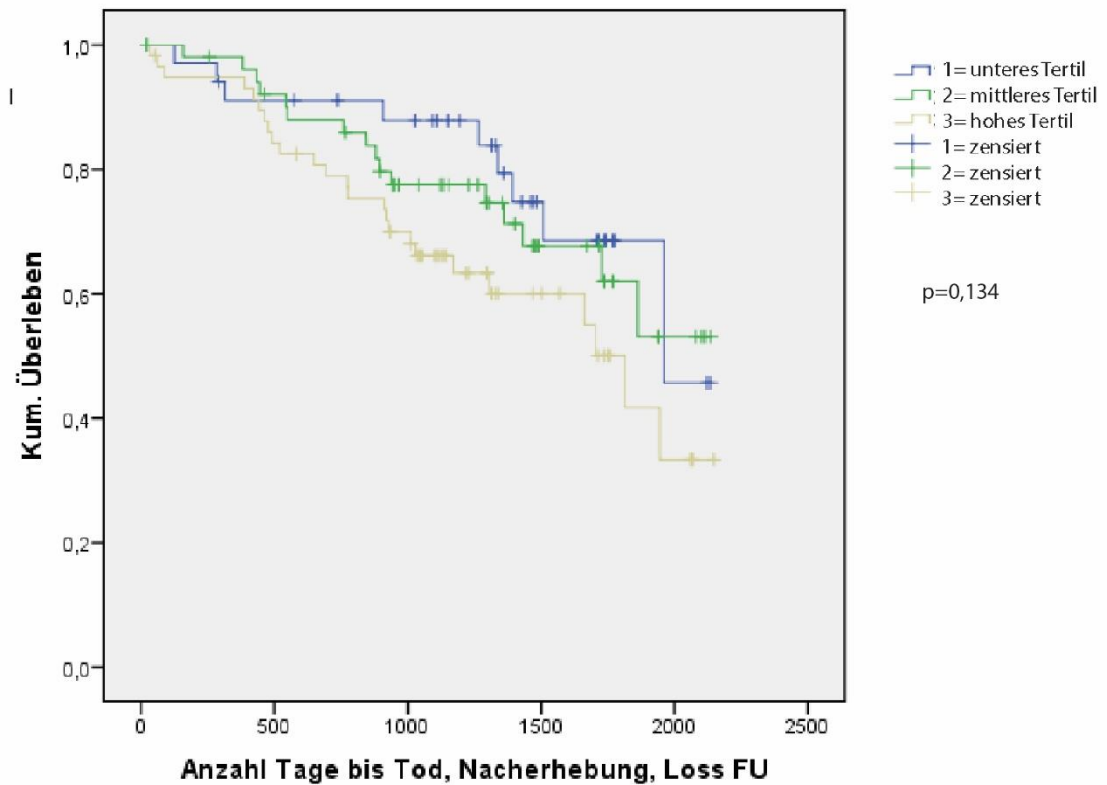


Abb. 23: ISAR Kohorte- Interleukin 8 korreliert mit Mortalität in HD-Patienten

A: Mittelwert des natürlichen Logarithmus von IL 8 im Blut HD-Männer (n=321) und HD- Frauen (n=144) mit Standardabweichung

B: Mortalität nach Geschlechtern getrennt. Bei Männern zeigt sich eine positive Korrelation des Median von IL-8 mit der Mortalität, bei Frauen IL-8 Median unabhängig von hoher oder niedriger Mortalität circa gleich

C: Kaplan Meier Überlebenskurve, HD-Männer und Frauen jeweils unterteilt in Terzile HD-Männer je 107 Patienten pro Terzil: 1.Terzil mit 23, 2. Terzil mit 32, 3. Terzil 63 Ereignisse (insg. 118 Ereignisse) - Signifikanztestung mit Log Rank auf Gleichheit der Überlebenverteilung der verschiedenen Terzile $p=0.0001$

HD-Frauen mit n=34 im 1. Terzil, n=52 im zweiten Tertil und n=58 im 3. Terzil: 1. Terzil mit 9, 2. Terzil mit 16, 3. Terzil mit 25 Ereignissen (insg. 50 Ereignisse) - Signifikanztestung mit Log Rank auf Gleichheit der Überlebenverteilung der verschiedenen Terzile $p=0.134$

Männer zeigen eine signifikant höhere Mortalität bei höheren IL-8 Werten, bei Frauen ist die Mortalität unabhängig von der IL-8 Konzentration im Blut

4.5.2 MCO Filter als Therapieansatz der chronischen Inflammation

Interleukin 8 ist ein kleines 8 kDa großes Molekül welches vorwiegend als Monomer in vivo vorliegt (Horcher, Rot et al. 1998), daher sollte IL-8 bei einer normalen Porengröße der Dialysemembran klein genug sein, um diese problemlos zu passieren.

Dennoch stellte sich uns die Frage, ob durch den erhofften immunmodulatorischen Effekt der MCO Membran eine nachhaltige Senkung des Interleukin 8 stellvertretend für eine reduzierte chronische Inflammation erreicht werden kann, oder ob Interleukin 8 auch bei Dialysetherapie mit MCO Membran langfristig unverändert bleibt. Zickler, Schindler et al. (2017) konnten in ihrer klinischen Crossover Studie mit Dialysedauern von 4 und 8 Wochen mit einer MCO Membran schon nach 4 Wochen Dialysetherapie eine signifikante Reduktion von TNF α und IL-6 mRNA gegenüber dem normalen high-flux Dialysator zeigen. In Bezug auf das Interleukin 8 konnte in der klinischen Studie zwar eine signifikante Reduktion des IL-8 ($p < 0,05$) mit der MCO Dialyse nach 4 Wochen erreicht werden, jedoch war der Unterschied zur normalen Highflux Dialyse nicht signifikant.

Im Rahmen der bei uns durchgeführten MCO Studie wurde im Wechsel von MCO und Highflux Dialysatoren für jeweils 3 Monate dialysiert. Jeweils zu Beginn und Ende des 3-monatigen Zeitraums erfolgten während der Dialysesitzung sequenzielle Serumabnahmen (bei Dialysebeginn, nach 1 Stunde, nach 2 Stunden und zum Ende der Dialyse (circa 4 Stunden)). Hieraus wurden die Zytokine mittels Multiplexanalysen bestimmt. Betrachtet man den Verlauf des IL-8 innerhalb einer Dialysesitzung unabhängig vom verwendeten Dialysefilter zeigt sich keine Reduktion, sondern teilweise sogar ein ansteigendes IL-8 im Serum während der Sitzung (high flux T1/3 0h IL-8 = 11,19pg/ml \pm 2,33 vs 4h 11,06pg/ml \pm 2,30; MCO T1/3 0h IL-8 = 11,41pg/ml \pm 2,15 vs. 4h 11,97pg/ml \pm 2,26; high flux T2/4 0h IL-8 10,62pg/ml \pm 2,17 vs. 4h 10,38pg/ml \pm 2,12; MCO T2/4 0h IL-8= 11,06pg/ml \pm 2,26 vs 4h 9,13 pg/ml \pm 1,86) . Betrachtet man die Langzeitkinetik der verwendeten Filter festigt sich die Beobachtung, dass der MCO Filter gegenüber dem high flux Dialysator in Bezug auf die IL-8 Konzentration im Serum keinen Einfluss hat.

Zusammenfassend zeigt sich, dass der MCO Filter in Bezug auf die IL-8 Modulation im Serum keinen Benefit im Sinne ein langfristigen IL-8 Reduktion zeigt.

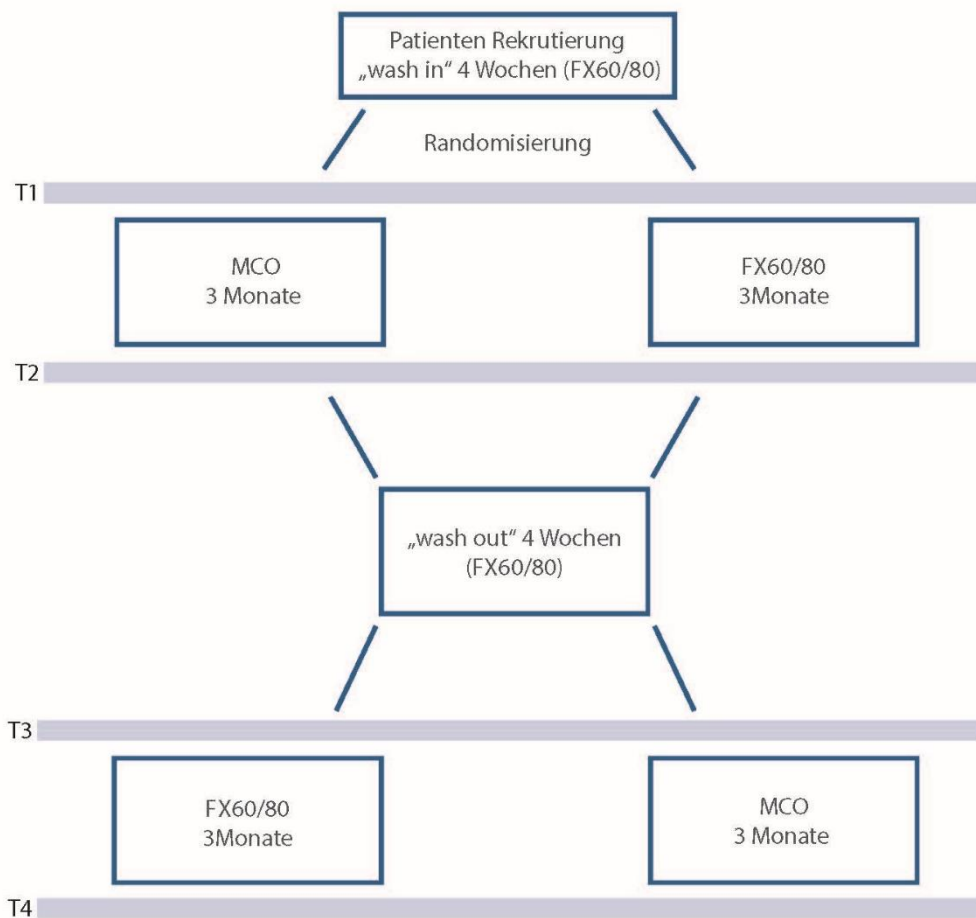


Abb. 24: Studiendesign MCO Studie

Nach Rekrutierung und 4-wöchiger „Wash-in“ Phase mit dem Standardfilter FX60/80 erfolgte die Randomisierung der Patienten in 2 Gruppen. Im Cross-over Design erfolgte die Dialyse für jeweils 3 Monate mit dem MCO Filter Theranova 400 und FX60/80. Jeweils zu Beginn und am Ende der 3 Monate erfolgte eine Blutabnahme vor und während der Dialyse (s. Methoden- MCO T1 n=18, T2 n=14, T3 n=10, T4 n=10; high flux T1 n=10, T2 n=11, T3 n=13, T4 n=13 – gezählt wurden jene Probanden die alle 4 sequenziellen Blutabnahmen pro Abnahmeintervall haben)

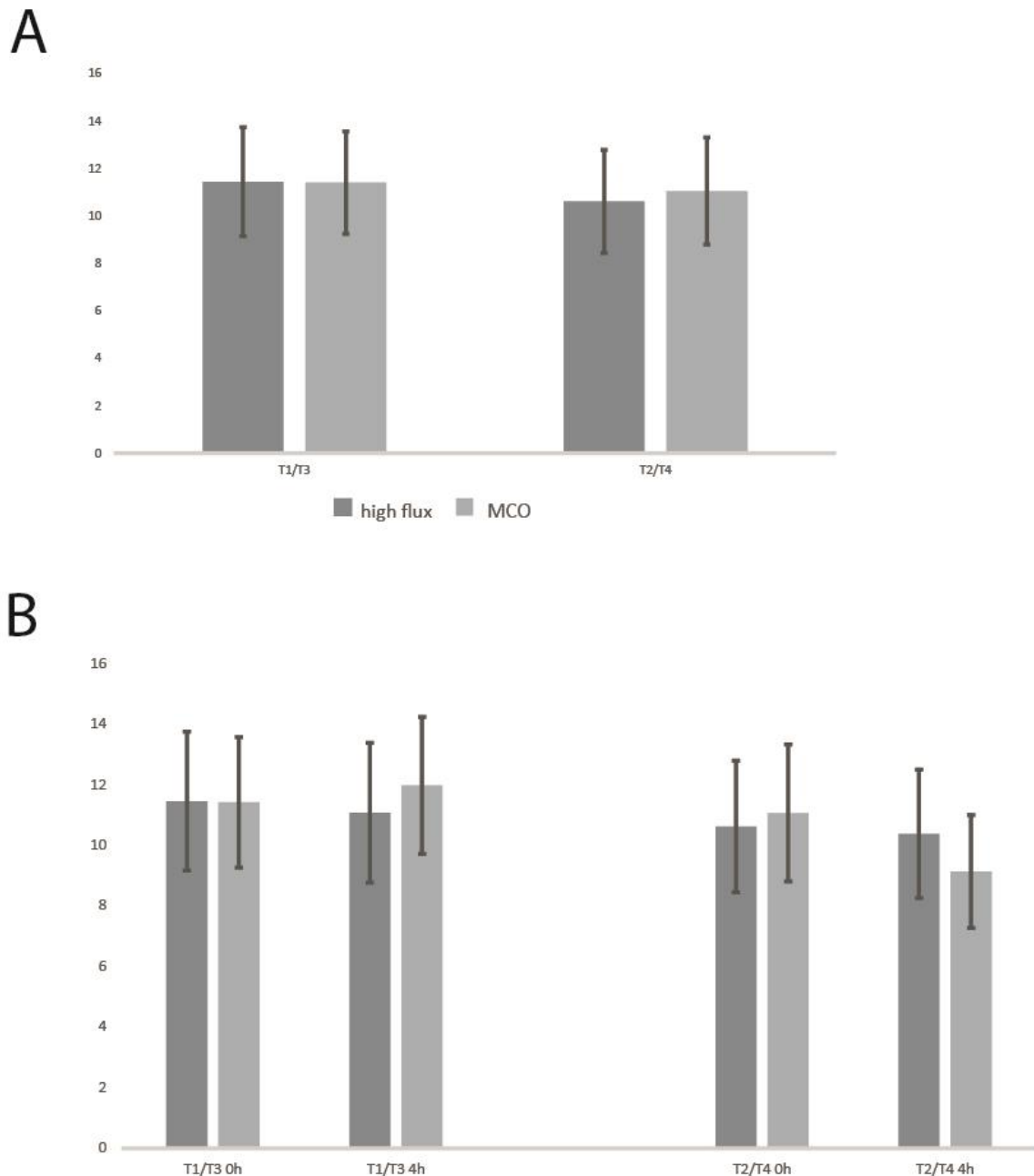


Abb. 25: MCO Studie- IL-8 Modulation durch MCO Filter

A: Abnahme zu Dialysebeginn (0h) - Langzeitmodulation – IL-8 Mittelwert in

[pg/ml] mit Standardfehler: T1/T3 zu Studienbeginn, T2/T4 nach 3 Monaten

Laufzeit, keine signifikante IL-8 Reduktion über 3-monatige Dialysedauer (high flux T1/3 n=23, T2/4 n=24, MCO T1/3 n=28, T2/4 n=24)

B: In Session Modulation von IL-8 in Session (0h vs. 4h) (Mittelwert [pg/ml] mit

SEM): keine signifikante Reduktion von IL-8 über die Dialysedauer von 4h

unabhängig vom Filter (high flux T1/3 n=23, T2/4 n=24; MCO T1/3 n=28, T2/4 n=24)

5. Diskussion

Geschlechterspezifische Unterschiede spielen in der heutigen Medizin eine zunehmende Rolle. Im Dialysekollektiv fällt auf, dass mehr Männer als Frauen dialysepflichtig sind, beziehungsweise diese Therapie häufiger in Anspruch nehmen (Carrero, Hecking et al. 2018). Trotz stetiger Verbesserung der Prozedur der Dialyse weisen Dialysepatienten eine insgesamt höhere Mortalität gegenüber der Gesamtbevölkerung auf (Canaud, Tong et al. 2011). Jedoch kommt es im Gegensatz zur Normalbevölkerung an der HD zu einer Angleichung der Mortalität zwischen den Geschlechtern (Villar, Remonet et al. 2007, Vongsanim und Davenport 2019). In Bezug auf die Todesursache unter Hämodialyse konnte gezeigt werden, dass vor allem Männer von einer höheren Mortalität durch Inflammation betroffen sind (Stenvinkel, Wanner et al. 2002).

Die Ätiologie der chronischen Inflammation in Zusammenhang mit der CKD beziehungsweise Nierenersatztherapie wird dabei als multifaktorielles Geschehen betrachtet indem vor allem urämische Toxine, Volumenüberladung und Immunaktivierung durch die Dialysemembran zunehmend an Bedeutung gewinnen (Onofriescu, Siriopol et al. 2015, Alves, Sun et al. 2018). Neben CRP und IL-6 als proinflammatorische Zytokine, die das Outcome und Mortalität von Patienten mit einer CKD und an der Hämodialyse beeinflussen, konnten Zaza, Pontrelli et al. (2008) zeigen, dass IL-8 über die signifikante Überexpression des CXCR 2 Rezeptors ein Mediator der Inflammation in CKD Patienten darstellt. Auch in Dialysepatienten ist Interleukin 8 als starker unabhängiger Prädiktor der Gesamtmortalität beschrieben und spielt in der multifaktoriell bedingten beschleunigten Entstehung einer Arteriosklerose eine Rolle (Panichi, Taccola et al. 2006, Packard und Libby 2008).

Ziel dieser Arbeit war es, mögliche geschlechterspezifische Unterschiede in der IL-8 Wirkung in HD-Patienten zu identifizieren.

5.1 Geschlechterspezifische Inflammation in HD- Patienten

Patienten an der Dialyse gehören zu einem Großteil einem vorselektierten Patientenkontinental an. Der durchschnittliche Dialysepatient ist um die 60 Jahre, männlich und weist mehrere Vorerkrankungen auf (Kramer, Pippias et al. 2019). Auch sind Männer im Durchschnitt jünger bei Beginn einer HD-Therapie (Hecking, Bieber et al. 2014).

Betrachtet man geschlechterspezifische Unterschiede, ist es notwendig zwischen Gender und Sex zu unterscheiden (s. Kapitel 1.6). Neben der Genetik und Epigenetik spielen vor allem die Sexualhormone eine wichtige Rolle in der geschlechterabhängigen Physiologie und Pathophysiologie (Regitz-Zagrosek und Kararigas 2017).

Insbesondere Östrogene spielen vor allem in Bezug auf das Herzkreislauf System eine Rolle. Frauen erleiden erst in höherem Lebensalter kardiovaskuläre Ereignisse, was wohl vor allem auf protektive Effekte des Östrogens und die hormonelle Umstellung in der Menopause zurückzuführen ist (Patten 2007). Auch auf den Blutdruck hat Östrogen einen positiven Effekt über Modulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (Colafella und Denton 2018).

In Bezug auf Östrogen und IL-8 finden sich in der Literatur mehrere Arbeiten, welche zeigen, dass IL-8 durch 17β -Estradiol in seiner Signalkaskade gehemmt werden kann (Liu, Kuo et al. 2016), beziehungsweise die LPS induzierte IL-8 Expression in PBMCs vermindert, und der Östrogenrezeptor auf Transkriptionsebene zu einer Reduktion der IL-8 Produktion führt (Pioli, Jensen et al. 2007). Schon Clark und Peterson (1994) zeigten, dass in einer gesunden Kohorte von alten und jungen Menschen, ältere Männer weniger IL-8 produzieren als Frauen, jedoch auf Stimulation mit LPS eine ca. 8 fache Steigerung und damit Überproduktion von IL-8 im Gegensatz zu den älteren Frauen und der jungen Kontrollgruppe präsentieren. Auch in unseren Daten zeigte sich eine signifikant höhere IL-8 Konzentration nach IL-8 [10ng/ml] Stimulation in Männern sowohl in Bezug auf die männliche Negativkontrolle als auch in Bezug auf die IL-8 Konzentration in Frauen nach gleicher Stimulation. In Frauen konnten in der Messung der IL-8 Konzentration im Gegensatz dazu keine signifikanten Unterschiede durch eine IL-8 Stimulation festgestellt werden, was wiederum auf eine östrogenabhängige IL-8 Suppression hinweisen könnte.

In der Nephrologie wurden geschlechterabhängige Unterschiede in der Entstehung und im Voranschreiten unterschiedlichster Erkrankungen vor allem im Tierexperiment beschrieben. Beispielsweise in der autosomal dominanten polyzystischen Nierenerkrankung am Rattenmodell zeigte sich ein protektiver Effekt des weiblichen Geschlechts, welcher durch die Ovariectomie reduziert wurde, sowie analog ein schnelleres Voranschreiten der Erkrankung in männlichen Ratten, welche durch die Orchidektomie verlangsamt werden konnte (Stringer, Komers et al. 2005). Doublier, Lupia et al. (2011) zeigten ebenfalls am Mausmodell das Östrogen und Testosteron auf Podozytenschäden und -apoptose Auswirkung haben, insbesondere im Sinne einer protektiven Östrogen-, und einer schädlichen, propapoptotischen Testosteronwirkung.

Die mögliche Rolle von IL-8 in der Inflammation von männlichen Dialysepatienten mit Hinweisen auf einen kausalen Zusammenhang bestätigte sich auch in unseren Daten.

In der Auswertung der ISAR Kohorte zeigte sich eine positive Korrelation von erhöhten IL-8 im Serum mit der Mortalität in Männern. Zwar konnten wir auf mRNA Ebene keine Unterschiede zwischen Männern und Frauen feststellen, jedoch zeigte sich in unseren Experimenten in Bezug auf die Zellaktivierung/Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade eine stärkere Signaltransduktion in Männern. Auch in der Zytokinmessung im Überstand der Zellkultur zeigten Männer eine signifikant höhere IL-6 Konzentration als Frauen nach Doppelstimulation mit IL-8 und LPS, was die Hypothese einer stärkeren Inflammatorischen Reaktion der Männer auf IL-8 stützt, da durch die LPS Stimulation allein kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern gemessen werden konnte.

Betrachtet man das Dialysekollektiv fällt auf, dass zwar mehr Frauen an einer eingeschränkten Nierenfunktion leiden als Männer, jedoch deutlich mehr Männer die Nierenersatztherapie in Anspruch nehmen (Carrero, Hecking et al. 2018). Diskutiert wird von den Autoren, neben der höheren Lebenserwartung von Frauen und damit einer höheren Prävalenz für eine Einschränkung der Nierenfunktion, vor allem genderabhängige Faktoren wie eine mögliche Überdiagnostik, da Frauen häufiger und regelmäßiger zum Arzt gehen und eher Vorsorgeuntersuchungen in Anspruch nehmen. Insgesamt scheinen Frauen einen langsameren Progress im Verlust der eGFR im Alterungsprozess als Männer zu haben, wofür Cobo, Hecking et al. (2016)

Sexhormone, Lifestyle und einen geschlechterabhängigen NO Stoffwechsel mit höheren NO-Spiegeln in Frauen ausmachen.

In Hinblick auf mögliche Kausalität eines geschlechterabhängigen Benefits in der IL-8 Wirkung für Frauen bleibt zu beachten, dass Patientinnen an der HD häufig einen gestörten Menstruationszyklus aufweisen (Wiles, Nelson-Piercy et al. 2018). Die oben geäußerte Vermutung einer östrogenabhängigen IL-8 Suppression in Frauen kann daher durch diese Beobachtung nicht gestützt werden, da der Großteil der Betroffenen in die postmenopausale Altersgruppe einzuordnen ist.

Auch der Überlebensvorteil den Frauen in der Normalbevölkerung besitzen schwindet mit Beginn einer Hämodialysetherapie. Dennoch sterben Frauen, die über 55 Jahren alt sind, an der Dialyse weniger häufig an kardiovaskulären Ereignissen als dialysierte Männer (Carrero, de Jager et al. 2011, Cobo, Hecking et al. 2016), sodass alles in allem unklar ist, inwieweit die positive Östrogenwirkung in Hämodialyse-Patientinnen der vorrangige Mechanismus im Rahmen eines geschlechterabhängigen Vorteils darstellt.

5.2 Spezifische geschlechterabhängige Interleukin 8 Wirkung in Dialysepatienten

Aufgrund der bereits publizierten und der von uns erhobenen Daten interessieren uns mögliche Mechanismen, welche die unterschiedliche geschlechterspezifische IL-8 Wirkung erklären könnten.

Kardiovaskuläre Ereignisse stellen eine der Haupttodesursachen bei Dialysepatienten dar. Als eine Ursache für die erhöhte kardiovaskuläre Mortalität gilt die chronische Inflammation in HD-Patienten. Als möglicher Mechanismus dafür gilt unter anderem eine durch die Inflammation hervorgerufene endotheliale Dysfunktion (Merino, Nogueras et al. 2008). Im Kollektiv der Dialysepatienten steigen proinflammatorische Zytokine wie IL-6 und hs-CRP mit nachlassender Nierenrestfunktion an (Gupta, Mitra et al. 2012). Ribeiro, Bosquetti et al. (2014) konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass neben SDF-1 (stromal-cell derived factor 1) auch IL-8 als Marker einer endothelialen Läsion bei Urämie zu sehen ist. Schon 2006 wurde Interleukin 8 als stärkster unabhängiger Prädiktor für die Gesamtmortalität und kardiovaskulärer Ereignisse gefolgt von IL-6 und CRP identifiziert (Panichi, Taccola et al. 2006).

Interleukin 8 ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches in der Pathogenese und Pathophysiologie unterschiedlichster Erkrankungen eine Rolle spielt. Einerseits wirkt es regulatorisch, teilweise sogar antiinflammatorisch in physiologischen Prozessen, wie zum Beispiel in der fetalen Entwicklung (Maheshwari 2009). In der onkologischen Forschung gilt IL-8 andererseits als Protein im Tumormikroenvironment welches bei hoher Expression mit einer schlechten Prognose und einem schlechteren Ansprechen auf Chemotherapie, zum Beispiel beim Magenkarzinom, assoziiert ist (Zhai, Shen et al. 2019). Auch therapeutische Ansätze mittels monoklonaler IL-8 Antikörper werden zum Beispiel in der Behandlung des malignen Melanoms untersucht (Lazennec und Richmond 2010). Auch im Therapiemonitoring als möglicher Biomarker zur Verlaufskontrolle und Ansprechrates bei immunmodulatorischen Tumorthérapien wird IL-8 in Betracht gezogen (Alfaro, Sanmamed et al. 2017). Unabhängig von der Onkologie ist IL-8 im Rahmen septischer Erkrankungen/Multiorganversagen bei erhöhter Konzentration im Blut mit einer schlechteren Prognose und einer höheren Mortalität assoziiert. In diesem

Zusammenhang wurde IL-8 ebenfalls als therapeutischer Angriffspunkt im Rahmen entzündlicher Erkrankungen in Betracht gezogen (Harada, Mukaida et al. 1996).

Neben der bekanntesten Funktion, der Chemotaxis, führt IL-8 auch zu einem oxidativen Burst und ist ein potenter Induktor der Degradation extrazellulärer Matrix (Mortier, Van Damme et al. 2008).

Gerade wenn man eine geschlechterabhängige Potenzierung der IL-8 Aktivität durch IL-8 Spaltung mit in Betracht zieht, könnte ein Wirkunterschied auch auf eine geschlechterabhängige MMP Regulation zurückführbar sein.

Besonders MMP-9 stellte sich als Enzym von Interesse heraus, da es zu einer spezifischen Spaltung, und damit Wirkpotenzierung, von IL-8 77 AA in 72 AA führt (Nourshargh, Perkins et al. 1992, Van den Steen, Proost et al. 2000). MMP-9 ist unter anderem auch in der Kardiologie von Interesse. In Bezug auf die Arteriosklerose und das Outcome nach Herzinfarkt korreliert die Höhe des MMP-9 mit einem schlechteren Überleben, da es durch die Enzymaktivität zu einer Instabilität arteriosklerotischer Plaques führt (Lahdentausta, Leskela et al. 2018). Auch in Bezug auf renale Erkrankungen konnte eine Hochregulation der MMP-2 und MMP-9 Gene in der Pathogenese und Progression der CKD und einer begleitenden renalen Fibrosierung beobachtet werden (Cheng, Limbu et al. 2017).

In unseren Experimenten mit dem Versuch die Auswirkung des inflammatorischen HD-Milieus aufzuzeigen, zeigte sich eindrücklich, dass vermehrt MMP-9 in den mit männlichem HD Plasma stimulierten Proben nachweisbar ist. Auch in der Stimulation mit Überständen der Zellkultur nach IL-8 Inkubation zeigten Männer eine verstärkte Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade. Unsere Ergebnisse deuten auf eine geschlechterabhängige, in Männern verstärkte, MMP-9 Expression in HD-Patienten hin. Collazos, Asensi et al. (2015) zeigten bereits eine geschlechterabhängige MMP Regulation, zurückführbar auf single nucleotide repeats (SNP) an der MMP Promotor Region. Assoziationen von geschlechterspezifischen Unterschieden und SNP konnten sie jedoch nur für MMP-3 finden. Auch in der kardiologischen Forschung am Tiermodell und in vitro zeigte sich eine Östrogenrezeptor abhängige Regulation der MMP-2 Transkription (Mahmoodzadeh, Dworatzek et al. 2010). Unseren Ergebnissen entsprechend zeigten Cheng, Philip et al. (2020) an einer Östrogenrezeptor Knock-out Ratte geschlechterabhängiges kardiales Remodelling, wobei vor allem weibliche Ratten durch das Fehlen der Östrogenwirkung ein

negativeres Outcome haben, und dafür unter anderem die Regulation des MMP-9 eine Rolle spielt.

Die Hypothese einer geschlechterabhängigen Mikroinflammation, durch unter anderem die MMP Expression, bestätigte sich auch in unserem Migrationsexperiment. Hier konnte durch die alleinige IL-8 Stimulation keine signifikante geschlechterabhängige Migration erzielt werden. Durch Ersatz des Stimulationsreizes mit dem Überstand der Zellkultur nach IL-8 Stimulation zeigte sich jedoch eindrucksvoll, dass die Zellen signifikant stärker in Richtung des männlichen Überstands migrieren, sodass diese Daten eine verstärkte inflammatorische Reaktion männlicher PBMCs auf IL-8 nahelegen, welche in vitro einen signifikanten Unterschied in der klinisch relevanten IL-8 Wirkung macht.

In Bezug auf die Wirkpotenzierung des IL-8 durch spezifische Molekülspaltung gilt zu beachten, dass neben der Zahl der Aminosäuren auch zwischen N- und C-terminaler Spaltung unterschieden werden kann. Der Ort der Abspaltung und Anzahl der zurückbleibenden Aminosäuren spielt eine wichtige Rolle für die biologische Funktion. Neben einer Wirkpotenzierung konnten Edwards, Taylor et al. (2005) zeigen, dass der *Streptococcus pyogenes*, ein Bakterium, welches zur nekrotisierenden Fasziitis führt, das Enzym SpyCEP bildet. Dieses führt zu einer C-terminalen Spaltung des IL-8 und damit zu einer Inaktivierung. Dieser Mechanismus führt zu einer abgeschwächten Immunantwort des Organismus mit reduzierter Migration neutrophiler Granulozyten und damit zu einem fulminanteren Krankheitsverlauf (Turner, Kurupati et al. 2009). Auch in Zusammenhang mit septischen Erkrankungen/Multiorganversagen ist IL-8 bei erhöhter Blutkonzentration mit einer schlechteren Prognose und Mortalität assoziiert (Hamano, Gohra et al. 1998).

Um die spezifische IL-8 Spaltung von 77 AA in 72 AA, unabhängig von einem einzelnen Enzym nachzuvollziehen, erfolgte der indirekte Nachweis über den IL-8 77 AA Abbau mittels Westernblot. Hier konnten wir beispielhaft an einem HD-Pärchen einen verstärkten IL-8 77 AA Abbau in Männern zeigen. Der genaue Mechanismus, und ob dieser allein über die MMP-9 Expression zu Stande kommt, bleibt durch diese Arbeit jedoch unbeantwortet.

Allerdings konnten wir in Betrachtung der MMP Konzentrationen im ELISA signifikant höheres MMP-9 bei Männern nach IL-8, IL-6 und HD-Plasmastimulation nachweisen.

Frauen wiesen dabei durch die Stimulation keine signifikanten Unterschiede in der MMP-9 Expression auf, während Männer im Vergleich zu den Frauen eine signifikant höhere MMP-9 Induktion nach Plasma+IL-8 Stimulation zeigten. Dies entspricht einer Überexpression von MMP-9 durch IL-8 Stimulation. Frauen zeigten nach IL-8 Stimulation im ELISA keine signifikante MMP-9 Expression, was ebenfalls für eine geschlechterabhängige Expression des MMP-9 spricht. Auch bei MMP-2, das zweite MMP welches Cheng, Limbu et al. (2017) in der CKD als überexprimiert beschrieben, zeigte nach IL-8 Stimulation eine signifikant höhere Konzentration in Männern.

Insgesamt unterliegt die Regulation und Expression von MMPs und IL-8 vielfältigen regulatorischen Mechanismen. Unsere Daten zeigen hierbei einen möglichen kausalen Zusammenhang von geschlechterabhängiger Wirkpotenzierung von IL-8 über die Regulation der MMP Expression.

5.3 Verbesserung des männlichen Outcomes durch HDx

Nach positiven Ergebnissen der in-vitro Experimente stellte sich uns die Frage der Auswirkung, sowie möglicher therapeutischer Ansätze im klinischen Alltag von IL-8 in HD-Patienten.

Die Daten der ISAR-Studie zeigen die klinische Relevanz der chronischen Inflammation und Sterblichkeit der Dialysepatienten in Bezug auf das IL-8. Aus dieser Beobachtung stellt sich die Folgefrage, ob die Erkenntnisse in den klinischen Alltag eingebracht werden können, und sogar zu einem therapeutischen Nutzen führen könnten.

In der aktuellen Forschung liegt ein Fokus vor allem auf der Verbesserung der Dialysetechnik durch Einsatz neuer Methoden wie die HDF, die eine schonendere und bessere Filtration mittelgroßer Moleküle ermöglichen soll und darüber die Morbidität reduziert (Van Biesen, Vanholder et al. 2017). Neben der Dialysetechnik wird auch an Dialysatoren geforscht, welche langfristig die sehr aufwendige Technik der HDF ersetzen könnten (Van Biesen, Vanholder et al. 2017). Im Fokus liegen „medicum cut off“ und „high cut off“ Filter, also Membranen, die eine größere Porenweite haben und dadurch ebenfalls eine bessere Filtration mittelgroßer Moleküle ermöglichen sollen (Locatelli, Martin-Malo et al. 2009). Limitierend ist hier immer der durch die höhere Porengröße bedingte Albuminverlust, da erniedrigtes Albumin und Mangelernährung ebenfalls mit einer erhöhten Mortalität assoziiert sind (Alves, Sun et al. 2018). Lindgren, Fjellstedt et al. (2020) konnten in ihrer cross-over Studie bereits zeigen, dass die Elimination mittelgroßer Moleküle mit MCO Membranen der HDF gleichwertig ist.

Die MCO Filter konnten bereits eine signifikante Reduktion von proinflammatorischer mRNA erzielen, sowie eine signifikant bessere Reduktion mittelgroßer Moleküle gegenüber der Standarddialyse mit high-flux Dialysatoren (Kirsch, Rosenkranz et al. 2017, Zickler, Schindler et al. 2017). Auch konnten in vitro eine geringere Kalifizierung und niedrigere IL-6 Konzentrationen nach MCO/HCO Dialyse gezeigt werden (Willy, Hulko et al. 2017). Im Rahmen der MCO Studie, die im Klinikum rechts der Isar und im KfH Dialysezentrum Dachau durchgeführt wurde, erfolgte die Dialyse mit dem MCO Filter TheraNova 400 im Vergleich zu dem Standard high-flux Dialysator FX60/ FX80. Zickler et al. konnten in ihrer Studie eine Reduktion von IL-8 durch die Dialyse mit dem MCO Filter zeigen, welche jedoch nicht signifikant

gegenüber der Standard high-flux Dialyse war. Die befürchteten Nebenwirkungen von übermäßigem Albuminverlust bestätigten sich dort nicht.

Im Rahmen unserer Filterstudie zeigte sich in Bezug auf die Serumwerte des IL-8 sowohl im Rahmen der Langezeitbeobachtung nach 3 Monaten als auch in der Einzelsitzung-Kinetik im Serum kein signifikanter Abfall des IL-8. Im Gegensatz dazu zeigte sich teilweise sogar eine durch die Dialyse getriggerte IL-8 Produktion während der HD-Sitzung. Weitere Untersuchungen der mRNA und Immunphänotypen der PBMCs in Bezug auf möglichen Benefit der MCO Dialyse bleiben abzuwarten.

5.4 Limitationen

Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass die klinische Wirkung von IL-8 in Männern stärker ausgeprägt ist als in Frauen. Auch die klinischen Daten der ISAR-Kohorte konnten zeigen, dass erhöhtes IL-8 in Männern positiv mit einer höheren Mortalität korreliert. Bei einem Ungleichgewicht von Männern > Frauen, entsprechend der Geschlechterverteilung an der Dialyse insgesamt, konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern nachgewiesen werden.

Unsere in-vitro Experimente unterstützen die Hypothese der stärkeren Inflammation durch IL-8 in Männern. Allerdings fanden diese nur in einer kleinen Kohorte von Dialysepatienten statt. Die Auswertungen erfolgten bis maximal 10 Proben pro Geschlecht, sodass von dieser Kohortengröße keinesfalls auf eine statistisch signifikante Relevanz in Betrachtung aller HD- Patienten geschlossen werden kann. Wie in jeder Kohortenanalyse bergen humane Proben ein Risiko für eine hohe interindividuelle Varianz und erschweren dadurch eine objektive Betrachtung der untersuchten Fragestellung gegenüber dem Tiermodell. Außerdem war es in unseren Experimenten leider nicht möglich mit Sexualhormonen zu stimulieren, sodass wir die direkte Auswirkung durch eine Stimulation mit Östrogen nicht näher betrachten konnten.

In Bezug auf die Gesamtaussagekraft des IL-8 und seiner Rolle in der Morbidität und Mortalität von Dialysepatienten zeigt diese Arbeit daher nur eine kleine Stichprobe und Teilaspekte. Da die durch die Dialyse hervorgerufene Inflammation mannigfaltigen Auslösern und Mechanismen unterliegt, ist IL-8 nur als ein kleiner Baustein unter vielen im Mechanismus der Immunaktivierung zu sehen. Neben der Art der Dialysetherapie, dem verwendeten Filter und der Dialyseeffektivität spielt für die Inflammation neben dem Geschlecht ebenso die erhaltene Restfunktion der Niere, der Volumenstatus und auch genetische sowie epigenetische Varianten eine entscheidende Rolle für die Ausprägung der Inflammation in jedem Individuum (Barreto, Barreto et al. 2010, de Sequera, Corchete et al. 2017).

Alles in allem weisen die Daten auf einen möglichen Zusammenhang der stärkeren inflammatorischen Wirkung in HD- Männern hin, jedoch bedarf es weiterer Untersuchungen mit einem größeren Patientenkollektiv und genauerer Untersuchung der Wirkung von Sexualhormonen, um die Frage nach den genauen Mechanismen und der Kausalität zu beantworten.

6. Zusammenfassung

Die Anzahl an Dialysepatienten nimmt aufgrund der steigenden Lebenserwartung in den letzten Jahren stetig zu. Trotz großem Fortschritt in Material und Methodik der Dialysetherapie ist die Mortalität von Dialysepatienten noch immer im Vergleich zur Normalbevölkerung stark erhöht (Canaud, Tong et al. 2011). Im Gegensatz zur höheren Lebenserwartung von Frauen in der Normalbevölkerung, zeigt sich im Dialysekollektiv eine Angleichung der Mortalität zwischen Männern und Frauen (Vongsanim und Davenport 2019).

Eine der Ursachen ist die erhöhte kardiovaskuläre Mortalität von Dialysepatienten, jedoch gewinnt die durch das urämische Milieu und Zellaktivierung bei Kontakt mit körperfremden Oberflächen vorliegende chronische Inflammation eine immer wichtigere Bedeutung im Verständnis der Morbidität in Zusammenhang der Hämodialyse (Massy, Stenvinkel et al. 2009, Neiryneck, Glorieux et al. 2015). Interleukin 8 ist ein Chemokin, welches in Dialysepatienten bereits als unabhängiger Prädiktor einer erhöhten Mortalität sowie als Beschleuniger der Arteriosklerose über den Mechanismus der endothelialen Dysfunktion gezeigt werden konnte (Panichi, Taccola et al. 2006, Ribeiro, Bosquetti et al. 2014).

Wir konnten zeigen, dass IL-8 mit einer erhöhten Mortalität in Männern assoziiert ist und zu einer signifikant stärkeren Zellaktivierung sowie Migrationsbewegung der Zellen führt. Ob die mit IL-8 korrelierende chronische Inflammation durch neue Dialysetechniken und -membranen langfristig reduziert und die Morbidität und Mortalität an der Dialyse gesenkt werden kann Bedarf weiterer Forschung- ebenso der genaue Mechanismus, welcher zu den geschlechterspezifischen Reaktionen des Immunsystems führt.

7. Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K. (2012). Cellular and Molecular Immunology/Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai; illustrations by David L Baker, Alexandra Beker. - 7th ed. .
- Aihua Li, S. D., Michelle L. Varney, Bhavana J. Dave and Rakesh K. Singh (2003). "IL-8 Directly Enhanced Endothelial Cell Survival, Proliferation, and Matrix Metalloproteinases Produktion and Regulated Angiogenesis " The Journal of Immunology **170**: 3369-3376.
- Ala-aho, R. und V. M. Kahari (2005). "Collagenases in cancer." Biochimie **87**(3-4): 273-286.
- Alexander, S. P., A. P. Davenport, E. Kelly, N. Marrion, J. A. Peters, H. E. Benson, E. Faccenda, A. J. Pawson, J. L. Sharman, C. Southan und J. A. Davies (2015). "The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: G protein-coupled receptors." Br J Pharmacol **172**(24): 5744-5869.
- Alfaro, C., M. F. Sanmamed, M. E. Rodríguez-Ruiz, Á. Teijeira, C. Oñate, Á. González, M. Ponz, K. A. Schalper, J. L. Pérez-Gracia und I. Melero (2017). "Interleukin-8 in cancer pathogenesis, treatment and follow-up." Cancer Treat Rev **60**: 24-31.
- Alves, F. C., J. Sun, A. R. Qureshi, L. Dai, S. Snaedal, P. Barany, O. Heimbürger, B. Lindholm und P. Stenvinkel (2018). "The higher mortality associated with low serum albumin is dependent on systemic inflammation in end-stage kidney disease." PLoS One **13**(1): e0190410.
- Baggiolini, M. und I. Clark-Lewis (1992). "Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine." FEBS Lett **307**(1): 97-101.
- Baggiolini, M., A. Walz und S. L. Kunkel (1989). "Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils." Journal of Clinical Investigation **84**(4): 1045-1049.
- Barreto, D. V., F. C. Barreto, S. Liabeuf, M. Temmar, H. D. Lemke, C. Tribouilloy, G. Choukroun, R. Vanholder und Z. A. Massy (2010). "Plasma interleukin-6 is independently associated with mortality in both hemodialysis and pre-dialysis patients with chronic kidney disease." Kidney Int **77**(6): 550-556.
- Benjamini, E. (2000). Immunology : a short course / Eli Benjamini, Richard Coico, Geoffrey Sunshine. - 4th ed.
- Berg, J. M., J. L. Tymoczko, G. J. Gatto jr. und L. Stryer (2018). Erforschung der Proteine und Proteome. Stryer Biochemie. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 79-126.
- Canaud, B., L. Tong, F. Tentori, T. Akiba, A. Karaboyas, B. Gillespie, T. Akizawa, R. L. Pisoni, J. Bommer und F. K. Port (2011). "Clinical practices and outcomes in elderly hemodialysis patients: results from the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS)." Clin J Am Soc Nephrol **6**(7): 1651-1662.
- Carrero, J. J., D. J. de Zager, M. Verduijn, P. Ravani, J. De Meester, J. G. Heaf, P. Finne, A. J. Hoitsma, J. Pascual, F. Jarraya, A. V. Reisaeter, F. Collart, F. W. Dekker und K. J. Jager (2011). "Cardiovascular and noncardiovascular mortality among men and women starting dialysis." Clin J Am Soc Nephrol **6**(7): 1722-1730.
- Carrero, J. J., M. Hecking, N. C. Chesnaye und K. J. Jager (2018). "Sex and gender disparities in the epidemiology and outcomes of chronic kidney disease." Nat Rev Nephrol **14**(3): 151-164.
- Chakraborti, S., M. Mandal, S. Das, A. Mandal und T. Chakraborti (2003). "Regulation of matrix metalloproteinases: an overview." Mol Cell Biochem **253**(1-2): 269-285.
- Cheng, T. C., J. L. Philip, D. M. Tabima, S. Kumari, B. Yakubov, A. L. Frump, T. A. Hacker, A. Bellofiore, R. Li, X. Sun, K. N. Goss, T. Lahm und N. C. Chesler (2020). "Estrogen receptor- α prevents right ventricular diastolic dysfunction and fibrosis in female rats." Am J Physiol Heart Circ Physiol **319**(6): H1459-h1473.
- Cheng, Z., M. H. Limbu, Z. Wang, J. Liu, L. Liu, X. Zhang, P. Chen und B. Liu (2017). "MMP-2 and 9 in Chronic Kidney Disease." Int J Mol Sci **18**(4).
- Cheung, A. K., N. W. Levin, T. Greene, L. Agodoa, J. Bailey, G. Beck, W. Clark, A. S. Levey, J. K. Leypoldt, D. B. Ornt, M. V. Rocco, G. Schulman, S. Schwab, B. Teehan und G. Eknoyan (2003). "Effects of high-flux hemodialysis on clinical outcomes: results of the HEMO study." J Am Soc Nephrol **14**(12): 3251-3263.
- Chou, Y. H., T. S. Chu und S. L. Lin (2018). "Role of renin-angiotensin system in acute kidney injury-chronic kidney disease transition." Nephrology (Carlton) **23 Suppl 4**: 121-125.

- Clark, J. A. und T. C. Peterson (1994). "Cytokine production and aging: overproduction of IL-8 in elderly males in response to lipopolysaccharide." *Mech Ageing Dev* **77**(2): 127-139.
- Clegg, D. J. und F. Mauvais-Jarvis (2018). "An integrated view of sex differences in metabolic physiology and disease." *Mol Metab* **15**: 1-2.
- Cobo, G., M. Hecking, F. K. Port, I. Exner, B. Lindholm, P. Stenvinkel und J. J. Carrero (2016). "Sex and gender differences in chronic kidney disease: progression to end-stage renal disease and haemodialysis." *Clin Sci (Lond)* **130**(14): 1147-1163.
- Colafella, K. M. M. und K. M. Denton (2018). "Sex-specific differences in hypertension and associated cardiovascular disease." *Nat Rev Nephrol* **14**(3): 185-201.
- Collazos, J., V. Asensi, G. Martin, A. H. Montes, T. Suarez-Zarracina und E. Valle-Garay (2015). "The effect of gender and genetic polymorphisms on matrix metalloprotease (MMP) and tissue inhibitor (TIMP) plasma levels in different infectious and non-infectious conditions." *Clin Exp Immunol* **182**(2): 213-219.
- de Sequera, P., E. Corchete, L. Bohorquez, M. Albalade, R. Perez-Garcia, M. Alique, M. Marques, E. García-Menéndez, J. Portolés und R. Ramirez (2017). "Residual Renal Function in Hemodialysis and Inflammation." *Ther Apher Dial* **21**(6): 592-598.
- Doublier, S., E. Lupia, P. Catanuto, S. Periera-Simon, X. Xia, K. Korach, M. Berho, S. J. Elliot und M. Karl (2011). "Testosterone and 17 β -estradiol have opposite effects on podocyte apoptosis that precedes glomerulosclerosis in female estrogen receptor knockout mice." *Kidney Int* **79**(4): 404-413.
- Edwards, R. J., G. W. Taylor, M. Ferguson, S. Murray, N. Rendell, A. Wrigley, Z. Bai, J. Boyle, S. J. Finney, A. Jones, H. H. Russell, C. Turner, J. Cohen, L. Faulkner und S. Sriskandan (2005). "Specific C-terminal cleavage and inactivation of interleukin-8 by invasive disease isolates of *Streptococcus pyogenes*." *J Infect Dis* **192**(5): 783-790.
- Enke, U. (2007). "Geschichte der Medizin: Georg Haas – Pionier der Hämodialyse." *Dtsch Arztebl International* **104**(33): 2252-.
- Fiorentino, M., G. Grandaliano, L. Gesualdo und G. Castellano (2018). "Acute Kidney Injury to Chronic Kidney Disease Transition." *Contrib Nephrol* **193**: 45-54.
- Gerszten, R. E., E. A. Garcia-Zepeda, Y.-C. Lim, M. Yoshida, H. A. Ding, M. A. Gimbrone Jr, A. D. Luster, F. W. Luscinskas und A. Rosenzweig (1999). "MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions." *Nature* **398**: 718.
- Gimbrone, M. A., Jr., M. S. Obin, A. F. Brock, E. A. Luis, P. E. Hass, C. A. Hebert, Y. K. Yip, D. W. Leung, D. G. Lowe, W. J. Kohr und et al. (1989). "Endothelial interleukin-8: a novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions." *Science* **246**(4937): 1601-1603.
- Girndt, M., P. Trocchi, C. Scheidt-Nave, S. Markau und A. Stang (2016). "Prävalenz der eingeschränkten Nierenfunktion." *Dtsch Arztebl International* **113**(6): 85-91.
- Gupta, J., N. Mitra, P. A. Kanetsky, J. Devaney, M. R. Wing, M. Reilly, V. O. Shah, V. S. Balakrishnan, N. J. Guzman, M. Girndt, B. G. Periera, H. I. Feldman, J. W. Kusek, M. M. Joffe und D. S. Raj (2012). "Association between albuminuria, kidney function, and inflammatory biomarker profile in CKD in CRIC." *Clin J Am Soc Nephrol* **7**(12): 1938-1946.
- Hamano, K., H. Gohra, H. Noda, T. Katoh, Y. Fujimura, N. Zempo und K. Esato (1998). "Increased serum interleukin-8: correlation with poor prognosis in patients with postoperative multiple organ failure." *World J Surg* **22**(10): 1077-1081.
- Harada, A., N. Mukaida und K. Matsushima (1996). "Interleukin 8 as a novel target for intervention therapy in acute inflammatory diseases." *Mol Med Today* **2**(11): 482-489.
- Harada, A., N. Sekido, T. Akahoshi, T. Wada, N. Mukaida und K. Matsushima (1994). "Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation." *J Leukoc Biol* **56**(5): 559-564.
- Hebert, C. A., F. W. Luscinskas, J. M. Kiely, E. A. Luis, W. C. Darbonne, G. L. Bennett, C. C. Liu, M. S. Obin, M. A. Gimbrone, Jr. und J. B. Baker (1990). "Endothelial and leukocyte forms of IL-8. Conversion by thrombin and interactions with neutrophils." *J Immunol* **145**(9): 3033-3040.
- Hecking, M., B. A. Bieber, J. Ethier, A. Kautzky-Willer, G. Sunder-Plassmann, M. D. Saemann, S. P. Ramirez, B. W. Gillespie, R. L. Pisoni, B. M. Robinson und F. K. Port (2014). "Sex-specific differences in hemodialysis prevalence and practices and the male-to-female mortality rate: the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS)." *PLoS Med* **11**(10): e1001750.

- Hill, N. R., S. T. Fatoba, J. L. Oke, J. A. Hirst, C. A. O'Callaghan, D. S. Lasserson und F. D. Hobbs (2016). "Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis." PLoS One **11**(7): e0158765.
- Hoch, R. C., I. U. Schraufstatter und C. G. Cochrane (1996). "In vivo, in vitro, and molecular aspects of interleukin-8 and the interleukin-8 receptors." J Lab Clin Med **128**(2): 134-145.
- Horcher, M., A. Rot, H. Aschauer und J. Besemer (1998). "IL-8 derivatives with a reduced potential to form homodimers are fully active in vitro and in vivo." Cytokine **10**(1): 1-12.
- Horl, W. H. (2002). "Hemodialysis membranes: interleukins, biocompatibility, and middle molecules." J Am Soc Nephrol **13 Suppl 1**: S62-71.
- Inker, L. A., B. C. Astor, C. H. Fox, T. Isakova, J. P. Lash, C. A. Peralta, M. Kurella Tamura und H. I. Feldman (2014). "KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of CKD." Am J Kidney Dis **63**(5): 713-735.
- Jindal, R. M., J. J. Ryan, I. Sajjad, M. H. Murthy und L. S. Baines (2005). "Kidney transplantation and gender disparity." Am J Nephrol **25**(5): 474-483.
- Kirsch, A. H., A. R. Rosenkranz, R. Lyko und D. H. Krieter (2017). "Effects of Hemodialysis Therapy Using Dialyzers with Medium Cut-Off Membranes on Middle Molecules." Contrib Nephrol **191**: 158-167.
- Kramer, A., M. Pippias, M. Noordzij, V. S. Stel, A. M. Andrushev, M. I. Aparicio-Madre, F. E. Arribas Monzón, A. Åsberg, M. Barbullushi, P. Beltrán, M. Bonthuis, F. J. Caskey, P. Castro de la Nuez, H. Cernevskis, J. De Meester, P. Finne, E. Golan, J. G. Heaf, M. H. Hemmeler, K. Ioannou, N. Kantaria, K. Komissarov, G. Korejwo, R. Kramar, M. Lassalle, F. Lopot, F. Macário, B. Mackinnon, R. Pálsson, Ü. Pechter, V. C. Piñera, C. Santiuste de Pablos, A. Segarra-Medrano, N. Seyahi, M. F. Slon Roblero, O. Stojceva-Taneva, E. Vazlov, R. Winzeler, E. Ziginiskiene, Z. Massy und K. J. Jager (2019). "The European Renal Association - European Dialysis and Transplant Association (ERA-EDTA) Registry Annual Report 2016: a summary." Clin Kidney J **12**(5): 702-720.
- Lahdentausta, L., J. Leskela, A. Winkelmann, T. Tervahartiala, T. Sorsa, E. Pesonen und P. J. Pussinen (2018). "Serum MMP-9 Diagnostics, Prognostics, and Activation in Acute Coronary Syndrome and Its Recurrence." J Cardiovasc Transl Res **11**(3): 210-220.
- Lameire, N., W. Van Biesen und R. Vanholder (2009). "Did 20 years of technological innovations in hemodialysis contribute to better patient outcomes?" Clin J Am Soc Nephrol **4 Suppl 1**: S30-40.
- Larsen, C. G., A. O. Anderson, E. Appella, J. J. Oppenheim und K. Matsushima (1989). "The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes." Science **243**(4897): 1464-1466.
- Lazennec, G. und A. Richmond (2010). "Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation." Trends Mol Med **16**(3): 133-144.
- Lindgren, A., E. Fjellstedt und A. Christensson (2020). "Comparison of Hemodialysis Using a Medium Cutoff Dialyzer versus Hemodiafiltration: A Controlled Cross-Over Study." Int J Nephrol Renovasc Dis **13**: 273-280.
- Liu, C. J., F. C. Kuo, C. L. Wang, C. H. Kuo, S. S. Wang, C. Y. Chen, Y. B. Huang, K. H. Cheng, K. K. Yokoyama, C. L. Chen, C. Y. Lu und D. C. Wu (2016). "Suppression of IL-8-Src signalling axis by 17beta-estradiol inhibits human mesenchymal stem cells-mediated gastric cancer invasion." J Cell Mol Med **20**(5): 962-972.
- Locatelli, F., B. Canaud, K. U. Eckardt, P. Stenvinkel, C. Wanner und C. Zoccali (2003). "Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome." Nephrol Dial Transplant **18**(7): 1272-1280.
- Locatelli, F., A. Martin-Malo, T. Hannedouche, A. Loureiro, M. Papadimitriou, V. Wizemann, S. H. Jacobson, S. Czekalski, C. Ronco und R. Vanholder (2009). "Effect of membrane permeability on survival of hemodialysis patients." J Am Soc Nephrol **20**(3): 645-654.
- Luster, A. D. (1998). "Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation." N Engl J Med **338**(7): 436-445.
- Ma, L. und S. Zhao (2017). "Risk factors for mortality in patients undergoing hemodialysis: A systematic review and meta-analysis." Int J Cardiol **238**: 151-158.
- Maheshwari, A. (2009). "Developmental Changes in Circulating IL-8/CXCL8 isoforms in Neonates." Cytokine **46**(1): 12-16.

- Mahmoodzadeh, S., E. Dworatzek, S. Fritschka, T. H. Pham und V. Regitz-Zagrosek (2010). "17beta-Estradiol inhibits matrix metalloproteinase-2 transcription via MAP kinase in fibroblasts." Cardiovasc Res **85**(4): 719-728.
- Malemud, C. J. (2006). "Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview." Front Biosci **11**: 1696-1701.
- Massy, Z. A., P. Stenvinkel und T. B. Drueke (2009). "The role of oxidative stress in chronic kidney disease." Semin Dial **22**(4): 405-408.
- Merino, A., S. Nogueras, P. Buendía, R. Ojeda, J. Carracedo, R. Ramirez-Chamond, A. Martin-Malo und P. Aljama (2008). "Microinflammation and endothelial damage in hemodialysis." Contrib Nephrol **161**: 83-88.
- Merker, L., T. Ebert, M. Guthoff, M. Schlosser, C. Hasslacher und G. Wolf (2019). "Nephropathie bei Diabetes." Der Diabetologe **15**(6): 568-572.
- Mitsides, N., T. Cornelis, N. J. H. Broers, N. M. P. Diederens, P. Brenchley, F. M. van der Sande, C. G. Schalkwijk, J. P. Kooman und S. Mitra (2017). "Extracellular overhydration linked with endothelial dysfunction in the context of inflammation in haemodialysis dependent chronic kidney disease." PLoS One **12**(8): e0183281.
- Mitsides, N., D. F. Keane, E. Lindley und S. Mitra (2014). "Technology innovation for patients with kidney disease." J Med Eng Technol **39**(7): 424-433.
- Mortier, A., J. Van Damme und P. Proost (2008). "Regulation of chemokine activity by posttranslational modification." Pharmacol Ther **120**(2): 197-217.
- Msaad, R., R. Essadik, K. Mohtadi, H. Meftah, H. Lebrazi, H. Taki, A. Kettani, G. Madkouri, B. Ramdani und R. Saïle (2019). "Predictors of mortality in hemodialysis patients." Pan Afr Med J **33**: 61.
- Neiryneck, N., G. Glorieux, E. Schepers, A. Dhondt, F. Verbeke und R. Vanholder (2015). "Pro-inflammatory cytokines and leukocyte oxidative burst in chronic kidney disease: culprits or innocent bystanders?" Nephrol Dial Transplant **30**(6): 943-951.
- Ngo, S. T., F. J. Steyn und P. A. McCombe (2014). "Gender differences in autoimmune disease." Front Neuroendocrinol **35**(3): 347-369.
- Nissinen, L. und V. M. Kahari (2014). "Matrix metalloproteinases in inflammation." Biochim Biophys Acta **1840**(8): 2571-2580.
- Nitsch, D., M. Grams, Y. Sang, C. Black, M. Cirillo, O. Djurdjev, K. Iseki, S. K. Jassal, H. Kimm, F. Kronenberg, C. M. Oien, A. S. Levey, A. Levin, M. Woodward und B. R. Hemmelgarn (2013). "Associations of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with mortality and renal failure by sex: a meta-analysis." Bmj **346**: f324.
- Nourshargh, S., J. A. Perkins, H. J. Showell, K. Matsushima, T. J. Williams und P. D. Collins (1992). "A comparative study of the neutrophil stimulatory activity in vitro and pro-inflammatory properties in vivo of 72 amino acid and 77 amino acid IL-8." The Journal of Immunology **148**(1): 106-111.
- Onofriescu, M., D. Siroopol, L. Voroneanu, S. Hogas, I. Nistor, M. Apetrii, L. Florea, G. Veisa, I. Mititiuc, M. Kanbay, R. Sascau und A. Covic (2015). "Overhydration, Cardiac Function and Survival in Hemodialysis Patients." PLoS One **10**(8): e0135691.
- Packard, R. R. und P. Libby (2008). "Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction." Clin Chem **54**(1): 24-38.
- Padrines, M., M. Wolf, A. Walz und M. Baggiolini (1994). "Interleukin-8 processing by neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase-3." FEBS Lett **352**(2): 231-235.
- Panichi, V., D. Taccola, G. M. Rizza, C. Consani, L. Ghiadoni, C. Filippi, R. Cristofani, E. Panicucci, M. Migliori, A. Sidoti, M. Biagioli, D. Boracelli, G. Barsotti und C. Tetta (2006). "Interleukin-8 is a powerful prognostic predictor of all-cause and cardiovascular mortality in dialytic patients." Nephron Clin Pract **102**(2): c51-58.
- Parks, W. C., C. L. Wilson und Y. S. Lopez-Boado (2004). "Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity." Nat Rev Immunol **4**(8): 617-629.
- Patten, R. D. (2007). "Models of Gender Differences in Cardiovascular Disease." Drug Discov Today Dis Models **4**(4): 227-232.
- Peppin, G. J. und S. J. Weiss (1986). "Activation of the endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils." Proceedings of the National Academy of Sciences **83**(12): 4322-4326.

- Pioli, P. A., A. L. Jensen, L. K. Weaver, E. Amiel, Z. Shen, L. Shen, C. R. Wira und P. M. Guyre (2007). "Estradiol attenuates lipopolysaccharide-induced CXC chemokine ligand 8 production by human peripheral blood monocytes." *J Immunol* **179**(9): 6284-6290.
- Regitz-Zagrosek, V. und G. Kararigas (2017). "Mechanistic Pathways of Sex Differences in Cardiovascular Disease." *Physiol Rev* **97**(1): 1-37.
- Ribeiro, V., B. Bosquetti, S. M. Goncalves, S. G. Bucharles, L. Rempel, R. A. Maciel, R. B. de Oliveira, R. Pecoits-Filho und A. E. Stinghen (2014). "Uremic serum inhibits in vitro expression of chemokine SDF-1: impact of uremic toxicity on endothelial injury." *J Bras Nefrol* **36**(2): 123-131.
- Ronco, C. (2017). "The Rise of Expanded Hemodialysis." *Blood Purif* **44**(2): I-viii.
- Ronco, C. und W. R. Clark (2018). "Haemodialysis membranes." *Nat Rev Nephrol* **14**(6): 394-410.
- Ronco, C. und G. La Manna (2017). "Expanded Hemodialysis: A New Therapy for a New Class of Membranes." *Contrib Nephrol* **190**: 124-133.
- Rosenkilde, M. M. und T. W. Schwartz (2004). "The chemokine system -- a major regulator of angiogenesis in health and disease." *Apmis* **112**(7-8): 481-495.
- Rota-Musoll, L., S. Brigidi, E. Molina-Robles, E. Oriol-Vila, L. Perez-Oller und M. Subirana-Casacuberta (2021). "An intersectional gender analysis in kidney transplantation: women who donate a kidney." *BMC Nephrol* **22**(1): 59.
- Samnegard, A., J. Hulthe, A. Silveira, C. G. Ericsson, A. Hamsten und P. Eriksson (2009). "Gender specific associations between matrix metalloproteinases and inflammatory markers in post myocardial infarction patients." *Atherosclerosis* **202**(2): 550-556.
- Sarnak, M. J. und A. S. Levey (2000). "Cardiovascular disease and chronic renal disease: a new paradigm." *Am J Kidney Dis* **35**(4 Suppl 1): S117-131.
- Schmaderer, C., S. Tholen, A. L. Hasenau, C. Hauser, Y. Suttman, S. Wassertheurer, C. C. Mayer, A. Bauer, K. D. Rizas, S. Kemmner, K. Kotliar, B. Haller, J. Mann, L. Renders, U. Heemann und M. Baumann (2016). "Rationale and study design of the prospective, longitudinal, observational cohort study "rISK strATification in end-stage renal disease" (ISAR) study." *BMC Nephrol* **17**(1): 161.
- Schroder, J. M., M. Sticherling, H. H. Henneicke, W. C. Preissner und E. Christophers (1990). "IL-1 alpha or tumor necrosis factor-alpha stimulate release of three NAP-1/IL-8-related neutrophil chemotactic proteins in human dermal fibroblasts." *J Immunol* **144**(6): 2223-2232.
- Segerer, K. und C. Wanner (2014). *Chronische Niereninsuffizienz (CNI) und Begleiterkrankungen. Niere und Ableitende Harnwege*. J. Steffel and T. Luescher. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 41-50.
- Steffen Geberth, R. N. (2014). *Praxis der Dialyse*, Springer Verlag S. 8-19.
- Stenvinkel, P., C. Wanner, T. Metzger, O. Heimbürger, F. Mallamaci, G. Tripepi, L. Malatino und C. Zoccali (2002). "Inflammation and outcome in end-stage renal failure: does female gender constitute a survival advantage?" *Kidney Int* **62**(5): 1791-1798.
- Stinghen, A. E., S. M. Goncalves, E. G. Martines, L. S. Nakao, M. C. Riella, C. A. Aita und R. Pecoits-Filho (2009). "Increased plasma and endothelial cell expression of chemokines and adhesion molecules in chronic kidney disease." *Nephron Clin Pract* **111**(2): c117-126.
- Stringer, K. D., R. Komers, S. A. Osman, T. T. Oyama, J. N. Lindsley und S. Anderson (2005). "Gender hormones and the progression of experimental polycystic kidney disease." *Kidney Int* **68**(4): 1729-1739.
- Tsirpanlis, G., P. Bagos, D. Ioannou, A. Bleta, I. Marinou, A. Lagouranis, S. Chatzipanagiotou und C. Nicolaou (2004). "Exploring inflammation in hemodialysis patients: persistent and superimposed inflammation. A longitudinal study." *Kidney Blood Press Res* **27**(2): 63-70.
- Turner, C. E., P. Kurupati, M. D. Jones, R. J. Edwards und S. Sriskandan (2009). "Emerging role of the interleukin-8 cleaving enzyme SpyCEP in clinical Streptococcus pyogenes infection." *J Infect Dis* **200**(4): 555-563.
- Van Biesen, W., R. Vanholder, E. Schepers, G. Glorieux, A. Dhondt und S. Eloit (2017). "The Place of Large Pore Membranes in the Treatment Portfolio of Patients on Hemodialysis." *Contrib Nephrol* **191**: 168-177.

- Van den Steen, P. E., P. Proost, A. Wuyts, J. Van Damme und G. Opdenakker (2000). "Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact." Blood **96**(8): 2673-2681.
- Van Wart, H. E. und H. Birkedal-Hansen (1990). "The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(14): 5578-5582.
- Villar, E., L. Remontet, M. Labeeuw und R. Ecochard (2007). "Effect of age, gender, and diabetes on excess death in end-stage renal failure." J Am Soc Nephrol **18**(7): 2125-2134.
- Visse, R. und H. Nagase (2003). "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry." Circ Res **92**(8): 827-839.
- Vongsanim, S. und A. Davenport (2019). "The effect of gender on survival for hemodialysis patients: Why don't women live longer than men?" Semin Dial **32**(5): 438-443.
- Walz, A., P. Peveri, H. Aschauer und M. Baggiolini (1987). "Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes." Biochem Biophys Res Commun **149**(2): 755-761.
- Waugh, D. J. und C. Wilson (2008). "The interleukin-8 pathway in cancer." Clin Cancer Res **14**(21): 6735-6741.
- Webster, A. C., E. V. Nagler, R. L. Morton und P. Masson (2017). "Chronic Kidney Disease." Lancet **389**(10075): 1238-1252.
- Wiles, K. S., C. Nelson-Piercy und K. Bramham (2018). "Reproductive health and pregnancy in women with chronic kidney disease." Nat Rev Nephrol **14**(3): 165-184.
- Willy, K., M. Hulko, M. Storr, R. Speidel, J. Gauss, R. Schindler und D. Zickler (2017). "In Vitro Dialysis of Cytokine-Rich Plasma With High and Medium Cut-Off Membranes Reduces Its Procalcific Activity." Artif Organs **41**(9): 803-809.
- Wizemann, V. und J. Benedum (1994). "Nephrology dialysis transplantation 70th anniversary of haemodialysis--the pioneering contribution of Georg Haas (1886-1971)." Nephrol Dial Transplant **9**(12): 1829-1831.
- Yoshimura, T., K. Matsushima, S. Tanaka, E. A. Robinson, E. Appella, J. J. Oppenheim und E. J. Leonard (1987). "Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(24): 9233-9237.
- Zaza, G., P. Pontrelli, G. Pertosa, S. Granata, M. Rossini, S. Porreca, F. J. Staal, L. Gesualdo, G. Grandaliano und F. P. Schena (2008). "Dialysis-related systemic microinflammation is associated with specific genomic patterns." Nephrol Dial Transplant **23**(5): 1673-1681.
- Zhai, J., J. Shen, G. Xie, J. Wu, M. He, L. Gao, Y. Zhang, X. Yao und L. Shen (2019). "Cancer-associated fibroblasts-derived IL-8 mediates resistance to cisplatin in human gastric cancer." Cancer Lett **454**: 37-43.
- Zickler, D., R. Schindler, K. Willy, P. Martus, M. Pawlak, M. Storr, M. Hulko, T. Boehler, M. A. Glomb, K. Liehr, C. Henning, M. Templin, B. Trojanowicz, C. Ulrich, K. Werner, R. Fiedler und M. Girndt (2017). "Medium Cut-Off (MCO) Membranes Reduce Inflammation in Chronic Dialysis Patients-A Randomized Controlled Clinical Trial." PLoS One **12**(1): e0169024.
- Zimmermann, J., S. Herrlinger, A. Pruy, T. Metzger und C. Wanner (1999). "Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients." Kidney Int **55**(2): 648-658.
- Zlotnik, A. und O. Yoshie (2000). "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." Immunity **12**(2): 121-127.

8. Abkürzungsverzeichnis

CKD	Chronic kidney disease
eGFR	geschätzte glomeruläre Filtrationsrate
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcome
ESKD	end stage kidney disease
NFK	national kidney foundation
KODQI	Kidney Disease outcomes quality initiative
HD	Hämodialyse
HF	Hämofiltration
HDF	Hämodiafiltration
MCO	medium cut off Dialysemembran
CVD	Kardiovaskuläre Erkrankung
IL	Interleukin
hs-CRP	hoch sensitives C-reaktives Protein
IP-10	Interferon γ induziertes Protein 10 (CXCL 10)
MCP-1	Monozyten-chemotaktisches Protein 1
TNF	Tumor Nekrose Faktor
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
PBMC	periphere mononukleäre Zellen des Blutes
CPT	Cell Preparation Tube
DPBS	Dulbeccos Phosphate- buffered saline
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme linked Immunosorbant Assay
BSA	Bovines Serum Albumin
WB	Westernblot
DTT	Dithiothreitol
FACS	„fluorescence activated cell sorting“, Durchflusszytometrie
RNA	Ribonukleinsäure
PCR	Polymerase- Kettenreaktion
SUP	„supernatant“ – Überstand der Zellkultur

9. Abbildungsverzeichnis

Tabellen

Tabelle 1	Laborgerätschaften
Tabelle 2	Einwegmaterialien
Tabelle 3	Kits
Tabelle 4	Chemikalien, Reagenzien, Medien, Liganden
Tabelle 5	Pufferzusammensetzung
Tabelle 6	PCR
Tabelle 7	Antikörper für Westernblot, Durchflusszytometrie

Abbildungen

Abb.1	: Klassifikation der CKD nach KDIGO
Abb.2	: Prävalenz der CKD ab G3-G5 nach Geschlecht und Land
Abb.3	: Ätiologie der chronische Niereninsuffizienz
Abb.4	: Charakteristika Dialysemembranen
Abb.5	: Intrazelluläre Signalwege Interleukin 8
Abb.6	: Aufbau Matrixmetalloproteinasen
Abb.7	: Aktivierung von proMMP
Abb.8	: CPT Röhrchen zur PBMC Isolierung
Abb.9	: ELISA Technik
Abb.10	: Westernblot/Minitransblot
Abb. 11	: Schematische Darstellung Bead Array Essay
Abb. 12	: Migrationskammern uni und bidirektional
Abb. 13	: Geschlechterspezifische Unterschiede nach IL-8 Stimulation in junger gesunder Vergleichsgruppe
Abb. 14	: Geschlechterspezifische Unterschiede nach IL-8 Stimulation in HD-Patienten
Abb. 15	: Zytokinproduktion durch Stimulation mit IL-8 im Vergleich zu IL-6 und LPS In HD-Patienten
Abb. 16	: Geschlechterabhängige IL-8 Expression in HD-Patienten
Abb. 17	: Zellaktivierung in junger gesunder Kontrollgruppe durch HD Plasma und Überstände der Zellkultur Stimulation

Abb. 18 : MMP-9 und MMP-2 in HD- Patienten über langen Stimulationszeitraum

Abb. 19 : MMP-8 und MMP-1 in HD-Patienten nach IL-8 und LPS Stimulation

Abb. 20 : Undirektionale Migration der PBMCs von HD-Patienten

Abb. 21 : Bidirektionale Migration der PBMC eines jungen gesunden Mannes in Richtung des inflammatorischen HD Milieu nach IL-8 Stimulation

Abb. 22 : geschlechterabhängige IL-8 Spaltung in HD-Patienten

Abb. 23 : ISAR Kohorte- IL-8 korreliert mit Mortalität in HD-Patienten

Abb. 24 : Studiendesign MCO Studie

Abb. 25 : MCO Studie- IL-8 Modulation durch MCO Filter

10. Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Christoph Schmaderer für seine Organisation der MCO- Filterstudie, die Betreuung und Supervision während deren Durchführung und über die Zeit im Labor danken.

Vielen Dank für das gute Verhältnis und deine Unterstützung, Erfahrung und Expertise.

Meinem Betreuer Georg Lorenz gilt der besondere Dank für die lehrreiche Zeit im Labor, Einarbeitung in unterschiedlichste Methoden und Einführung in die Wissenschaft. Deine Ideen, Genie und Wahnsinn haben die Durchführung und Verwirklichung dieser Arbeit maßgeblich beeinflusst und überhaupt erst möglich gemacht.

Auch dem Team im Nephrologischen Labor Klinikum Rechts der Isar – Alina Schmidt, Sandra Harderer und Javier Carbajo welche mir mit Erfahrung, wertvollem Rat, sowie kreativen Ideen zur Seite standen, möchte ich danken.

Mitgehangen-Mitgefangen: Dank und tiefe Verbundenheit gilt meinen Mitdotorandinnen Joanna Cardoso, Marie Eckermann und Sophia Hornung – auch wenn Probenaquise und -transport die ein oder andere Herausforderung war, haben wir diese schlussendlich ohne größere Katastrophen gemeistert – am Ende wurde dann doch noch alles gut!

Zuletzt möchte ich auch meinen Eltern, Großeltern und meinem lieben Bruder für die stetige Unterstützung und das Durchhaltevermögen bis zur Fertigstellung dieser Arbeit herzlichst danken.