

Einfluss von Hypervolämie auf IL-10-Aktivierung bei Hämodialysepatienten

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Zahnmedizin (Dr.med.dent.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Eva Herberger

Betreuer: PD Dr.med. Roman Fiedler

Gutachter: 1. Prof. Dr. Jonas Rosendahl, Halle (Saale)

2. Prof. Dr. Peter Mertens, Magdeburg

Datum der Verteidigung: 14.10.2024

Meinen Eltern gewidmet.

Referat

Die dauerhafte Überwässerung von Hämodialysepatienten mit ihren negativen Folgen auf kardialer und entzündlicher Ebene sowie der resultierenden erhöhten Mortalität wurde bereits vielfach untersucht. Vielfältige Ursachen kommen für das Vorliegen erhöhter Entzündungsparameter unter diesen Bedingungen in Frage. So wurden beispielsweise bereits Hinweise auf eine mögliche Deregulierung von Interleukin-10 nachgewiesen. Dieses Zytokin, welches vor allem von Immunzellen sezerniert wird, besitzt die Fähigkeit, eine Vielzahl antiinflammatorischer Signalwege auszulösen und hat damit eine hohe Bedeutung für die Homöostase von Immunreaktionen und das Eindämmen überschießender Inflammation. In der vorliegenden Querschnittsstudie wurde nach Ursachen der IL-10-Deregulation mit einem Hauptaugenmerk auf eine mögliche translationale Hemmung geforscht. Hierzu wurden 40 Hämodialysepatienten rekrutiert, mittels Bioimpedanzmessung in hypervoläm und normovoläm eingeteilt und deren Blutproben mittels biomolekularer Verfahren analysiert. Hierbei zeigte sich in der Gruppe der überwässerten Patienten, neben erhöhten CRP-Werten, eine Hochregulation der IL-10 mRNA, jedoch kein korrespondierender Anstieg des IL-10-Proteins. Dies lässt auf eine Hemmung der IL-10-Produktion auf posttranskriptioneller Ebene schließen. Im weiteren Verlauf konnte festgestellt werden, dass die Expression der microRNA-142-3p in der Gruppe der überwässerten Patienten signifikant hochreguliert war. Somit ist zu vermuten, dass diese microRNA die Translation der IL-10 mRNA negativ beeinflussen könnte. Dadurch wären in dieser Gruppe adäquate antiinflammatorische Gegenregulationen mittels IL-10 zur Eindämmung entzündlicher Vorgänge, wie sie unter Hämodialysepatienten vermehrt auftreten, nur eingeschränkt möglich und würden die erhöhten Entzündungsmarker erklären. Diese begründete Vermutung sollte mit weiterführenden Transfektionsexperimenten zusätzlich bestätigt werden. Weiterhin konnte an Position 727 des Transkriptionsfaktors STAT3 ein vermindertes Vorliegen der Serinphosphorylierung in der Gruppe der überwässerten Patienten nachgewiesen werden. Ob dies direkt durch die verminderte IL-10-Expression bedingt ist und resultierend zu einer verminderten Aktivität dieses Transkriptionsfaktors führt, welcher stark in die Vermittlung IL-10-bedingter Effekte integriert ist, lässt sich aktuell nur hypothetisieren und sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Herberger, Eva: Einfluss von Hypervolämie auf IL-10-Aktivierung bei Hämodialysepatienten, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 64 Seiten, 2024

Inhaltsverzeichnis

Referat

Abkürzungsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Die chronische Nierenerkrankung	1
1.1.1.	Symptome	1
1.1.2.	Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie	1
1.2.	Hämodialyse	2
1.2.1.	Kt/ V _{urea}	2
1.2.2.	Die Ultrafiltration	2
1.2.3.	Regulation des Flüssigkeitshaushaltes bei Dialyse	2
1.3.	Hypervolämie	4
1.3.1.	Hypervolämie und kardiale Risiken	4
1.3.2.	Hypervolämie und erhöhte Entzündungsmarker	4
1.3.2.1.	Endotoxämie als mögliche Ursache für erhöhte Entzündungswerte	5
1.4.	Relevanz von IL-10 bei Hämodialysepatienten	5
1.5.	Hypervolämie und IL-10	7
1.6.	Regulation der IL-10-Produktion	7
1.6.1.	Transkriptionelle Regulation	7
1.6.2.	Posttranskriptionelle Regulation	8
1.6.2.1.	Micro-RNAs	8
1.6.2.2.	IL-10-regulierende microRNAs	8
1.6.2.3.	miR-142	9
2.	Zielstellung	11
3.	Material und Methoden	12
3.1.	Material	12
3.2.	Methoden	12
3.2.1.	Klinischer Teil	12
3.2.2.	Experimenteller Teil	13
3.2.3.	Statistische Methoden	27
4.	Ergebnisse	28
4.1.	Charakterisierung der Probanden	28
4.1.1.	Gruppenverteilung anhand des Flüssigkeitsstatus	28
4.1.2.	Wesentliche Patientencharakteristika	28
4.2.	Basale IL-10 mRNA-Expression in Vollblut und PBMCs	31

4.3.	IL-10-Proteinexpression in Serum und PBMCs	32
4.3.1.	Basale IL-10-Serumwerte	32
4.3.2.	Basale und stimulierte monozytäre IL-10-Produktion	32
4.3.3.	Basale und stimulierte lymphozytäre IL-10-Produktion	34
4.4.	Übersichtsgraphiken über die stimulationsbedingten Veränderungen der IL-10 mRNA-Expression in PBMCs beider Gruppen.....	35
4.5.	STAT3, ein wichtiger Transkriptionsfaktor beim IL-10 Signaling.....	36
4.5.1.	Frequenz und Expression von CD86-STAT3 (P705)-positiven Monozyten unter basalen und stimulatorischen Bedingungen	36
4.5.2.	Frequenz und Expression von CD86-STAT3 (P727)-positiven Monozyten unter basalen und stimulatorischen Bedingungen	37
4.5.3.	Übersichtsgraphiken über die stimulationsbedingten Veränderungen von monozytärem STAT3 (P727) in beiden Einzelkollektiven.....	38
4.6.	miR-142-3p-Expression in PBMCs unter basalen und stimulatorischen Bedingungen	38
4.7.	miR-142-5p-Expression in PBMCs unter basalen und stimulatorischen Bedingungen	40
5.	Diskussion.....	41
5.1.	Patientencharakteristika	41
5.2.	IL-10-Analyse	42
5.2.1.	Basale IL-10 mRNA-Expression.....	42
5.2.2.	Stimulierte IL-10 mRNA-Expression und IL-10-Proteinexpression in Serum und PBMCs.....	43
5.3.	STAT3-Expression	44
5.4.	miR-142-Analyse	47
5.5.	Einschränkungen	51
6.	Zusammenfassung	52
7.	Literaturverzeichnis.....	54
8.	Thesen	64
9.	Anhang	
9.1.	Material	
9.2.	Eidesstattliche Erklärung	
9.3.	Erklärung über frühere Promotionsversuche	
9.4.	Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
7-AAD	7 – Aminoactinomycin D
AC9	Adenylatcyclase 9
ADPKD	autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung
AhR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
AhR-A	AhR-Antagonist
Akt	Proteinkinase B
AMPK	Adenosin 5'-Monophosphat-aktivierte Protein-Kinase
AMPK α 1	katalytische Untereinheit von AMPK
APC	Allophycocyanin
BCM	Body cell mass
BMI	Body-Mass-Index
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
bpm	beats per minute
BV421	Brilliant Violet 421 Dye
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD4+ DCs	CD4-positive dendritische Zellen
CD4+-T-Zellen	CD4-positive T-Zellen
CD8+-T-Zellen	CD8-positive T-Zellen
cDNA	complementary DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives Protein
CD	cluster of differentiation
CSF1	Kolonie-stimulierender Faktor 1
DC	Dendritische Zellen
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
dsDNA	doppelsträngige DNA
ECW	extracellular water
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eF450	eFluor™ 450
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERK	extracellular-signal regulated kinases
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FBS	fötales bovines Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FSC	forward scatter im FACS
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GNRI	geriatric nutritional risk index
HD	Hämodialyse
HDL	High Density Lipoprotein
HSA	humanes Serumalbumin
ICW	Intracellular water
IgG1	Immunglobulin G1
IL-6	Interleukin 6
IL-10	Interleukin 10
JAK	Januskinase

KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
KfH	Kuratorium für Dialyse und Nierentransplantation e.V.
KIM II	Klinik für Innere Medizin II
KO	Kontrolle
Kt/V	Formel aus K = Harnstoffclearance, t = Dialysezeit, V = Harnstoffverteilungsvolumen
LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
M1-Makrophagen, M1	Makrophagen des proinflammatorischen Phänotyps 1
M2-Makrophagen, M2	Makrophagen des antiinflammatorischen Phänotyps 2
MAP	mean arterial pressure (mittlerer arterieller Druck)
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
mRNA	messenger RNA
miRNA/miR	micro RNA
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC1	mTOR-Komplex 1
mTORC2	mTOR-Komplex 2
NT-proBNP	n-terminales pro BNP
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PeCy5	Phycoerythrin-Cyanin 5
PeCy7	Phycoerythrin-Cyanin 7
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
rpm	rotation per minute
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Zellkulturmedium, benannt nach dem Roswell Park Memorial Institute
RR	Blutdruck
RT	Raumtemperatur
SAP	Signaling lymphocytic activation molecule-associated protein
Ser727	an Position 727 befindlicher Serinrest im STAT3-Molekül
SSC	Side scatter im FACS
STAT3	Transkriptionsfaktor, Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TGF- β	Transforming growth factor- β
TLR	Toll-like Receptor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TYK2	Tyrosinkinase 2
Tyr705	an Position 705 befindlicher Tyrosinrest im STAT3-Molekül
UF	Ultrafiltrationsrate
UTR	untranslatierte Region
Z.n.	Zustand nach

1. Einleitung

1.1. Die chronische Nierenerkrankung

Die chronische Niereninsuffizienz ist charakterisiert durch eine Nierenfunktionsabnahme mit unterschiedlichen Strukturveränderungen an der Niere, je nach vorliegender renaler Grunderkrankung. Sie ist klinisch signifikant, wenn die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) für 3 Monate unter $60\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ Körperoberfläche (KÖF) liegt und/oder eine Albuminurie über $30\text{mg}/\text{g}$ Kreatinin besteht (Ammirati A.L., 2020). Mit einer Prävalenz von 2,3% in den Jahren 2008-2011 waren in Deutschland etwa 2 Millionen der 18-79-Jährigen von einer chronischen Nierenerkrankung betroffen. Die wesentlichen Auslöser für diese Erkrankung waren Diabetes mellitus, der das Risiko um das 2,25-fache erhöhte, sowie das Vorliegen einer arteriellen Hypertonie, welches eine Risikosteigerung um das etwa 3,5-fache bewirkte (Girndt M. et al., 2016). Weiterhin können Nierenerkrankungen unter anderem durch Glomerulonephritis, Pyelonephritis, die Einnahme nephrotoxischer Medikamente, das Vorliegen von Autoimmunerkrankungen oder angeborenen Nieren- und Harnwegsfehlbildungen bedingt sein. Auch ein prolongiertes akutes Nierenversagen kann in eine chronische Nierenfunktionsstörung übergehen.

Entsprechend der KDIGO ist seit 2013 eine Stadieneinteilung anhand der GFR und der Albuminurie möglich (Levin A. et al., 2013). Hierbei unterscheidet man die Stadien G1-G5 bzw. A1-A3.

1.1.1. Symptome

Oft zeigen sich betroffene Patienten lange Zeit asymptomatisch. Erst in fortgeschrittenen Stadien werden Elektrolytverschiebungen, Zeichen einer Überwässerung in Form von Lungen- oder Beinödemen und Symptome durch die Akkumulation harnpflichtiger Substanzen, sogenannter Urämietoxine, sichtbar, darunter Erbrechen, Übelkeit, Appetitlosigkeit und Fatigue (Chen T.K. et al., 2019).

1.1.2. Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie

Ab welchem Punkt eine Nierenersatztherapie eingeleitet werden sollte, ist nicht allein anhand der GFR ableitbar, sondern sollte symptom- und patientenspezifisch entschieden werden. Einzig schwere Erkrankungsbilder wie durch Urämie ausgelöste Perikarditis, Enzephalopathie oder Pleuritis stellen eine dringende Indikation dar (Chen T.K. et al., 2019). Bezüglich der GFR sollte bei einem Wert unter $20\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ KÖF eine Nierenersatztherapie in regelmäßigen Abständen hinterfragt werden (Ammirati A.L., 2020).

1.2. Hämodialyse

Die Hämodialyse stellt neben der Nierentransplantation und der Peritonealdialyse ein mögliches Nierenersatzverfahren dar (Chen T.K. et al., 2019). Sie beruht auf den Prinzipien der Diffusion und Osmose an einer künstlichen Membran (Ultrafiltration) und dient der Reinigung des Blutes von urämischen Stoffwechselmetaboliten, der Normalisierung des Säure-Base- und Elektrolythaushaltes sowie der Reduktion überschüssigen Wassers. Hierzu wird das Blut des Patienten im Gegenstromprinzip und durch eine semipermeable Membran getrennt an einem Dialysat vorbeigeleitet. Über die Dialysatzusammensetzung erfolgt die Steuerung der Diffusion. Es weist einen physiologischen oder auf die angestrebte Elimination angepassten Elektrolytgehalt auf und erzeugt in Bezug auf harnpflichtige Substanzen ein Konzentrationsgefälle in seine Richtung. Wie effektiv diese harnpflichtigen Substanzen aus dem Blut in das Dialysat entfernt werden können, hängt von maschinellen und patientenspezifischen Faktoren, aber auch von deren Molekülgröße ab (Barenbrock M., Schäfer R.M., 2004).

1.2.1. Kt/V_{urea}

Ein wichtiger Marker, der bereits seit dem Ende der 1980er Jahre zur Beurteilung der adäquaten Dialyse dient, ist das Kt/V_{urea} (Daugirdas J.T., 1989; Vanholder R. et al., 2015). Es ist definiert als das Produkt aus der Harnstoff-Clearance des Dialysators und der Dialysezeit, ins Verhältnis gesetzt zum Harnstoffverteilungsvolumen im Körper. Die Harnstoff-Clearance ist hierbei die Menge an Blut, die in einer bestimmten Zeit durch den Dialysator komplett von Harnstoff befreit werden könnte. Das Harnstoffverteilungsvolumen kann aus Körpergewicht und Größe berechnet werden (Barenbrock M., Schäfer R.M., 2004; Levy J. et al., 2016). In Summe gibt dieser Marker also das innerhalb der Dialyse von Harnstoff gereinigte Blutvolumen in Verhältnis zum insgesamt vorhandenen Harnstoffverteilungsvolumen an.

1.2.2. Die Ultrafiltration

Bei der Ultrafiltration folgt der Flüssigkeitsstrom einer hydrostatischen Druckdifferenz zwischen Blut und Dialysat. Diese kann durch Unterdruck im Dialysat oder Überdruck auf der Blutseite begünstigt werden und ermöglicht den Entzug von retiniertem Wasser (Barenbrock M., Schäfer R.M., 2004).

1.2.3. Regulation des Flüssigkeitshaushaltes bei Dialyse

Bei der ambulanten Hämodialyse haben sich Frequenzen von 3 Behandlungen pro Woche etabliert. Die Vermutung, dass Morbidität, Mortalität und Hypertonieprävalenz mit steigender Dauer einer Einzelsitzung oder mehr als 3 Behandlungen pro Woche sinken, wird weiterhin

diskutiert und untersucht (Barenbrock M., Schäfer R.M., 2004; Swaminathan S. et al., 2017; Slinin Y. et al., 2015). Die Mindestdauer einer Einzelsitzung sollte jedoch 4 Stunden nicht unterschreiten (Barenbrock M., Schäfer R.M., 2004).

Dies zeigt sich auch bei der Regulation des Flüssigkeitshaushaltes. Aufgrund der stark reduzierten bis völlig fehlenden Nierenfunktion kommt es während des dialysefreien Intervalls bei vielen Patienten zu einer Hypervolämie (Barenbrock M., Schäfer R.M., 2004). Jedoch ist die zu entfernende Flüssigkeitsmenge während der Dialyse schwer einzuschätzen. In der Regel wird das niedrigste postdialytische Gewicht herangezogen, welches mit Beschwerdefreiheit assoziiert ist und kurz über dem Körpergewicht liegt, bei dem Symptome einer Hypovolämie (Blutdruckabfall etc.) auftreten. Aus diesem sogenannten Trockengewicht wird in Relation zum Gewicht des Patienten vor der Dialyse die zu entfernende Flüssigkeitsmenge ermittelt (Doss-McQuitty S., 2014; Huang S.-H.S. et al., 2015; Barenbrock M., Schäfer R.M., 2004). Da diese Definition des Trockengewichtes teilweise als unzureichend angesehen wurde, wurden neuere Verfahren, die eine Auskunft über den Flüssigkeitsgehalt des Patienten geben könnten, in Betracht gezogen. Hierbei handelt es sich unter anderem um die bioelektrische Impedanzmessung und das relative Blutvolumenmonitoring, welche über elektrische Widerstandsmessungen des Körpers bzw. über kontinuierliche intradialytische Hämatokrit-Messungen erfolgen. Jedoch konnte sich hier, vermutlich durch das Fehlen groß angelegter Studien, noch kein Goldstandard herauskristallisieren (Miskulin D.C. et al., 2017; Huang S.-H.S. et al., 2015; Kuhlmann M.K. et al., 2005).

Neben den Schwierigkeiten bei der Ermittlung des Trockengewichtes wird es auch mit kürzerer Dialysezeit schwerer, das Trockengewicht zu erzielen, da immer höhere Ultrafiltrationsraten notwendig werden. Hierbei kann es aufgrund von unzureichendem Flüssigkeitsnachstrom aus dem Interstitium trotz intra- bzw. interstitieller Hypervolämie zu einer vaskulären Hypotonie kommen, sodass unter Umständen Sollgewichte gewählt werden müssen, die einem hypervolämischen Zustand des Patienten entsprechen (Doss-McQuitty S., 2014; Barenbrock M., Schäfer R.M., 2004). Bei einer dreistündigen Dialyse ist beispielsweise nur bei wenigen Patienten Normovolämie und Normotonie erreichbar, während nach 8 Stunden Dialyse nur noch etwa 2-5% der Patienten hyperten sind (Barenbrock M., Schäfer R.M., 2004). Zudem besteht bei zu raschem Flüssigkeitsentzug die Gefahr einer intradialytischen Hypotonie, welche eine weitere Verminderung der Nierenfunktion, myokardiale Ischämien mit resultierendem Stunning und verminderter kardialer Funktion, sowie ischämische Schäden von Gehirn und Verdauungstrakt

bedingen kann (Huang S.-H.S. et al., 2015; Doss-McQuitty S., 2014). Somit verbleiben Hämodialysepatienten teilweise auch nach der Hämodialyse in einem überwässerten Zustand.

1.3. Hypervolämie

Bereits mehrere Studien konnten einen Zusammenhang zwischen jenem hypervolämen Zustand und erhöhter Mortalität feststellen (Zoccali C, 2017; Dekker M.J. Marcelli D. et al., 2017; Wizemann V. et al., 2009). Dekker et al zeigten zudem, dass das Mortalitätsrisiko einer Kohorte von 8883 Hämodialysepatienten stufenweise mit zunehmender Überwässerung anstieg (Dekker M.J., Marcelli D. et al., 2017).

1.3.1. Hypervolämie und kardiale Risiken

Die erhöhte Mortalität könnte zum einen bedingt sein durch den ebenfalls nachweisbaren Zusammenhang von Überwässerung und Hypertonie, Arteriensteifigkeit, Linksherzhypertrophie, Herzinsuffizienz sowie anderen kardiovaskulären Risikofaktoren bzw. Erkrankungen (Hung S.C. et al., 2014; Hur E. et al., 2013; Wizemann V. et al., 2009). Zudem zeigten sich auch einige Marker für kardiovaskuläre Einschränkungen, wie D-Dimere, Troponin T und NT-proBNP mit Hypervolämie assoziiert (Antlanger M. et al., 2013). Allerdings konnten Onofriescu und Kollegen ein starkes Mortalitätsrisiko von überwässerten Hämodialysepatienten nachweisen, welches unabhängig von der Herzmorphologie oder -funktion vorlag (Onofriescu, M., et al., 2015). Somit sollten auch weitere Ursachen in Betracht gezogen werden.

1.3.2. Hypervolämie und erhöhte Entzündungsmarker

Neben der kardiovaskulären Risikoachse könnte eine weitere Ursache die erhöhte Mortalität bedingen. So konnte sowohl bei Peritoneal- und Hämodialysepatienten, als auch bei nicht dialysierten chronisch Nierenkranken ein Zusammenhang zwischen Hypervolämie und erhöhten Entzündungsmarkern wie CRP, TNF α oder IL-6 nachgewiesen werden (Dekker M.J., Marcelli D. et al., 2017; Konings C.J. et al., 2003; Hung S.C. et al., 2014).

Ursachen hierfür werden vielfach diskutiert. Möglich wäre es, dass die Entzündung aufgrund auftretender erniedrigter Serumalbuminwerte die Hypervolämie bedingt, da durch den so verminderten kolloidosmotischen Druck eine vermehrte Flüssigkeitsverlagerung in das Interstitium stattfindet (Dekker M.J., Marcelli D. et al., 2017). Des Weiteren ist es möglich, dass eine erhöhte Kapillarpermeabilität, wie sie bei Entzündungen vorliegt, eine erhöhte Wasserverlagerung ins Interstitium bedingt und so die Flüssigkeitsreduktion während der Dialyse behindert (Dekker M.J.E., van der Sande F.M. et al., 2018).

Andererseits könnte aber auch die Hypervolämie einen Verdünnungseffekt im Serum bewirken und die Entzündung ihrerseits durch die Hypervolämie bedingt sein (Dekker M.J., Marcelli D. et al., 2017).

1.3.2.1. Endotoxämie als mögliche Ursache für erhöhte Entzündungswerte

Eine generelle Ursache für chronische Entzündungszustände bei niereninsuffizienten Patienten scheint in der Endotoxämie zu bestehen (McIntyre C.W. et al, 2011), welche zum einen durch einen Integritätsverlust der epithelialen Darmbarriere, zum anderen durch Veränderungen des intestinalen Mikrobioms bedingt zu sein scheint (Vaziri N.D., 2012). Unter urämischen Einflüssen kommt es zu Entzündungen der Darmwand und einem Funktionsverlust der "tight junctions". Im Rahmen chronischer Nierenerkrankungen einzuhaltende diätetische Vorschriften (niedrige Kalium- und Phosphatzufuhr) führen weiterhin zu einer Dysbiose des Mikrobioms im Darm (Nowak K.L. et al., 2018; Lau W.L. et al., 2015). Der hierdurch ermöglichte Übertritt von Endotoxinen und anderen Noxen, aber auch von durch das in Dysbalance geratene Mikrobiom selbst freigesetzten urämischen Toxinen (Lau W.L. et al., 2015) in den systemischen Kreislauf könnte wesentlich zu einer chronischen Entzündungsreaktion beitragen (Vaziri N.D., 2012). McIntyre et al. konnten sogar zeigen, dass ein weiterer starker Anstieg der Endotoxämie mit dem Beginn der Hämodialyse feststellbar war, sie vermuten den systemischen Kreislaufstress und die wiederkehrende Darmischämie als Ursache. Die resultierende Endotoxämie wiederum war assoziiert mit systemischen Entzündungszeichen (CRP) und einer erhöhten Mortalität. Weiterhin zeigten Sie eine positive Korrelation zwischen dem prädialytischen Endotoxingehalt und der Höhe des Ultrafiltrationsvolumens (McIntyre CW et al, 2011). Dies könnte als möglicher Zusammenhang zwischen Hypervolämie und Endotoxinämie gewertet werden, allerdings konnten in dieser Studie keine weiteren derartigen Assoziationen (beispielsweise erhöhter BNP oder erhöhte linksarterielles Volumen) belegt werden (McIntyre C.W. et al, 2011; Zsom L. et al., 2019). In einer anderen Studie hingegen zeigte sich eine Assoziation zwischen Überwässerung (ermittelt anhand des Vena cava inferior-Durchmessers) und erhöhten Endotoxinkonzentrationen. Allerdings waren hier wiederum keine Zusammenhänge zwischen Endotoxin-Leveln und Entzündungsmarkern feststellbar, sodass eine durch Hypervolämie ausgelöste Endotoxinämie als Ursache für die chronischen Entzündungszustände bei Überwässerung weiter fraglich bleibt (Gonçalves S. et al., 2006).

1.4. Relevanz von IL-10 bei Hämodialysepatienten

Generell scheint bei Hämodialysepatienten häufiger die Aktivierung von Entzündungsreaktionen stattzufinden. Ein Review sah die Hauptursachen in der Akkumulation harnpflichtiger

Substanzen im Blut (Urämie), welche stimulierende Wirkungen auf die Immunzellen ausüben, sowie in dem wiederholten Kontakt des Blutes mit den Fremdoberflächen des Dialysematerials, welches unter anderem das Komplementsystem aktiviert. Theoretisch können auch die Dialysate bakterienkontaminiert sein (heutzutage technisch fast ausgeschlossen). Der daraus resultierende Bakterienübertritt in das Blut hätte ebenfalls entzündliche Antworten des Immunsystems zur Folge (Girndt M., 2002). Auch der bereits zuvor beschriebene Übertritt von Endotoxinen aus dem Darm in das Blut mit resultierender Endotoxämie, welche bei Hämodialysepatienten verstärkt auftritt, käme als Entzündungsauslöser in Betracht.

Offen bleibt die Frage, wieso sich diese Ursachen nicht gleichermaßen auf alle Hämodialysepatienten auswirken, sondern überwässerte Patienten höhere Entzündungsparameter aufweisen als normovoläme Patienten.

Einen möglichen Hinweis liefert eine Reihe von Studien, die sich mit der Problematik auseinandersetzten, warum ein Teil von Hämodialysepatienten eine deutlich verminderte Immunreaktion bei Impfungen gegen Hepatitis B oder Tetanus aufzeigten (Köhler H. et al., 1984; Girndt M., Pietsch M., et al., 1995). Dabei zeigte sich, dass die Impf-Nonresponder bei LPS-Stimulation eine erhöhte Bildung proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF α , sowie eine eingeschränkte Bildung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 durch mononukleäre Zellen aufwiesen (Girndt M. et al., 1995). Letztendlich war für die reduzierte Immunreaktion bei Impfungen ein Polymorphismus im Gen des Zytokins IL-10 verantwortlich, welcher in der Gruppe der Impf-Nonresponder auftrat und eine verminderte IL-10-Bildung bedingte (Girndt M. et al., 2001). Durch die verminderte Produktion von IL-10, einem Zytokin, welches vielfältige antiinflammatorische Wirkungen vermitteln kann (Rutz S., 2016), scheint die betroffene Gruppe somit auch vermehrt Entzündungszuständen ausgesetzt zu sein. Dies bestätigt sich durch das Vorliegen niedrigerer und weniger schwankender CRP-Werte in der Gruppe der Hämodialysepatienten mit höherer IL-10-Produktionsfähigkeit (Girndt M. et al., 2003).

Somit zeigt sich hier eine spezielle Untergruppe von Hämodialysepatienten, welche unter anderem erhöhte Bildungsraten proinflammatorischer Zytokine aufweist. Der entscheidende Unterschied beider Gruppen lag in diesem Fall in der IL-10-Produktion, hier allerdings auf genetisch verankerter Ebene, begründet. Somit wäre es durchaus möglich, dass auch im Rahmen der Gruppeneinteilung in normo- und hypervoläm, einhergehend mit dem erhöhten Auftreten von Entzündungsmarkern in der hypervolämen Gruppe, die Ursache in der IL-10-Produktion liegt. Jedoch ist die Überwässerung kein genetisch determinierter Zustand, sondern vielmehr durch verschiedenste exogene Einflüsse veränderbar. Somit ist das differierende Auftreten des

zuvor beschriebenen Genpolymorphismus in diesen beiden Gruppen eher nicht anzunehmen, sondern von anderen Mechanismen auszugehen, die die IL-10-Bildung beeinflussen könnten.

1.5. Hypervolämie und IL-10

Einen Zusammenhang zwischen Hypervolämie und IL-10-Produktion konnte nun eine Studie von Ulrich et al. feststellen. Trotz erhöhten IL-6-Werten bei hypervolämen Hämodialysepatienten konnte keine signifikante IL-10-Erhöhung unter den überwässerten Patienten festgestellt werden. Interessanterweise zeigte sich jedoch eine signifikant erhöhte Produktion von IL-10 mRNA in der hypervolämen Gruppe. Somit ist zu vermuten, dass hier die IL-10-Produktion posttranskriptionell beeinflusst wird (Ulrich C. et al., 2020). Der Mechanismus bleibt jedoch vorerst unklar.

1.6. Regulation der IL-10-Produktion

Auf prä- und posttranslationaler Ebene sind generell bereits mehrere auf die IL-10-Produktion Einfluss nehmende Faktoren bekannt.

1.6.1. Transkriptionelle Regulation

Eine wichtige Rolle spielt der Transkriptionsfaktor STAT3. Er kann eine spezifische Stelle im IL-10-Promotor binden und die Transkription fördern (Benkhart E. M. et al., 2000) und induziert weiterhin gemeinsam mit IRF1 die IL-10-Produktion nach Interferon- α -Induktion (Ziegler-Heitbrock L. et al., 2003). STAT3 selbst wiederum ist ein Transkriptionsfaktor, dessen Aktivierung durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen erfolgen kann und durch seine Phosphorylierung, häufig durch Januskinasen (JAKs), aber auch andere Rezeptor- oder Nicht-Rezeptortyrosinkinasen, vermittelt wird (Chen Q. et al., 2019). Unter den aktivierenden Zytokinen ist auch IL-10, welches STAT3 über den JAK/STAT-Signalweg aktiviert und so einen selbstverstärkenden Effekt ermöglicht (Rutz S. et al. 2016; Gabryšová L. et al., 2014). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von STAT3 bei bestehender Phosphorylierung des Tyrosins in Position 705 durch die weitere Phosphorylierung des Serins an Position 727 weiter gesteigert werden konnte (Wen Z. et al., 1995).

Des Weiteren konnte auch eine mögliche Beteiligung des ligandenaktivierten Transkriptionsfaktors AhR bei der IL-10-Produktion nachgewiesen werden. In murinen Makrophagen wurde unter AhR-Stimulation eine erhöhte IL-10-Produktion registriert (Fueldner C. et al., 2018); in LPS-stimulierten Makrophagen zeigte sich weiterhin eine verstärkte AhR-Expression, welche wiederum relevant für die IL-10-Expression war. Hierbei handelte es sich jedoch nicht um eine direkte transkriptionelle Beeinflussung des IL-10-Promotors durch AhR,

sondern um die Aktivierung eines Signalweges über Src und STAT3, der die gesteigerte IL-10-Produktion vermittelt (Zhu J. et al., 2018).

Weitere Transkriptionsfaktoren mit positivem Einfluss auf die IL-10-Expression sind unter anderem c-Maf, C/EBP, CREB und Sp1, welche über verschiedenste Signalwege aktiviert werden (Cao S. et al., 2002; Sanin D.E. et al., 2015; Brenner S. et al., 2003; Ma W. et al., 2001). Zudem weist Interferon γ einen hemmenden Effekt auf die IL-10-Transkription auf (Chomarat P. et al., 1993).

1.6.2. Posttranskriptionelle Regulation

Auf posttranslatiionaler Ebene konnte gezeigt werden, dass in PBMCs unter LPS-Stimulation eine zusätzliche Form der IL-10 mRNA im Vergleich zur Baseline-Produktion gebildet wird. Diese verfügt über eine kürzere 5'-untranslatierte Region (UTR) und kann so besser an Ribosomen binden (Forte G.I. et al., 2009). Auch wurden in der 3'-UTR mehrere potentiell destabilisierende Motive AUUUA entdeckt, deren Fehlen mit einer deutlich verlängerten Halbwertszeit der IL-10 mRNA einhergingen (Powell M. J. et al, 2000). An diesen AU-reichen Elementen (ARE) können sogenannte ARE-bindende Proteine durch ihre Anlagerung einen schnelleren Abbau der mRNA vermitteln (Rutz S. et al., 2016). Die 3'UTR ist weiterhin ein wichtiger Angriffspunkt für microRNAs, welche einen weiteren möglichen Einflussfaktor darstellen.

1.6.2.1. Micro-RNAs

Bei microRNAs (miRNAs) handelt es sich um ca. 23 Nucleotide lange, nichtcodierende, endogene RNAs, deren Vorläufer in Haarnadelstruktur vorliegen und die nach ihrer Prozessierung Teil des sogenannten RNA-induced Silencing Complex werden. So binden sie sequenzspezifisch an die 3'-UTR (untranslatierte Region) von mRNAs und sind in der Lage, deren Transkription zu beeinflussen (Bartel D.P., 2009; Baltimore D. et al., 2008). Weiterhin können Sie auch indirekt durch Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren auf die Genexpression Einfluss nehmen. Insgesamt sind sie an einer Vielzahl von physiologischen, wie auch pathologischen Vorgängen im Organismus beteiligt (Marques-Rocha J.L. et al., 2015).

1.6.2.2. IL-10-regulierende microRNAs

Auch wenn die Erkenntnisse über miRNAs noch recht jung sind, so sind doch bereits mehrere bekannt, welche auf die IL-10 mRNA Einfluss nehmen. So hemmen miR-106a und miR-98 beispielsweise die IL-10-Produktion, während miR-446l die Stabilität der IL-10 mRNA und damit die IL-10-Bildung erhöht (Quinn S.R. et al., 2014; Sharma A. et al., 2009; Liu Y. et al, 2011). Ding et al. konnten zudem im Zusammenhang mit dem systemischen Lupus erythematodes eine

hemmende Wirkung von miR-142-3p auf die IL-10-Expression nachweisen. Im Rahmen der Erkrankung zeigten sich miR-142-3p und miR-142-5p in CD4-positiven Zellen herunterreguliert und die IL-10-Produktion erhöht (Ding S. et al., 2012).

1.6.2.3. miR-142

Neben ihrem Einfluss auf IL-10 konnten für die miR-142 weitere wichtige regulatorische Funktionen mit Einfluss auf das Immunsystem festgestellt werden. So hat miR-142 eine hemmende Wirkung auf die cAMP-Produktion in CD4-positiven T-Zellen (Huang B. et al., 2009) und Makrophagen, wobei cAMP wiederum ein wichtiges Signalmolekül für die Immuntoleranz ist und sogar die IL-10-Produktion in Monozyten fördert (Risøe P. et al., 2011; Platzer C. et al., 1999).

Die ebenfalls für die Immuntoleranz hochrelevanten T-regulatorischen Zellen sind ihrerseits in der Lage, mittels FOXP3 die miR-142-3p zu hemmen, so eine erhöhte cAMP-Produktion zu ermöglichen und dadurch ihre hemmenden Effekte auszuführen (Huang B. et al., 2009). Eine zusätzliche Hemmung von miR-142-3p in T-regulatorischen Zellen erhöhte weiterhin ihr Überleben und ihre Effektivität durch eine verbesserte Autophagie (Lu Y et al., 2018).

Zudem scheint miR-142 einen fördernden Einfluss auf CD4-positive dendritische Zellen und deren Interaktion mit CD4-positiven T-Helferzellen zu haben (Mildner et al., 2013). Des Weiteren deutet sich eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen mittels CSF1 an. Zudem waren signifikante miR-142-3p Verminderungen sowohl in Monozyten bei chronisch myeloischer Leukämie (Lagrange B et al., 2013), als auch in PBMCs bei akuter myeloischer Leukämie nachzuweisen (Wang F. et al., 2011).

Diese microRNA ist weiterhin in der Lage, die IL-6-Produktion in dendritischen Zellen zu hemmen (Sun Y. et al., 2011) und ein völliges Abschalten von miR-142 führte in Mäusen sogar zu einer schwerwiegenden Immundefizienz (Kramer N.J. et al., 2015). Dies alles zeigt die Relevanz von miR-142 für die effektive Arbeit des Immunsystems und weist auf gravierende Auswirkungen einer möglichen Deregulation hin.

Dass auch die entzündlichen Veränderungen und die eingeschränkte IL-10-Produktion im Rahmen der Hypervolämie auf einer Veränderung der miR-142 basieren, ist somit durchaus möglich, zumal die microRNA mit ihrem nachgewiesenen Einfluss auf die cAMP-Produktion ein wichtiges Signalmolekül der Immuntoleranz direkt steuert und weiterhin bereits die direkte Hemmung der IL-10 mRNA durch miR-142-3p nachgewiesen werden konnte.

Wir haben uns deshalb entschieden, eine erneute Analyse der IL-10-Produktion von hypervolämen und normovolämen Dialysepatienten, sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene durchzuführen und unseren Fokus auf eine mögliche Hemmung der IL-10 mRNA-Translation durch microRNAs zu legen. Aufgrund des bereits bekannten Einflusses von miR-142-3p sowohl auf IL-10, als auch auf die Funktion des Immunsystems generell, haben wir unser Hauptaugenmerk auf diese microRNA gelegt. Für die miRNA-Analyse wurde die RNA aus allen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) herangezogen. Die Analyse von IL-10 mRNA und -Protein erfolgte sowohl in den PBMCs als auch im Serum der Probanden. Des Weiteren untersuchten wir den Transkriptionsfaktor STAT3, der eine wichtige Rolle bei der IL-10-Produktion und -Wirkung spielt, sowie den Einfluss einer Hemmung des Transkriptionsfaktors AhR, der ebenfalls für die IL-10-Produktion in Makrophagen relevant zu sein scheint.

2. Zielstellung

Diese Dissertationsarbeit hat das Ziel, mit Hilfe einer prospektiven, explorativen Studie, eine Dysregulation der IL-10-Produktion unter hypervolämen Hämodialysepatienten zu bestätigen, sowie mögliche Ursachen dafür zu ermitteln. Hierbei liegt der Fokus auf der Analyse bestimmter microRNAs, welche einen Einfluss auf die IL-10 Translation haben könnten.

Anhand molekularbiologischer Verfahren erfolgt eine Analyse der Blutproben bezüglich der IL-10 mRNA- und -Proteinexpression. Weiterhin wird die Expression der microRNA-142-3p und der microRNA-142-5p, sowie des Transkriptionsfaktors STAT3 analysiert. Ebenso erfolgt die Untersuchung einer möglichen Beeinflussung der IL-10-Produktion durch den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor. Dabei werden die Ergebnisse hypervolämer und normovolämer Hämodialysepatienten gegenübergestellt und verglichen.

Mit dieser Studie soll ermittelt werden, ob bei überwässerten Hämodialysepatienten eine Translationshemmung im Rahmen der IL-10-Produktion vorliegt und ob dies möglicherweise durch den Einfluss der microRNA-142-3p oder der miRNA-142-5p bedingt ist.

3. Material und Methoden

3.1. Material

Die im Rahmen der Studie verwendeten Materialien und Geräte finden sich in tabellarischer Ausführung im Anhang (Kap. 9.1.).

3.2. Methoden

3.2.1. Klinischer Teil

Studiendesign

Im Rahmen dieser monozentrischen explorativen Studie, für welche ein positives Votum der Ethik-Kommission (Bearbeitungsnummer 2021-224) vorliegt, wurden Patienten des Kuratoriums für Dialyse und Nierentransplantation e.V. (KfH) rekrutiert, welche sich in regelmäßiger ambulanter Dialyse befinden.

Hierbei galten folgende Ein- und Ausschlusskriterien:

Einschlusskriterien:

- Lebensalter > 18 Lebensjahre
- terminale Niereninsuffizienz seit mindestens 3 Monaten
- Ultrafiltrationsabnahme an der HD von >2000ml

Ausschlusskriterien:

- fehlende Einwilligung/mangelnde Kooperationsbereitschaft
- bekanntes bösartiges Tumorleiden (akut vorhanden, ohne abgeschlossene Therapie)
- akute Infektion (CRP > 50mg/l, Fieber, Schüttelfrost)
- psychiatrische oder neurologische Erkrankungen, die die Einwilligungsbereitschaft beeinträchtigen
- bekannte Schwangerschaft oder fehlende Kontrazeption (prämenopausale Frauen)

Es konnten 43 Patienten für die Studie gewonnen werden, von denen 3 ausgeschlossen werden mussten, da sie die minimal notwendige Ultrafiltrationsabnahme von 2 Litern nicht erreichten.

Die Patientenrekrutierung, die Information über den Studienablauf, das Einholen der Einwilligung, sowie die Erstellung der Anamnesebögen erfolgten selbstständig in Zusammenarbeit mit dem wissenschaftlichen Team der KIM II.

Studienablauf

Nach Einwilligung der Patienten erfolgte eine bioelektrische Impedanzanalyse zur Beurteilung des Wasserhaushaltes und der Einteilung in die Gruppen hypervoläm oder normovoläm. Diese Messung erfolgte jeweils im Anschluss an die letzte Wochendialyse (Freitag oder Samstag).

Vor der auf die Bioimpedanzmessung folgenden ersten bzw. nächsten Wochendialyse (Montag oder Dienstag) erfolgte eine Blutentnahme unmittelbar vor Beginn der Dialyse. Hierbei wurden zwei 9 ml EDTA-Monovetten, eine 4,9 ml Serum-Monovette und ein 9ml Tempus-Tube abgenommen, welche unmittelbar nach Entnahme im KfH von mir abgeholt, in das Labor der KIM II gebracht und in einem Zeitintervall von unter 2 Stunden selbstständig weiterverarbeitet wurden.

Durch den beschriebenen Mess- und Abnahmerhythmus gelang es uns, das Blut der Patienten nach dem langen dialysefreien Intervall von 3 Tagen zu analysieren, da hier der Überwässerungsgrad das gravierendste Ausmaß erreichen kann.

Erhebung von Patientencharakteristika

Alle relevanten Daten wurden den Dokumentationsakten des KfH entnommen. Hierbei handelt es sich um Basisinformationen wie Geschlecht, Größe, Gewicht und errechneten BMI, aber auch dialysespezifische Informationen wie die Ursache der terminalen Niereninsuffizienz, Beginn und Dauer der Dialyse, Dialysezeit pro Woche und das Gewicht vor und nach dem der Blutentnahme angrenzenden dialysefreien Intervall. Zudem erfolgte eine Erfassung aktueller Laborwerte und technischer Dialysedetails vom Tag der Blutentnahme. Des Weiteren wurde die aktuelle Medikation der Patienten auf das Vorhandensein von Blutdrucksenkern, Diuretika, Phosphatbindern, Steroiden/Immunsuppressiva und Insulin untersucht.

3.2.2. Experimenteller Teil

Bioelektrische Impedanzanalyse

Die bioelektrische Impedanzanalyse, welche eine Aussage über den Wasserhaushalt der Studienteilnehmer gibt, wurde jeweils im Anschluss an die letzte Dialyse der Woche durchgeführt. Hierzu wurde das Gerät „Nutrigard-MS“ von Data Input verwendet.

Die Messung erfolgte jeweils auf der dem Dialysezugang gegenüberliegenden Körperseite. Vorbereitend erfolgte das Entkleiden des entsprechenden Fußes, die Einnahme einer entspannten horizontalen Lage mit leicht abgespreizten Armen durch den Patienten sowie das Entfetten der relevanten Hautstellen mit Alkohol. Anschließend wurden je zwei Klebeelektroden

an Hand und Fuß positioniert. An der Hand grenzte eine Elektrode distal an eine durch die Grundgelenke von Zeige- und Mittelfinger verlaufende Linie, die zweite Elektrode grenzte proximal an den Processus styloideus ulnae. Die Fußelektroden wurden so positioniert, dass die distale Elektrode distal an einer Linie durch die Grundgelenke der 2. und 3. Zehe endete, die proximale Elektrode schloss mit ihrer proximalen Kante auf einer Linie zwischen den Maxima von Außen- und Innenknöchel ab (NutriGuard-MS Gebrauchsanleitung). Anschließend konnten die Messkabel mithilfe von Klemmen in korrekter Zuordnung an den Elektroden befestigt und die Messung am Gerät gestartet werden. Die Auswertung der ermittelten Daten erfolgte mithilfe des PC-Programmes „NutriDuplex®“.

Für die Zuordnung der Probanden in die Gruppen „hypervoläm“ bzw. „normovoläm“ wurden Resistenz und Reaktanz bei einer Frequenz von 50 kHz ermittelt und der daraus resultierende Piccoli-Vektor graphisch dargestellt. Dessen Position konnte nun mit einer sogenannten Toleranzellipse in Bezug gesetzt werden, welche die Werte von 75 % der Normalbevölkerung repräsentiert. Lag der Piccoli-Vektor unterhalb des unteren Pols dieser Ellipse, so wurden die Probanden als hypervoläm klassifiziert (Piccoli A., 2014).

Wesen der bioelektrischen Impedanzanalyse

Bei der bioelektrischen Impedanzanalyse macht man sich die verschiedenen Leitfähigkeiten einzelner Körperkompartimente zunutze. Intra- und extrazelluläre Flüssigkeiten stellen aufgrund ihrer hohen Ionenkonzentrationen gute elektrische Leiter mit niedrigen Widerständen dar, während aus Lipiddoppelschichten bestehende Zellmembranen eher wie Isolatoren bzw. Kondensatoren wirken. Setzt man den Probanden nun über die angebrachten Elektroden einem bekannten Wechselstrom aus, so kann man über den Spannungsabfall den Gesamtwiderstand des Körpers, die Impedanz messen. Diese setzt sich aus 2 Komponenten zusammen. Die Resistenz (R) ist hierbei der Widerstand, der dem Strom bei seinem Fluss durch ionische Lösungen entgegengesetzt wird, während die Reaktanz (Xc) der Widerstand ist, der durch die Kondensatoreigenschaften der Lipiddoppelschichten entsteht. Somit gibt die Resistenz Auskunft über den Anteil an Wasser im Körper, wodurch auch auf die Verteilung von Magermasse (höherer Flüssigkeitsgehalt) und Fettmasse (geringerer Flüssigkeitsgehalt und damit höherer Widerstand) geschlossen werden kann. Die Reaktanz hingegen beschreibt eher die Körperzellmasse (NutriGuard-MS Gebrauchsanleitung; Piccoli A, 2014; Kaufmann S., 2015).

Werden nun die Resistenz und die Reaktanz, jeweils auf die Körpergröße normiert, graphisch in Abhängigkeit voneinander dargestellt, so ergibt sich der Piccoli-Vektor, auch RXc-Vektor genannt, welcher für unsere Gruppeneinteilung genutzt wurde (Piccoli A, 2014).

Des Weiteren kann das Programm aus den zugeführten Daten Informationen über die einzelnen Körperkompartimente ermitteln. So können Körperfett sowie korrespondierende fettfreie Masse und auch das Körperwasser ermittelt werden. Die fettfreie Masse ist hierbei wiederum zusammengesetzt aus der Körperzellmasse (BCM), bestehend aus den stoffwechselaktiven Zellen hauptsächlich von Muskulatur und Organen, sowie der extrazellulären Masse (ECM), welche vor allem aus Interstitium und Bindegewebe besteht. Des Weiteren kann das in der Körperzellmasse enthaltene intrazelluläre Wasser (ICW), sowie das in der extrazellulären Masse vorliegende extrazelluläre Wasser (ECW) bestimmt werden. Zudem kann der sogenannte Phasenwinkel bestimmt werden, welcher durch die Dichte der Zellen, sowie die Qualität ihrer Membranen beeinflusst wird und so eine Aussage über die Qualität der Magermasse ermöglicht. Hierbei spricht ein hoher Phasenwinkel für eine gute Qualität (Nutriguard-MS Gebrauchsanleitung).

Serumgewinnung

Nach Zentrifugation der Serum-Monovette bei 2000 g für 10 Minuten konnte die klare Schicht abgehoben und das Serum auf 2 Eppendorf-Tubes (1,5 ml) verteilt werden. Die Zwischenlagerung erfolgte bei -20 °C, die Langzeitlagerung bei -80 °C.

Isolation von peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMCs)

Das Vollblut der beiden EDTA-Monovetten wurde unter sterilen Bedingungen nach einem Standardprotokoll der Dichtezentrifugation behandelt.

Zuerst wurden je 8ml EDTA-Vollblut in einer 1:2,5 Verdünnung mit PBS + 0,5 mM EDTA-Lösung mit 15 ml des Dichtemediums Pancoll human (1.077 g/ml) unterschichtet. Hierbei wurde ein Durchmischen beider Phasen durch einen Filter im betreffenden Leucosept-Röhrchen verhindert. Durch die anschließende Zentrifugation bei 1000 g für 18 Minuten ohne Bremse entstand ein PBMC-Ring, bestehend aus Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten, kurz oberhalb des Filters. Es erfolgte ein Absaugen des Mediums oberhalb und ein Abkippen der restlichen, die genannten Zellen enthaltenden Flüssigkeit oberhalb des Filters in ein neues 50er Falcon-Gefäß.

Im Anschluss erfolgten 3 Waschschrte durch Hinzugabe von jeweils 50 bzw. 30 ml PBS-2mM EDTA in das Falcon-Gefäß und anschließender Zentrifugation (10 Minuten, 8 °C, mit Bremse). Hierbei erfolgten die ersten beiden Zentrifugationen bei 300 g, die letzte bei 200 g. Das entstandene Pellet wurde abschließend in 1 ml RPMI-Medium (4%FBS/HSA) resuspendiert.

Für die anschließende durchflusszytometrische Messung im MACSQuant Analysator (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland) wurden 10 µl der Zellsuspension in 385,5 µl FACS-Puffer gegeben und mit 0,5 µl Anti-CD3 FITC, 2 µl Anti-CD15 eF450, 1 µl Anti-CD14 Pcy7 und 1 µl 7-AAD Viability Staining Solution versetzt. Die Messung erfolgte nach 5-minütiger Inkubation bei 4 °C, die Auswertung erfolgte mittels MACS-Quantify.

Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, ein etabliertes labormedizinisches Messverfahren, ermöglicht die Analyse von Zellen, aber auch anderen Partikeln wie z.B. Zellkernen, DNA, Viren und Chromosomen.

Bei der Analyse von Zellen werden diese, in Suspension befindlich, einzeln an einem Punkt vorbeigeleitet, an dem eine Bestrahlung mit einem oder mehreren monochromatischen Laserstrahlen erfolgt. Wird die Zelle von einem oder mehreren Laserstrahlen getroffen, so kommt es zu einer Streuung des Lichtes in verschiedene Richtungen. Vorwärts gestreutes Licht (FSC = forward scatter) ermöglicht Aussagen über die Größe der Zelle, seitwärts gestreutes Licht (SSC = side scatter) über ihre Granularität.

Anhand dieser Parameter ist bei unserer Zellanalyse bereits eine grobe Unterscheidung zwischen Monozyten, Leukozyten und Granulozyten möglich.

Des Weiteren ist das Laserlicht in der Lage, Fluorochrome dazu anzuregen, Licht zu emittieren. Hierbei werden verschiedene Fluorochrome von Laserstrahlen ganz spezieller Wellenlängen angeregt und geben ein energieärmeres Licht mit größerer Wellenlänge wieder ab. Diesen Vorgang macht man sich zunutze, indem man Antikörper mit Fluorochromen kombiniert. Waren die Zellen diesen fluoreszenz-markierten Antikörpern vor der Messung ausgesetzt, so kann über das Vorhandensein oder das Ausbleiben von emittiertem Licht auf das Vorhandensein eines bestimmten Antigens auf oder in der Zelle rückgeschlossen werden.

Moderne Durchflusszytometer verfügen über bis zu 9 separate Laserstrahlen, sodass bis zu 9 Fluorochrome verschiedener Wellenlängen gleichzeitig angeregt werden können. Da das emittierte Licht charakteristisch für jedes Fluorochrom ist, ist auch eine genaue Unterscheidung möglich (El-Hajjar L. et al., 2023).

Zur genauen Identifizierung einzelner Zellgruppen werden fluoreszenzmarkierte Antikörper eingesetzt, die gegen bestimmte „Cluster of differentiation“ gerichtet sind. Hierbei handelt es

sich um auf der Zelloberfläche vorhandene Moleküle, anhand derer Zellen eindeutig einer Zellfamilie zuzuordnen sind, da sie nur dort spezifisch exprimiert werden (Xiong S. et al., 2014).

Im vorliegenden Experiment verwendeten wir anti-CD3-Antikörper zur Identifizierung von T-Zellen. Anti-CD14- oder Anti-CD86-Antikörper zeigten das Vorhandensein von Monozyten bzw. Makrophagen an und Granulozyten wiesen CD15-positive Signale auf.

Weiterhin ist es wichtig, tote Zellen von der Analyse auszuschließen, da diese unspezifisch Antikörper binden können und mit sinkendem Metabolismus eine höhere Autofluoreszenz entwickeln. Dies könnte zu falschen Signalen führen. Um abgestorbene Zellen eindeutig identifizieren zu können, setzten wir unserer Probe 7-AAD Viability Staining Solution zu. Der hier enthaltene fluoreszierende Farbstoff 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) enthält Komponenten, die nur geschädigte Zellmembranen von sterbenden oder toten Zellen durchdringen können und dann in deren DNA interkalieren. Die intakte Zellmembran lebender Zellen können sie jedoch nicht durchqueren (El-Hajjar L. et al., 2023).

Mittels Gating werden schließlich die einzelnen homogenen Zellgruppen markiert und auswertbar gemacht. Hierbei werden von den anhand der Messergebnisse zwei- oder dreidimensional graphisch dargestellten Zellwolken bestimmte Zellpopulationen bzw. -wolken manuell ausgewählt und deren Größe ermittelt (El-Hajjar L. et al., 2023).

RNA-Isolation aus dem Tempus-Tube

Das frisch abgenommene Tempus Tube wurde nach mehrfachem Invertieren für 2 Stunden bei Raumtemperatur gelagert und anschließend bei -20 °C eingefroren.

Die RNA-Isolation erfolgte mithilfe des Tempus Spin RNA Isolation Kit von AB.

Die vollständig aufgetaute Probe wurde in ein 50er Falcon überführt und bis auf 12 ml mit PBS-Buffer ergänzt. Nach 30-sekündigem Vortexen erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 3000 g und 4 °C für 30 Minuten. Anschließend konnte der Überstand abgekippt werden, das Falcon verweilte 1-2 Minuten in umgekehrter Position. Das resultierende Pellet wurde in 400 µl RNA Purification Resuspension Solution resuspendiert und nach Benetzen des Filters mit 100 µl RNA Purification Wash Solution 1 auf den im Collection Tube steckenden Filter pipettiert. Nach anschließender Zentrifugation (1 Minute, 16 000 g) folgte ein Waschschriff mit 500 µl RNA Purification Wash Solution 1 und Zentrifugation für 1 Minute bei 16 000 g, sowie zwei weitere Waschschriffe mit 500 µl RNA Purification Wash Solution 2 (Zentrifugation 1 Minute bei 16 000 g). Nach einer weiteren Leerzentrifugation bei gleichen Geräteeinstellungen und Gabe

von 100 µl Nucleic Acid Purification Elution Solution auf den Filter wurde die Probe für 2 Minuten bei 70 °C inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 16 000 g für 1 Minute, das Eluat wurde erneut auf den Filter pipettiert und ein weiteres Mal bei gleicher Beschleunigung für 2 Minuten zentrifugiert. Anschließend konnte das die isolierte RNA enthaltende Eluat bei -20 °C gelagert werden.

Isolation von miRNA/RNA aus PBMCs

Hierzu wurden unter sterilen Bedingungen in 3 FACS-Röhrchen je 1 Mio PBMCs in 500 µl RPMI+4%%FBS/HSA eingesät. Eine Probe blieb unstimuliert, der zweiten wurde 1 µl LPS (10 ng/µl) zugesetzt und bei der dritten Probe erfolgte die Zugabe von 1 µl LPS (10ng/µl) und 2 µl AhR-Antagonist (2 mg/ml). Alle Proben wurden für 4 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert, anschließend durch Zentrifugation bei 450 g für 5 Minuten pelletiert und in 300 µl RNA-Lysispuffer resuspendiert. Die Lagerung bis zur Weiterverarbeitung erfolgte in 1,5ml Eppendorf-Tubes bei -20 °C.

Die RNA-Isolation erfolgte nach dem Protokoll des „Quick RNA MiniPrep: ZymoResearch-Kit“. Die Proben wurden aufgetaut, resuspendiert, 1 Minute bei 16 000 g zentrifugiert und der Überstand auf einen Spin-Away-Filter pipettiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 16 000 g für 1 Minute erfolgte die Zugabe von 3,5 µl Worksolution Spike miR-39 (1,6x10⁸) und 300 µl 100% Ethanol. Im Anschluss an sorgfältiges Mischen durch Auf- und Abpipettieren wurde die gesamte Flüssigkeit in ein Zymo-Spin IIICG Colum überführt und erneut bei 16 000 g für 30 Sekunden zentrifugiert. Im Anschluss an einen Waschgang mit 400 µl RNA-Wash-Buffer und Zentrifugation bei 16 000 g für 30 Sekunden erfolgte die Zugabe von 80 µl eines Ansatzes aus 5µl DNase I (250 U) und 75 µl DNA Digestion Buffer und eine Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur.

Es schlossen sich die Zugabe von 400 µl RNA Prep Buffer und 700 µl RNA Wash-Buffer, jeweils gefolgt von einer Zentrifugation bei 16 000 g für 30 Sekunden und die Zugabe von 400 µl Wash-Buffer mit anschließender Zentrifugation bei 16 000 g für 2 Minuten an.

Abschließend wurde das Zymo-Spin IIICG Colum auf ein RNase-freies Tube gesteckt und 50 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Column-Membran pipettiert. Nach Zentrifugation bei 16 000 g für 30 Sekunden konnte der die isolierte RNA enthaltende Durchfluss bei -70 °C gelagert werden.

RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA erfolgte mithilfe des Tecan Infinite 200 Pro. Hierfür wurden nach vorangegangenen Blanking 2 µl der Proben in Doppelwerten auf die NanoQuant Platte pipettiert und anschließend im Gerät analysiert. Dabei wurde die Absorption der Probe bei Bestrahlung mit UV-Licht von 260 und 280 nm Wellenlänge gemessen und auf die RNA-Konzentration rückgeschlossen (Informationsbroschüre Tecan).

Reverse Transkription der isolierten miRNA in cDNA

In Vorbereitung auf die Analyse der miRNA mithilfe des miR Cury LNA SYBRGreen PCR Kit wurde die aus PBMCs isolierte RNA mittels miR CURY LNA RT in cDNA umgeschrieben.

Hierzu wurden 5 ng der jeweiligen RNA-Probe entnommen und mit RNase freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µl ergänzt. Im Anschluss erfolgte die Gabe folgender Substanzen zu jeder Probe:

5x miRCury RT Reaction Buffer	2 µl
10x miRCury RT Enzyme Mix	1 µl
UniSp6 Spike	0,5 µl

Die Proben wurden mittels Flicking gemischt, an zentrifugiert und anschließend in den MiniAmp Thermal Cycler eingesetzt. Dort erfolgte eine Inkubation bei 42 °C für 60 Minuten, gefolgt von einer 5-minütigen Phase bei 95 °C zum Stoppen der Reaktion. Im Anschluss wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt. Nach Entnahme aus dem Cycler erfolgte eine Probenlagerung bei -20 °C.

Reverse Transkription der isolierten mRNA in cDNA

Da die Analyse der mRNA mittels TaqMan RealTime PCR-Assay erfolgte, war eine zweite Umschreibung der aus den PBMCs sowie aus dem Tempus Tube isolierten RNA mittels High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit AB notwendig.

Hier wurde ein Volumen der Probe entnommen, welches 50 ng der PBMC-RNA bzw. 500 ng der Tempus-Tube-RNA enthält und ebenfalls mit Nuclease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µl ergänzt. Des Weiteren wurden jedem Reaktionsansatz folgende Bestandteile zugegeben:

10x RT Buffer	2 µl
25x dNTP Mix	0,8 µl

10x RT Random Primer	2 μ l
MultiScribe Reverse Transcriptase	0,5 μ l
Nuclease-freies Wasser	4,7 μ l

Nach anschließendem Flicking und Anzentrifugieren wurden auch diese Proben in den MiniAmp Thermal Cycler gegeben. Das hier genutzte Cyclerprogramm setzte sich aus 10 Minuten bei 25 °C, 120 Minuten bei 37 °C und 5 Minuten bei 85 °C zusammen. Anschließend wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt und dann dem Cycler entnommen. Es erfolgte eine Lagerung bei -20 °C.

Wesen der Reversen Transkription

Da für die klassische PCR-Technik nur DNA verwendet werden kann, ist für die Analyse von RNA als Vorbereitung die sogenannte Reverse Transkription nötig. Hierbei handelt es sich um die Synthese eines zu einer einzelsträngigen RNA komplementären cDNA-Stranges. Diese Reaktion wird von dem Enzym Reverse Transkriptase, ursprünglich vorkommend in Retroviren, unter Anwesenheit von freien Desoxynucleotiden katalysiert. Um einen Startpunkt für das Enzym zu schaffen, ist die Anwesenheit von Primern erforderlich, die sich komplementär an die RNA anlagern. Hierbei können verschiedene Arten von Primern genutzt werden. Oligo dT-Primer binden komplementär an die poly-A-Sequenz, die sich am 3'-Ende jeder mRNA findet, während sogenannte Random Primer willkürliche Basenabfolgen besitzen und so zufällig innerhalb der gesamten RNA-Sequenz binden können. Zuletzt können auch genspezifische Primer verwendet werden, welche zu einer spezifischen Zielsequenz innerhalb der RNA komplementär sind (Haddad F. et al., 2010).

miR RT-PCR Assay

Für eine sensitive und spezifische Detektion von miRNAs nutzten wir für die Real-Time PCR das miRCury LNA SYBR Green PCR Kit.

Hierzu erfolgte vorbereitend eine 1:60 Verdünnung der hergestellten cDNA und das Erstellen von PCR-Reaktionsgemischen. Diese enthielten pro Well folgende Substanzen:

2x miRCury SYBR Green Master Mix	5 μ l
Qia-Primer (142-3p, 142-5p, Uni-Sp6 oder 39-3p)	1 μ l
Rox Reference DYE	0,5 μ l
RNA-freies Wasser	0,5 μ l

Hierbei diene der Nachweis von 39-3p und Uni-Sp6, welche bereits als RNA im Rahmen der Isolation bzw. Umschreibung hinzugefügt wurden, als interne Amplifikationskontrolle und Normierungshilfe.

Bei der anschließenden Befüllung der 96-Well-Platte erfolgte die Gabe von 3 µl verdünnter cDNA und 7 µl eines PCR-Reaktionsmixes in jedes Well. Hierbei wurde jede Probe im Doppelwert mit allen 4 Primern kombiniert. Während des Pipettiervorganges wurde die Platte auf einem Minicooler für PCR-Tubes kühl gehalten.

Nach vollständiger Plattenbefüllung und Abdecken der Platte mit einem QuickSeal PCR Sheet konnte eine Zentrifugation (2 Minuten, 480 g) durchgeführt werden.

Anschließend wurde die Platte in den Real Time PCR Step One Plus einlegt und das voreingestellte Programm gestartet. Dieses begann mit einer initialen Hitzeaktivierung bei 95 °C für 2 Minuten, an welche sich 40 Zyklen aus 10-sekündiger Denaturierung bei 95 °C und einer 60-sekündigen Phase bei 56 °C zur Primeranlagerung und Doppelstrangsynthese anschlossen.

Abschließend erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse bei 60-95 °C.

TaqMan RealTime PCR-Assay

Mithilfe dieser PCR erfolgte die Analyse isolierter mRNA aus PBMCs und aus dem Tempus-Tube, welche bereits mithilfe des „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit AB“ in cDNA umgeschrieben wurde.

Vorbereitend erfolgte auch hier die Herstellung eines PCR-Reaktionsmixes aus 5 µl Nippon qPCRBio Probe Hi-Rox, 0,5 µl der jeweiligen TaqMan Sonde (RPL37a oder IL-10) und 3,5 µl RNA-freiem Wasser pro Well.

Die cDNA wurde unverdünnt in 1 µl-Portionen in die Wells pipettiert und anschließend 9 µl des gewünschten PCR-Reaktionsmixes hinzugefügt. Erneut erfolgte die Kombination jeder cDNA im Doppelwert mit beiden Sonden. Das Befüllen der Platte erfolgte unter kontinuierlicher Kühlung durch den Minicooler für PCR-Tubes.

Nach Abdecken der Platte mittels QuickSeal PCR Sheet und 2-minütiger Zentrifugation bei 480 g wurde die Platte in den Real Time PCR Step One Plus eingelegt und das voreingestellte Programm gestartet. Dieses bestand aus einer initialen Hitzeaktivierung bei 95 °C für 10 Minuten gefolgt von 40 Zyklen bestehend aus 10-sekündiger Denaturierung bei 95 °C und 30 Sekunden bei 60 °C für die Primeranlagerung und Doppelstrangsynthese.

Wesen der RealTime-PCR

Eine PCR, auch Polymerasekettenreaktion, ermöglicht die Vervielfältigung einzelner DNA-Abschnitte. Hierfür wird ein PCR-Ansatz mit zu vervielfältigender DNA, dem Enzym Taq-DNA-Polymerase, freien Nukleotiden und Primern benötigt. Bei Primern handelt es sich um kurze synthetisch Oligonukleotide, die komplementär vor dem zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt an einen DNA-Einzelstrang binden können.

Diese Mischung wird sich mehrfach wiederholenden Temperatur-Zyklen ausgesetzt. In der Denaturierungsphase bei einer Temperatur von etwa 95 °C wird die DNA-Doppelhelix in 2 Einzelstränge aufgetrennt, eine anschließende Temperaturabsenkung auf ca. 56 °C ermöglicht die Anlagerung der Primer an ihre komplementären Bereiche auf den DNA-Einzelsträngen. Im Anschluss kann die Taq-DNA-Polymerase die freien Nucleotide von den Primern beginnend komplementär an die Einzelstränge anlagern. So entsteht in diesem Bereich ein DNA-Doppelstrang, der bei der nächsten Denaturierungsphase erneut in zwei Einzelstränge aufgetrennt wird (Holzapfel B. et al., 2007).

Bei der RealTime-PCR finden nun DNA-Amplifikation und -Detektion gleichzeitig statt. Hierfür gibt es vielfältige verschiedene Methoden, die überwiegend mit dem Effekt der Fluoreszenzemission arbeiten.

Im Falle des TaqMan RealTime PCR-Assays nutzt man den sogenannten Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (kurz FRET). Hierzu werden TaqMan-Sonden eingesetzt. Dies sind kurze synthetischen Oligonukleotide, welche komplementär im Bereich des zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt binden können, sobald dieser als Einzelstrang vorliegt. Sie verfügen sowohl am 3'-, als auch am 5'-Ende über je ein Fluorochrom. Jedes besitzt eine bestimmte Anregungswellenlänge und ein spezifisches Emissionsspektrum. Diese werden so gewählt, dass das eine Fluorochrom (auch Reporter genannt) Licht emittiert, welches die Anregungswellenlänge des zweiten Fluorochroms (auch Quencher genannt) besitzt. Sind nun beide Farbstoffe an das Oligonucleotid gebunden und somit in räumlicher Nähe zueinander, kommt es zu einem Energietransfer. Der Reporter emittiert kein oder nur wenig Licht und gibt die Energie stattdessen direkt an den Quencher weiter. Nur das durch den Quencher emittierte Licht kann gemessen werden.

Sobald jedoch die Taq-DNA-Polymerase, die vom Primer ausgehend komplementäre Einzelstränge synthetisiert, die TaqMan-Sonde erreicht, wird diese durch die endogene 5'-Nukleaseaktivität der Polymerase zerschnitten. Somit kommt es zu einer räumlichen Trennung

von Quencher und Reporter, sodass kein Energietransfer zwischen beiden mehr möglich ist. Der Reporter emittiert nun also auch Licht. Die Höhe des Fluoreszenzsignals mit dem Emissionsspektrum des Reporters ist somit direkt proportional zu der Menge der amplifizierten DNA (Holzapfel B. et al., 2007; Mülhardt C., 2006).

Der miRCURY LNA SYBR Green PCR Assay hingegen nutzt den Farbstoff SYBR Green I, der Fluoreszenzstrahlung aussendet, sobald er an doppelsträngige DNA gebunden hat. Somit steigt auch hier die Fluoreszenz mit steigender dsDNA-Konzentration proportional an (Wong M. L. et al., 2005).

Die anschließende Schmelzkurvenanalyse dient zur Überprüfung der Spezifität der entstandenen DNA-Produkte.

Hierzu werden die PCR-Produkte einem permanenten kleinschrittigen Temperaturanstieg von 60 °C bis auf 95 °C unterzogen und die Fluoreszenzänderung in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt. Da der Farbstoff SYBR Green I nur an dsDNA binden und in diesem Zustand Fluoreszenzsignale aussenden kann, findet bei Auftrennung des Doppelstranges ein Abfall des Fluoreszenzsignals statt. Die dafür notwendige Temperatur, der sogenannte Schmelzpunkt, ist abhängig von der Größe des DNA-Doppelstranges und dem enthaltenen Anteil an Guanin-Cytosin-Paarungen, da diese über 3 Wasserstoffbrückenbindungen verbunden sind, während zwischen Adenin und Thymin nur 2 dieser Bindungen existieren. War die Spezifität der PCR hoch, so sind ihre Produkte einheitlich und die Auftrennung des Doppelstranges findet bei derselben Temperatur statt. Somit zeigt sich ein einzelner hoher Peak im Fluoreszenzänderungs-Temperatur-Diagramm. Liegen jedoch unterschiedliche DNA-Doppelstränge vor, kommt es nach und nach zu deren Auftrennung und somit auch zu mehreren flacheren Peaks in oben beschriebenem Diagramm (Arnemann J., 2019).

IL-10 Stimulationskapazität von PBMC

Es wurden in 4 FACS-Röhrchen je 500 000 PBMCs in 500 µl RPMI+4%FBS/HSA unter sterilen Bedingungen eingesät und nach folgendem Schema mit Stimulantien versetzt:

	KO1	KO2	LPS	LPS /AHR-A
LPS (10 µg/ml)	-	-	1 µl	1 µl
AhR-Antagonist(2 mg/ml)	-	-	-	2 µl

Bei ausgewählten Proben wurde zudem eine weitere unstimulierte Probe KO3 zur Isotypenkontrolle mitgeführt.

So wurden die Proben für mehrere Stunden inkubiert, bevor eine Zugabe von 0,5 µl Monensin zu allen Proben erfolgte. Es folgte eine weitere Inkubation für 14 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂).

Im Anschluss wurden die Zellen mittels Zugabe von 2ml PBS und anschließender Zentrifugation (5 Minuten, 350 g) gewaschen und das Pellet in 100 µl PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 0,5 µl Viability Dye, einem Farbstoff, der lediglich tote Zellen färbt (Viability dye guide, Miltenyi Biotec), und 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) folgte ein weiterer Waschgang mit 2 ml FACS-Puffer (Zentrifugation bei 350 g, 5 Minuten). Nach Aufnahme des Pellets in 100 µl FACS-Puffer fand eine Oberflächenfärbung durch Zugabe von 0,5 µl Anti-CD14 FITC und 2 µl Anti-CD3 APC-Vio770 und 15-minütige Inkubation bei RT statt. Hierbei dient Anti-CD14 erneut der Identifikation von Monozyten/Makrophagen und Anti-CD3 dem Nachweis von T-Zellen. Im Anschluss an einen weiteren Waschgang mit 2 ml FACS-Puffer (Zentrifugation bei 350 g, 5 Minuten) wurde das Pellet in 200 µl 1 % PFA-Lösung resuspendiert und 10 Minuten bei 4 °C inkubiert, um die Zellen zu fixieren. Einem weiteren Waschgang mit 2 ml FACS-Puffer und Zentrifugation für 5 Minuten bei 350 g folgte die Zugabe von 1 ml 0,1 % Saponinlösung auf das Pellet. Dies führt zu einer herabgesetzten Integrität der Zellmembran und ermöglicht eine Färbung intrazellulärer Komponenten. Diese erfolgte nach 20-minütiger Inkubation bei RT in Dunkelheit, Zentrifugation bei 500 g für 5 Minuten und Abkippen des Überstandes. Hierzu wurde das Pellet in 95,74 µl FACS-Puffer resuspendiert und alle Proben mit Ausnahme von KO1 und KO3 mit 2 µl Anti-IL10 APC versetzt. Die Isotypenkontrolle KO3 wurde mit je 2 µl Isotyp IgG1-PE und Isotyp IgG1-APC versetzt. Sämtlichen Proben wurden 2 µl 5 % Saponin zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei RT in Dunkelheit und einem Waschgang mittels 1 ml FACS-Puffer (Zentrifugation 5 Minuten bei 500 g) wurde das Pellet in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und unverzüglich durchflusszytometrisch analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels MACS-Quantify Software, wobei die Werte antikörperfreien Probe als Null-Werte gelegt wurden.

Phospho-Transkriptionsfaktor-Detektion

In 4 sterilen FACS-Röhrchen mit Deckel wurden je 250 000 PBMCs in einem Volumen von 500 µl RPMI+4%FBS/HSA eingesät. Nach Zugabe von 1 µl LPS (10 µg/ml) in eines der Röhrchen und 1 µl LPS (10 µg/ml) sowie 2 µl AhR-Antagonist (2mg/ml) in ein weiteres wurden die Proben für 30 Minuten im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Der Zugabe von 100 µl 4 % PFA und Inkubation von 10 Minuten bei RT zur Fixierung der Zellen folgte die Pelletierung bei 300 g für

5 Minuten. Die anschließende Zugabe von 1 ml eisgekühltem PhosFlow Perm Puffer bewirkte eine Permeabilisierung der Zellmembran und war somit Voraussetzung für die folgende intrazelluläre Färbung. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis und 2 Waschvorgängen mit 2 ml FACS-Puffer (Zentrifugation 300 g, 5 Minuten) wurde das Pellet hierzu in 48 µl FACS-Puffer suspendiert und mit Antikörpern versetzt. Hierbei erfolgte eine Zugabe von 5 µl Anti-CD86 PeCy5 zur Färbung von Monozyten/Makrophagen und 1 µl Anti-CD4 APC eF480 zur Identifikation von T-Helferzellen zu allen Proben. Weiterhin wurden alle bis auf eine unstimulierte Probe mit 5 µl Anti-Stat3 BV421 und 20 µl Anti-Stat3 PE versetzt. Nach einer Inkubation für 30 Minuten in Dunkelheit bei RT und einem Waschschrift mit 2 ml FACS-Puffer (Zentrifugation 300 g, 5 Minuten) konnte das Pellet in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und sofort am MACSQuant-Analysator gemessen werden. Die Auswertung erfolgte mittels MACS-Quantify Software und unter Legen der antikörperfreien Probe als Null-Wert.

Interleukin-10 high sensitivity ELISA

Mithilfe dieses Assays wurde die IL-10-Konzentration im Serum bestimmt.

Hierzu wurden zunächst Wash und Assay Buffer angesetzt, der IL-10-Standard in 200 µl (=S0) deionisiertem Wasser gelöst und die zu untersuchenden Proben aufgetaut. Nach 30-minütiger Wartezeit erfolgte die Herstellung einer Standardverdünnungsreihe. Hierzu mussten 225 µl des Standards S0 mit 225 µl Sample Diluent versetzt werden. Von dieser Mischung wurden 225 µl entnommen und hierzu wiederum 225 µl Sample Diluent gegeben. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt, sodass sich eine Standardverdünnungsreihe mit sich jeweils halbernden Konzentrationen von 25,0 pg/ml bis 0,39 pg/ml ergab.

Die Platte wurde zunächst zweimal mit jeweils 280 µl Wash Buffer pro Well gewaschen.

Anschließend erfolgte die Belegung der Platte. Hierbei wurden jeweils 100 µl jedes Standards der Verdünnungsreihe, jeweils in Doppelwerten in die Wells gegeben. Zudem wurden 2 Wells mit Sample Diluent als Blank belegt. Anschließend wurden je 10 µl der zu untersuchenden Proben und 90 µl Sample Diluent in jedes Well gegeben, sodass eine Probenverdünnung von 1:10 erreicht wurde.

Nach Ansetzen des Biotin Konjugates mit Sample Diluent wurden hiervon jeweils 400 µl in jedes Well pipettiert. Nach Verschluss der Platte folgte eine Inkubation auf dem Plattenschüttler (400 rpm) für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Im Anschluss folgte das Entleeren der Wells und 6 weitere Waschgänge mit 280 µl Wash Buffer pro Well.

Anschließend wurde der Streptavidin HRP-AK mit Assay Buffer angesetzt und jeweils 100 µl hiervon in jedes Well pipettiert. Auch hier erfolgte eine Inkubation der verschlossenen Platte auf dem Plattenschüttler (400 rpm) für eine Stunde.

Weiterhin wurden aus 120 µl Amplification Solution I und 11,88 ml Amplification Diluent (welches zuvor 1:1 mit deionisiertem Wasser verdünnt wurde) die Amplifikationslösung I und aus 5 µl Amplification Solution II, sowie 11,995 ml Assay Buffer die Amplifikationslösung II angesetzt.

Nach Ende der Inkubationszeit und weiteren 6 Waschgängen mit 280 µl Wash Buffer wurden alle Wells der Platte mit 100 µl Amplifikationslösung I versetzt und für exakt 15 Minuten auf dem Plattenschüttler (400 rpm) inkubiert. Im Anschluss folgten wiederum 6 Waschgänge mit 280 µl Wash Buffer und die Zugabe von 100 µl Amplifikationslösung II in jedes Well. Die Platte wurde wiederum auf dem Plattenschüttler (400 rpm) für 30 Minuten inkubiert und sechsmal mit je 280 µl Wash Buffer pro Well gewaschen. Anschließend erfolgte die Gabe von 100 µl Substrat Solution (TMB) in jedes Well und eine Inkubation bei RT im Dunkeln für 15 Minuten. Die Reaktion wurde schließlich durch Zugabe von 100 µl Stop Solution in jedes Well beendet. Direkt im Anschluss erfolgte eine Absorptionsmessung bei 450 nm mit Hilfe des Ultra microplate Reader Elx 808 IU. Am PC wurden die Daten mithilfe des Programms „KC junior“ ausgewertet.

Wesen des Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Mit dem ELISA steht der aktuellen Labormedizin ein Verfahren zum Nachweis oder der Quantifizierung nahezu jedes Antikörpers oder Antigens zur Verfügung (Paulie S. et al., 2006). In der Regel werden spezifische Antikörper an eine solide Basis, beispielsweise den Boden einer 96-Well-Platte gekoppelt und anschließend einer Probe ausgesetzt. Enthält diese Probe das zu dem Antikörper passende Antigen, so entsteht ein Antigen-Antikörper-Komplex und das Antigen kann in den folgenden Waschschrritten nicht mehr von der Platte entfernt werden. Anschließend erfolgt die Zugabe eines weiteren, gegen das gebundene Antigen gerichteten Antikörpers, welcher seinerseits mit einem Enzym gekoppelt ist. Nach einem erneuten Waschschrtritt verbleibt eine Sandwich-ähnliche Struktur aus Plattenboden-Antikörper-Antigen-Antikörper mit gebundenem Enzym überall dort, wo das zu detektierende Antigen vorhanden war. Nun wird ein für das Enzym spezifisches Substrat hinzugefügt, welches beispielsweise in ein farbiges, fluoreszierendes oder lumineszierendes und somit nachweisbares Produkt umgesetzt wird. Anhand der Menge des detektierten Produktes kann auf das Vorhandensein des zu detektierenden Antigens rückgeschlossen werden (Alhajj M. et al., 2023, Paulie S. et al., 2006).

3.2.3. Statistische Methoden

Bei der statistischen Analyse wurden die Daten zunächst mittels D'Agostino und Pearson-Test auf Normalverteilung überprüft. Fand ein Vergleich von zwei Gruppen statt, so erfolgte dies bei Normalverteilung mittels Student's t-Test, bei Nicht-Normalverteilung mittels Mann-Whitney-U-Test. Wurden 3 Gruppen miteinander verglichen, so erfolgte dies bei fehlender Normalverteilung mittels One-Way-ANOVA-Analyse mit Friedmann-Test als Post-Test (ein Vergleich von 3 Gruppen mit normalverteilten Daten ergab sich nicht).

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung der Probanden

4.1.1. Gruppenverteilung anhand des Flüssigkeitsstatus

Es konnten insgesamt 40 Patienten in die Studie eingeschlossen werden. Davon wurden 17 Patienten der hypervolämischen Gruppe und 23 Patienten der normovolämischen Gruppe zugeordnet.

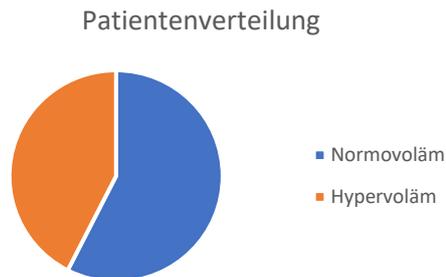


Abb. 1: Verteilung der Probanden in die Gruppen hypervoläm und normovoläm.

4.1.2. Wesentliche Patientencharakteristika

Die wesentlichen Patientencharakteristika sind in Tabelle 1 aufgeführt. Auffällige Unterschiede zeigten sich hier bei einigen Ergebnissen.

Wie aufgrund der Gruppeneinteilung zu erwarten, waren Resistenz, Reaktanz und das Körperwasser in der überwässerten Gruppe signifikant erhöht, der Phasenwinkel hingegen erniedrigt. Zudem zeigten sich in dieser Gruppe erhöhte Werte des intra- und extrazellulären Wassers (ICW und ECW), wobei das ECW sogar signifikant erhöht war ($p=0,004$).

Bezüglich der Laborparameter war unter den hypervolämischen Probanden eine leicht verminderte Serumalbuminkonzentration ($p=0,169$), sowie deutlich erhöhte Kreatinin- und CRP-Werte ($p=0,001$; $p=0,02$) festzustellen.

Des Weiteren zeigte sich die Kt/V_{Urea} der überwässerten Patienten erniedrigt ($p=0,001$). Auffällig war zudem der verminderte systolische Blutdruckabfall im Zuge der Dialyse in der hypervolämischen Gruppe. Während der systolische Blutdruck vor HD nur leicht zwischen beiden Gruppen differierte, zeigte sich nach der Dialyse ein im Vergleich deutlich höherer systolischer Blutdruck in der Gruppe der überwässerten Patienten ($p=0,093$).

Ebenso fiel auf, dass der Anteil an Patienten mit Diabetes mellitus Typ I oder II in der hypervolämischen Gruppe mehr als doppelt so hoch lag, wie in der normovolämischen Gruppe ($p=0,038$).

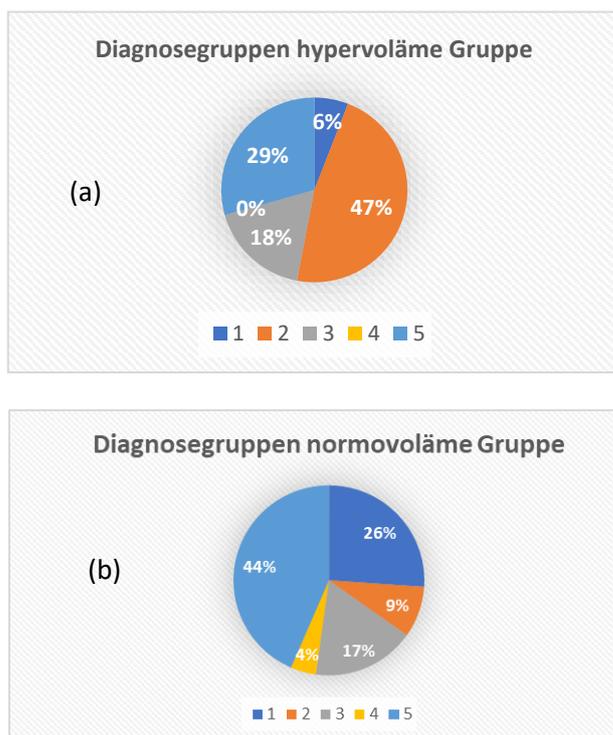
Tab. 1: Patientencharakteristika

	N (n=23)	H (n=17)	p-Wert
Anteil weiblicher Probanden in %	59,1	40,9	0,749
Alter in Jahren	57,5 ± 13,0	67,5 ± 9,9	0,019
Größe in m	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1	0,484
Gewicht in kg	77,5 ± 26,3	87,9 ± 22,9	0,210
Idealgewicht in kg	64 ± 7,4	65,8 ± 8,1	0,470
BMI in kg/m ²	26,5 ± 7,9	29,4 ± 6,7	0,249
GNRI (geriatric nutritional risk index)	110,3 ± 16,1	113,2 ± 14,5	0,587
Zeit seit Dialysebeginn in Jahren	7,6 ± 5,7	7,1 ± 10,9	0,073
Phasenwinkel in °	5,2 ± 1,2	3,75 ± 0,8	<0,001
Resistenz bei 50kHz	615,5 ± 116,9	471,1 ± 74,3	0,003
Reaktanz bei 50 kHz	55,4 ± 12,9	30,2 ± 7,5	<0,001
Körperwasser in l	37,3 ± 9,4	45,2 ± 9,2	0,012
BCM in kg	24,6 ± 9,2	23,1 ± 7,4	0,578
ICW in l	22,5 ± 3,8	24,8 ± 4,6	0,084
ECW in l	14,9 ± 6,2	20,4 ± 4,9	0,004
Ø HD-Zeit in h/Woche	13,0 ± 1,2	13,2 ± 1,3	0,583
Creatinin in µmol/l	929,8 ± 210,1	678,5 ± 246,1	0,001
Hämoglobinkonzentration in µmol/l	6,9 ± 0,7	7,0 ± 0,9	0,948
Serumalbuminkonzentration in g/l	40,33 ± 3,2	38,6 ± 4,5	0,169
Gewicht nach HD (vor dialysefreiem Intervall) in kg	78,5 ± 27,6	87,9 ± 23,1	0,259
Gewicht vor HD (nach dialysefreiem Intervall) in kg	80,7 ± 29,6	90,3 ± 23,6	0,305
Interdialytische Gewichtszunahme in kg	1,9 ± 2	3 ± 1,2	0,061
UF-Rate in ml	2771,4 ± 650,5	2818,8 ± 744,1	0,838
systol. RR vor HD in mmHg	140,5 ± 23,2	150,4 ± 24,1	0,220
diastol. RR vor HD in mmHg	74,0 ± 11,0	73,6 ± 16,8	0,923
MAP vor HD in mmHg	96,1 ± 12,5	99,2 ± 16,6	0,539
Pulsfrequenz vor HD in bpm	67,0 ± 10,6	71,5 ± 15,3	0,304
systol. RR nach HD in mmHg	126,5 ± 26,7	143,1 ± 31,3	0,093
diastol. RR nach HD in mmHg	68,9 ± 13,3	70,3 ± 20,1	0,806
MAP nach HD in mmHg	88,1 ± 16,7	84,2 ± 21,4	0,539
Pulsfrequenz nach HD in bpm	72,5 ± 9,8	68,7 ± 18,9	0,438
Kt/V	1,6 ± 0,4	1,2 ± 0,3	0,001
Rezirkulationsrate in %	2,6 ± 4,9	4,5 ± 8,4	0,640
Triglyceride in mmol/l	2,0 ± 1,1	2,0 ± 2,6	0,079
Gesamtcholesterin in mmol/l	4,0 ± 0,9	3,5 ± 1,0	0,173
HDL in mmol/l	1,0 ± 0,3	1,1 ± 0,4	0,387
LDL in mmol/l	2,0 ± 0,7	1,6 ± 0,7	0,097
LDL/HDL-Quotient	2,1 ± 0,9	1,6 ± 0,8	0,076

Lipoprotein a in mmol/l	61,5 ± 80	68,1 ± 82,4	0,789
CRP in mg/l	5,1 ± 6,8	14,2 ± 15,6	0,020
Anteil Patienten mit Diabetes in %	30,8	69,2	0,038
Anteil Pat. mit Z.n. Covid-Infekt in %	52,2	58,8	0,685

Die Abbildung 2 zeigt die Ursachen der terminalen Niereninsuffizienz für beide Probandengruppen. In Gruppe 5 (Sonstige) wurden folgende Erkrankungen eingeschlossen: ADPKD, zystische Nierendegeneration, chronische Pyelonephritis, medikamentös-toxische Schädigung, kardioresnales Syndrom, systemische Sklerodermie, systemische Leichtketten-Amyloidose, Schrumpfnieren unklarer Genese und Niereninsuffizienz unklarer Genese.

Auffällig war bei dieser Analyse, dass 47,1% der hypervolämen Gruppe von einer chronischen diabetischen Nephropathie bei Diabetes mellitus Typ 1 oder 2 betroffen waren (Diagnosegruppe 2), unter den normovolämen Patienten lag der Anteil hingegen nur bei 8,7% (Abb. 2). Dies steht im Einklang mit dem bereits zuvor festgestellten vermehrten Auftreten von Diabetes mellitus in der hypervolämen Gruppe.



Legende:

Gruppe	Terminale Niereninsuffizienz bei:
1	Glomerulonephritis
2	diabetischer Nephropathie bei Diabetes mellitus Typ 1 und 2
3	Arterieller Hypertonie
4	Interstitieller Nephritis
5	Sonstigen Ursachen

Abb. 2: Verteilung der Ursache der terminalen Niereninsuffizienz in (a) der hypervolämen und (b) der normovolämen Gruppe.

Die Verteilung der Medikamenteneinnahmen beider Gruppen ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Auffällig zeigte sich hier eine erhöhte Diuretika-Einnahme in der überwässerten Gruppe ($p=0,117$). Zudem war in dieser Gruppe auch häufiger die Gabe von Insulin zu vermerken

($p=0,013$), was sich mit dem vermehrten Auftreten der Diagnose Diabetes mellitus in der Gruppe der hypervolämischen Probanden deckt.

Tab. 2: Verteilung der Medikamenteneinnahmen in beiden Gruppen

Medikament	N (n=23)	H (n=17)	p-Wert
Antihypertensiva	$2,4 \pm 1,3$	$2,4 \pm 1,1$	0,836
Diuretika	$0,7 \pm 0,9$	$1,2 \pm 0,9$	0,117
Minoxidil	$0,2 \pm 0,4$	$0,2 \pm 0,4$	0,967
Phosphathemmer	$1,1 \pm 0,4$	$0,9 \pm 0,6$	0,290
Insulin	$0,3 \pm 0,7$	$0,9 \pm 0,9$	0,013
Immunsuppressiva	$0,1 \pm 0,3$	$0,1 \pm 0,2$	0,746
Steroide	$0,2 \pm 0,4$	$0,2 \pm 0,4$	0,757

4.2. Basale IL-10 mRNA-Expression in Vollblut und PBMCs

Zur Analyse der IL-10 mRNA wurde RNA sowohl aus dem Tempus-Tube-Vollblut, als auch aus den bereits isolierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) isoliert. Somit konnte die RNA aller Zellen des peripheren Blutes mit der der isolierten PBMCs verglichen werden. Beide Proben zeigten eine signifikant erhöhte Produktion der IL-10 mRNA in der überwässerten Gruppe (Abb. 3).

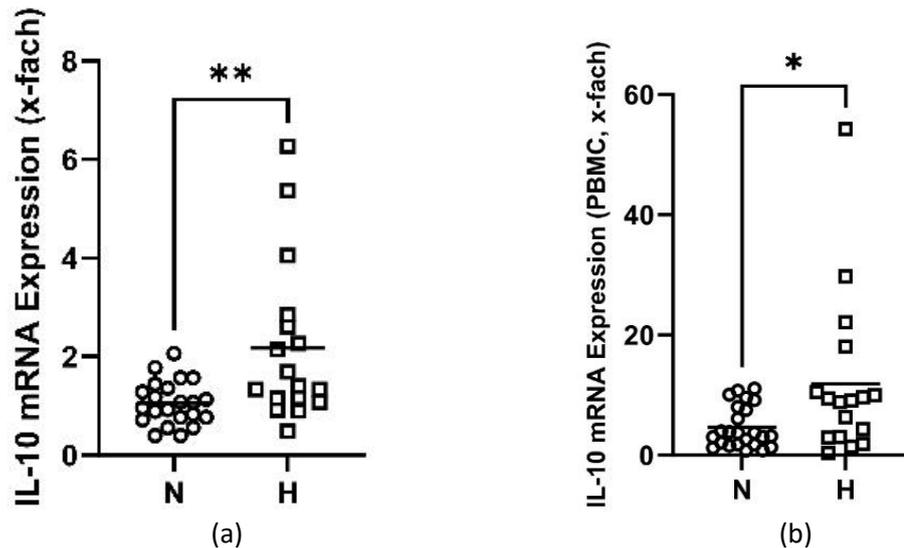


Abb. 3: IL-10 mRNA Produktion in Vollblut (a) und isolierten PBMCs (b) von normovolämischen (N) und hypervolämischen (H) CKD5-D Patienten. Dargestellt sind die Einzelwerte, sowie der Median (schwarze Linie). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

4.3. IL-10-Proteinexpression in Serum und PBMCs

4.3.1. Basale IL-10-Serumwerte

Im Unterschied zu der IL-10 mRNA zeigten sich bei der Expressionsanalyse des IL-10-Proteins im Serum kein Unterschied zwischen beiden Gruppen (Abb. 4).

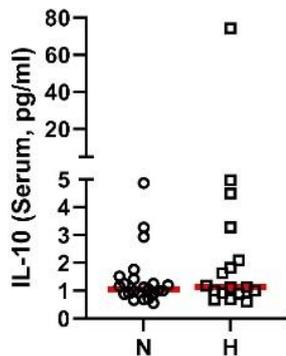


Abb. 4: IL-10 (pg/ml) im Serum von normovolämen (N) und hypervolämen (H) CKD5-D Patienten. Die Daten zeigen die Einzelwerte sowie den Median (rote Linie) der einzelnen Gruppen.

4.3.2. Basale und stimulierte monozytäre IL-10-Produktion

Auch in der FACS-Analyse zeigte sich bei den unstimulierten CD14-positiven Monozyten von hypervolämen Patienten keine erhöhte IL-10-Frequenz (Abb. 5a) oder IL-10-Expressionsdichte pro Zelle (Abb. 5b) der hypervolämen Gruppe.

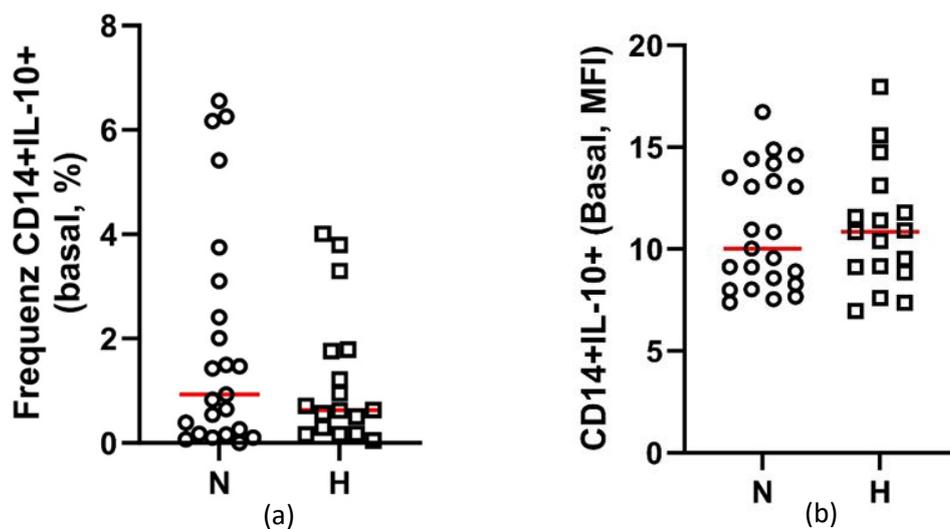


Abb. 5: Frequenzen (a) und Expressionsdichte (b) IL-10 produzierender CD14-positiver Monozyten unter basalen Bedingungen. Dargestellt sind die Einzelwerte sowie der Median (rote Linie) von normovolämen (N) und hypervolämen (H) CKD5-D Patienten.

Die Stimulation mit LPS zeigte im Vergleich zu den basalen Frequenz-Werten einen 3- bis 4-fachen Anstieg bei der relativen Zahl IL-10-produzierender Monozyten, wobei sich die Werte für beide Gruppen nicht unterschieden (Abb. 6a). Die IL-10-Expressionsdichte pro Zelle blieb nahezu unverändert (Abb. 6b).

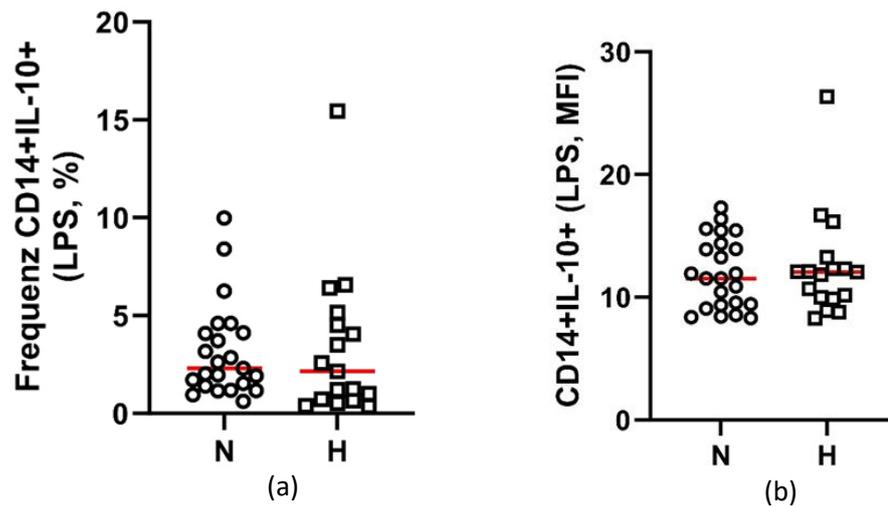


Abb. 6: Frequenzen (a) und Expressionsdichte (b) IL-10-produzierender CD14-positiver Monozyten unter LPS-Stimulation. Dargestellt sind die Einzelwerte sowie der Median (rote Linie) von normovolämien (N) und hypervolämien (H) CKD5-D Patienten.

Die gleichzeitige Stimulation mit LPS in Verbindung mit dem AhR-Antagonisten (AhR-A) führte zu einer leicht höheren Frequenz an IL-10-positiven Monozyten bei hypervolämien Patienten (Abb. 7a). Die Expressionsdichte pro Zelle ist in beiden Gruppen gleich (Abb. 7b).

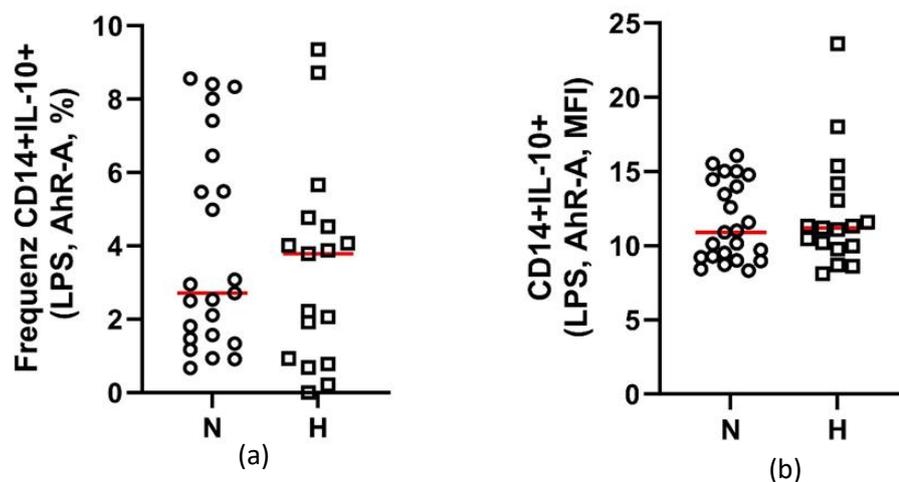


Abb. 7: Frequenzen (a) und Expressionsdichte (b) IL-10-produzierender CD14-positiver Monozyten unter gleichzeitiger Stimulation von LPS und AhR-A. Dargestellt sind die Einzelwerte sowie der Median (rote Linie) von normovolämien (N) und hypervolämien (H) CKD5-D Patienten.

Vergleicht man die stimulationsbedingten und basalen Werte monozytärer IL-10-Produktion pro Einzelzelle, so kommt es durch LPS bzw. LPS-AhR-A-Stimulation im Vergleich zu den basalen Werten zu einer kleinen, jedoch signifikanten IL-10-Expressions-Steigerung, sowohl bei normovolämen, als auch bei hypervolämen Patienten. Zwischen LPS- und LPS-AhR-A-Stimulation konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 8).

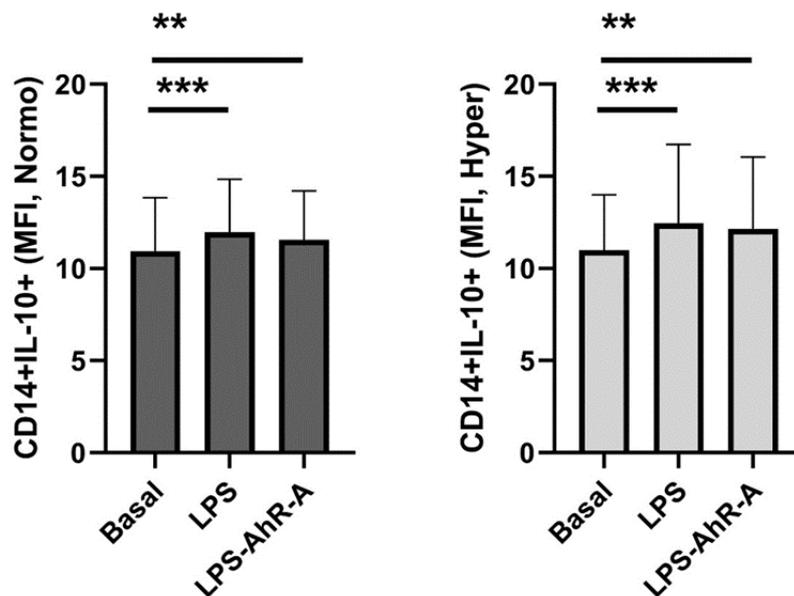


Abb. 8: IL-10 Expressionsdichte pro Zelle (MFI) in CD14-positiven Monozyten von normovolämen (Normo) und hypervolämen (Hyper) Patienten unter basalen Bedingungen, LPS-Stimulation und kombinierter LPS/AhR-A-Stimulation. Die Daten von normovolämen und hypervolämen CKD5-D Patienten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

4.3.3. Basale und stimulierte lymphozytäre IL-10-Produktion

Die relative Anzahl lymphozytärer IL-10 produzierender Zellen (% CD3+IL-10+) scheint unter hypervolämen Bedingungen nicht gesteigert. Die unstimulierten CD3-positiven Lymphozyten (Abb. 9a) der überwässerten Gruppe zeigten nur eine leicht erhöhte IL-10-Expression, welche jedoch nicht signifikant war. Auch unter den gewählten stimulatorischen Bedingungen gab es keine Unterschiede zwischen normo- und hypervolämen Patienten und keine gesteigerte IL-10-Expression im Vergleich zu basalen Werten (Abb. 9b,c).

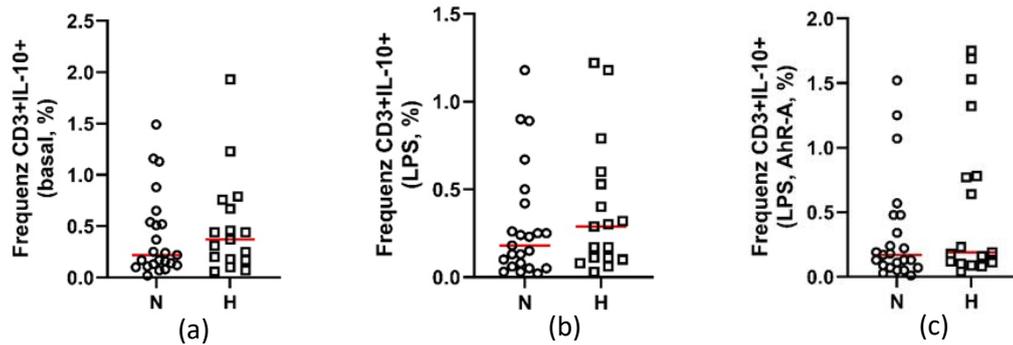


Abb. 9: Frequenzen IL-10 produzierender CD3-positiver Lymphozyten unter basalen Bedingungen (a), unter LPS-Stimulation (b) und unter gleichzeitiger Stimulation von LPS und AhR-A (c). Die Daten zeigen die Einzelwerte, sowie den Median (rote Linie) von normovolämischen (N) und hypervolämischen (H) CKD5-D Patienten.

4.4. Übersichtsgraphiken über die stimulationsbedingten Veränderungen der IL-10 mRNA-Expression in PBMCs beider Gruppen

Die LPS-Stimulation führte in beiden Gruppen zu einem signifikanten Anstieg der IL-10 mRNA-Expression durch PBMCs, wobei die hypervolämische Gruppe einen höheren IL-10 mRNA-Gehalt als die normovolämische Gruppe (Abb. 10) aufwies. Eine Stimulation mit LPS/AhR-A führte zu keinen weiteren Veränderungen im Vergleich zur reinen LPS-Stimulation (Abb. 10).

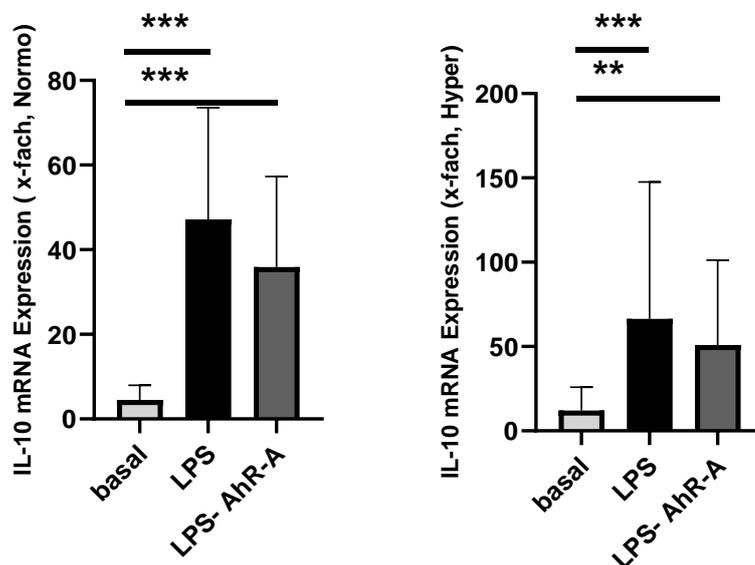


Abb. 10: IL-10 mRNA-Expression in PBMCs von normovolämischen (Normo) und hypervolämischen (Hyper) Patienten unter basalen Bedingungen, LPS-Stimulation und kombinierter LPS/AhR-A-Stimulation. Die Daten von normovolämischen und hypervolämischen CKD5-D Patienten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

4.5. STAT3, ein wichtiger Transkriptionsfaktor beim IL-10 Signaling

Der Transkriptionsfaktor STAT3 kann sowohl an einem Tyrosinrest in Position 705 (P705), als auch an einem Serinrest in Position 727 (P727) phosphoryliert werden. Wir analysierten das Vorhandensein beider Formen in Monozyten (CD86+).

4.5.1. Frequenz und Expression von CD86-STAT3 (P705)-positiven Monozyten unter basalen und stimulatorischen Bedingungen

Unter basalen Bedingungen, wie auch unter geringfügiger LPS-Stimulation (10µg/ml) und Stimulation mit LPS und einem AhR-Antagonisten (AhR-A) zeigten sich keine unterschiedlichen Frequenzen oder Expressionsdichten an STAT3 (P705) bei normo- und hypervolämischen Patienten (Abb. 11,12).

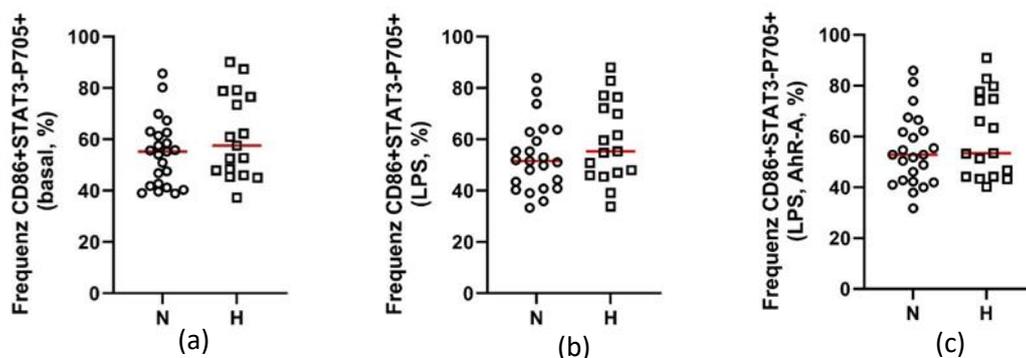


Abb.11: Frequenzen von STAT3 (P705) in CD86-positiven Monozyten unter basalen Bedingungen (a), LPS-Stimulation (b) und Stimulation mit LPS/AhR-A (c). Dargestellt sind die Einzelwerte sowie der Median (rote Linie) bei normovolämischen (N) und hypervolämischen (H) CKD5-D Patienten.

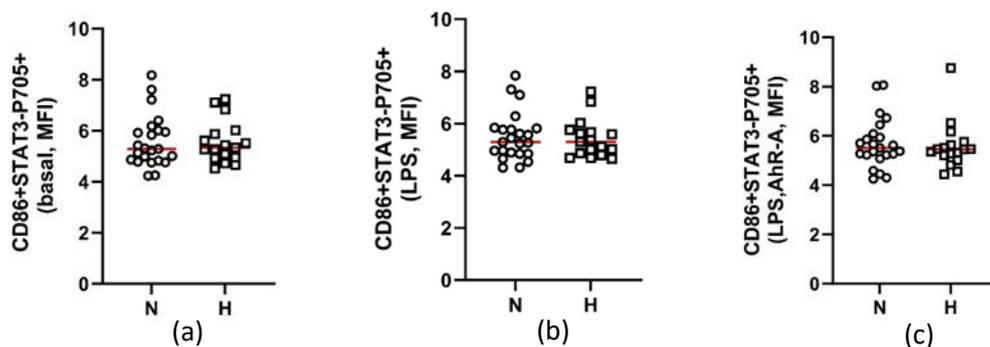


Abb.12: STAT3 (P705)-Expressionsdichte pro Zelle (MFI) in CD86-positiven Monozyten unter basalen Bedingungen (a), LPS-Stimulation (b) und Stimulation mit LPS/AhR-A (c). Dargestellt sind die Einzelwerte sowie der Median (rote Linie) bei normovolämischen (N) und hypervolämischen (H) CKD5-D Patienten.

4.5.2. Frequenz und Expression von CD86-STAT3 (P727)-positiven Monozyten unter basalen und stimulatorischen Bedingungen

Unter basalen Bedingungen waren eine signifikant erhöhte Frequenz und Expressionsdichte von STAT3 (P727) in CD86-positiven Monozyten bei normovolämen im Vergleich zu hypervolämen Patienten erkennbar (Abb. 13 a; 14 a). Eine geringfügige LPS-Stimulation (10µg/ml), sowie die gleichzeitige Stimulation mit LPS und einem AhR-Antagonisten (AhR-A) führte zu keiner unterschiedlichen Frequenz, jedoch ebenfalls zu einer signifikant erhöhten Expressionsdichte von monozytärem STAT3 (P727) bei Normovolämen (Abb. 13b, c; 14b, c).

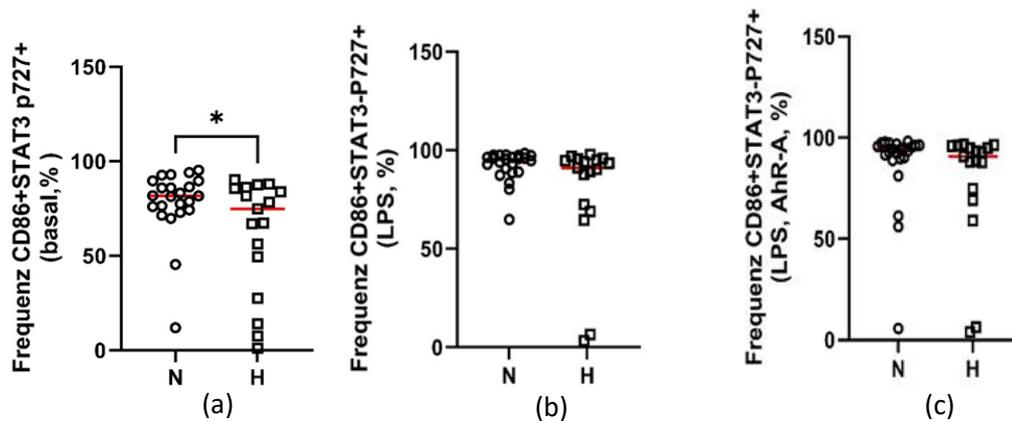


Abb. 13: Frequenzen von STAT3 (P727) in CD86-positiven Monozyten unter basalen Bedingungen (a), LPS-Stimulation (b) und Stimulation mit LPS/AhR-A (c). Dargestellt sind die Einzelwerte sowie der Median (rote Linie) bei normovolämen (N) und hypervolämen (H) CKD5-D Patienten.

*: $p < 0,05$.

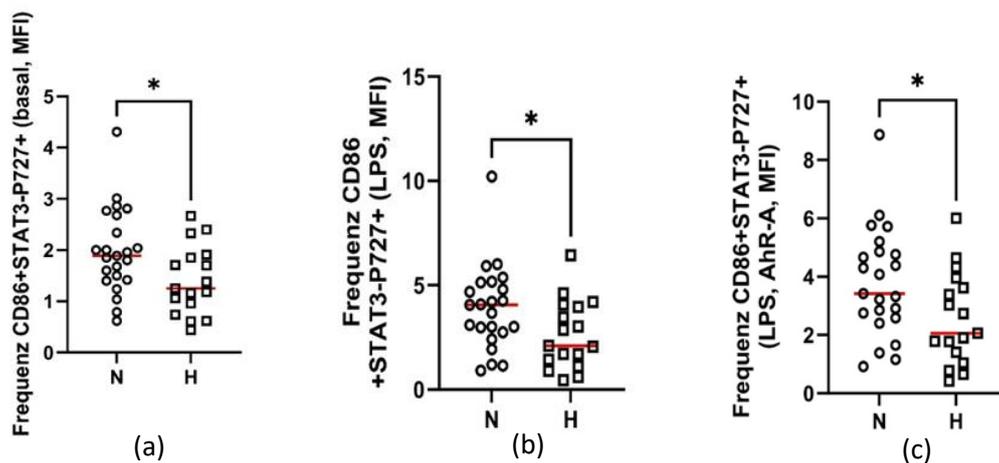


Abb.14: STAT3 (P727)-Expressionsdichte pro Zelle (MFI) in CD86-positiven Monozyten unter basalen Bedingungen (a), LPS-Stimulation (b) und Stimulation mit LPS/AhR-A (c). Dargestellt sind die Einzelwerte sowie der Median (rote Linie) bei normovolämen (N) und hypervolämen (H) CKD5-D Patienten. *: $p < 0,05$.

4.5.3. Übersichtsgraphiken über die stimulationsbedingten Veränderungen von monozytärem STAT3 (P727) in beiden Einzelkollektiven

Die Stimulation mit LPS führte in beiden Kollektiven zu einer signifikanten Erhöhung des Phosphorylierungsgrades an STAT3 (P727), wenngleich auf unterschiedlichem Niveau (Abb.15). Eine zusätzliche Behandlung mit AhR-A hatte im Vergleich zur reinen LPS-Stimulation keinen Effekt (Abb. 15).

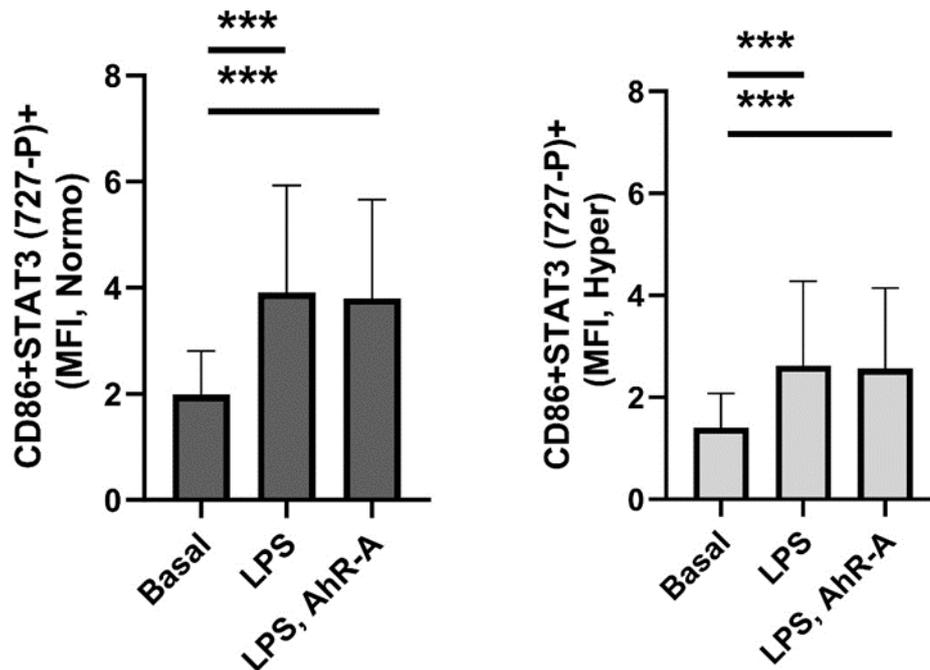


Abb. 15: STAT3 (P727)-Expressionsdichte pro Zelle (MFI) in CD86-positiven Monozyten unter basalen Bedingungen, unter LPS- sowie gleichzeitiger LPS/AhR-A-Stimulation in normovolämen (Normo) und hypervolämen (Hyper) Patienten. Die Daten von normovolämen und hypervolämen CKD5-D Patienten sind als Mittelwerte dargestellt. ***: $p < 0,001$.

4.6. miR-142-3p-Expression in PBMCs unter basalen und stimulatorischen Bedingungen

Unter basalen Bedingungen zeigte sich eine signifikant erhöhte miR-142-3p-Expression in der hypervolämen im Vergleich zur normovolämen Gruppe (Abb. 16a). Unter LPS- und gleichzeitiger LPS/AhR-A-Stimulation waren keine signifikanten Unterschiede mehr nachweisbar (Abb.16 b,c).

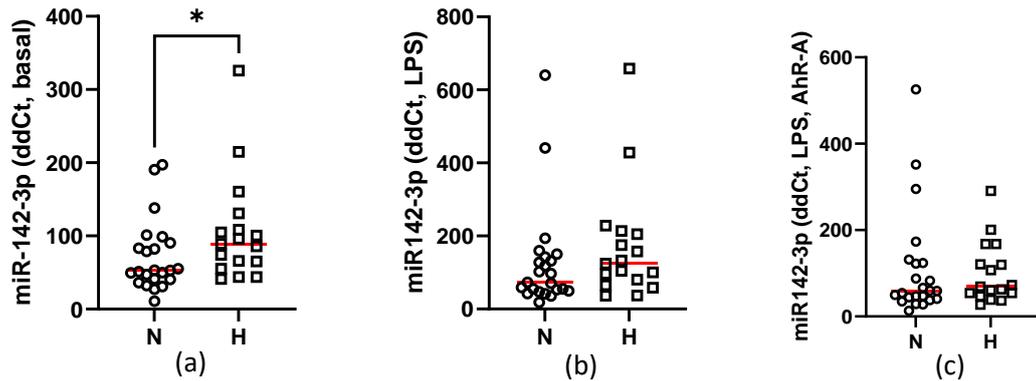


Abb. 16: miR-142-3p-Expression unter basalen Bedingungen (a), LPS-Stimulation (b) und Stimulation mit LPS/AhR-A (c). Dargestellt sind die Einzelwerte sowie der Median (rote Linie) bei normovolämen (N) und hypervolämen (H) CKD5-D Patienten. *: $p < 0,05$.

Vergleicht man die stimulationsbedingten und basalen Werte der miR-142-3p innerhalb einer Gruppe miteinander, so konnte in der normovolämen Gruppe durch LPS-Stimulation ein signifikanter Anstieg der miR-142-3p-Expression im Vergleich zu den basalen Werten erzielt werden. Die gleichzeitige Stimulation mit LPS/AhR-A führte zu keiner signifikanten Veränderung im Vergleich zu basalen Werten oder Werten unter LPS-Stimulation (Abb. 17). In der hypervolämen Gruppe unterschieden sich die basalen Expressionswerte der miR-142-3p, sowie die Werte unter LPS- und LPS/AhR-A-Stimulation nicht signifikant (Abb. 17).

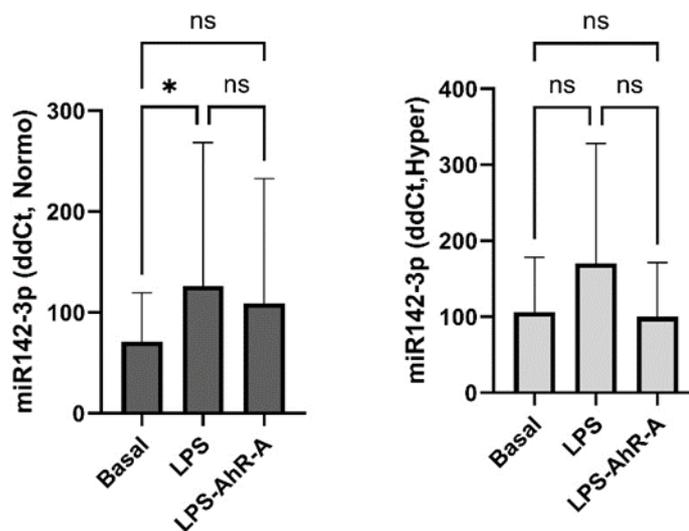


Abb. 17: Expression von miR-142-3p unter basalen Bedingungen, unter LPS- sowie gleichzeitiger LPS/AhR-A-Stimulation in normovolämen (Normo) und hypervolämen (Hyper) Patienten. Die Daten von normovolämen und hypervolämen CKD5-D Patienten sind als Mittelwerte dargestellt. *: $p < 0,05$; ns: nicht signifikant.

4.7. miR-142-5p-Expression in PBMCs unter basalen und stimulatorischen Bedingungen

Für die Expression der miR-142-5p zeigten sich keine Unterschiede zwischen der hypervolämischen und der normovolämischen Gruppe, sowohl unter basalen Bedingungen, wie auch unter LPS- und LPS/AhR-A-Stimulation (Tab. 3).

Tab. 3: Expression von miR-142-5p unter basalen Bedingungen, LPS- und gleichzeitiger LPS/AhR-A-Stimulation in normovolämischen (N) und hypervolämischen (H) Patienten.

	basal	LPS	LPS-AhR-A
N	91,9 ± 58,9	127,6 ± 89,1	129,9 ± 108,2
H	150,0 ± 166,1	200,8 ± 268,9	151,5 ± 109,9
p-Wert	0,329	0,156	0,342

5. Diskussion

Trotz stetig verbesserter Methoden in der Hämodialyse haben einige Patienten mit einer dauerhaften Überwässerung zu kämpfen. Gründe hierfür sind unter anderem die schwierige Bestimmung des korrekten Trockengewichtes und verhältnismäßig kurze Dialysezeiten, die ein eher rasches Entziehen der Flüssigkeit verlangen, was bei einem unzureichenden Flüssigkeitsnachstrom nach intravaskulär zu Kreislaufbelastungen führen kann und einen adäquaten Flüssigkeitsentzug behindert (Barenbrock M., Schäfer R.M., 2004; Doss-McQuitty S., 2014; Huang S.-H.S. et al., 2015). Überwässerte Patienten leiden unter verschiedenen Folgeerscheinungen bis hin zu erhöhten Mortalitätsraten (Wizemann V. et al., 2009), die teilweise noch nicht komplett begründet werden können. In unserer Studie konzentrierten wir uns vor allem auf den erhöhten Entzündungszustand bei hypervolämen Patienten und die Dysregulation von IL-10 als eine mögliche Ursache hierfür.

5.1. Patientencharakteristika

Für unsere Studie konnten wir 40 Probanden rekrutieren, von denen mittels bioelektrischer Impedanzmessung 17 als überwässert und 23 als normovoläm charakterisiert wurden.

Bereits mehrfach konnten erhöhte Entzündungsmarker bei Überwässerung, sowohl bei Hämodialysepatienten (Dekker M.J., Marcelli D. et al., 2017; Zsom L. et al., 2019; Risović I. et al., 2019), als auch bei Peritonealdialysepatienten (Konings C.J. et al., 2003) und Patienten mit chronischer Nierenerkrankung (Hung S.C. et al., 2014) festgestellt werden. Diese Assoziation zeigte sich auch in unserer Studie mit einem deutlich erhöhten CRP-Wert in der überwässerten Gruppe. Jedoch sollte auch beachtet werden, dass die hypervolämen Patienten weiterhin signifikant älter waren und einen deutlich höheren Anteil an Diabetes-Erkrankungen samt Insulineinnahme aufzeigten. Das ist nicht erstaunlich, da Überwässerung und auch Entzündung häufig zu den altersbedingten Krankheitsbildern gehören.

Des Weiteren zeigten Studien für überwässerte Hämodialysepatienten vermehrt kardiale Folgeerscheinungen wie linksventrikuläre Hypertrophie und Herzinsuffizienz (Wizemann V. et al., 2009), eine vermehrte arterielle Hypertonie (Wizemann V. et al., 2009) und eine deutlich erhöhte Mortalität (Dekker M.J., Marcelli D. et al., 2017; Wizemann V. et al., 2009). In letztgenannter Studie zeigte sich eine signifikante Erhöhung des postdialytischen systolischen Blutdrucks in der überwässerten Gruppe, während sich der Blutdruck beider Gruppen vor der Behandlung nicht unterschied (Wizemann V. et al., 2009). Auch bei uns zeigte sich der postdialytische systolische Blutdruck in der Gruppe der hypervolämen Patienten tendenziell, allerdings nicht signifikant erhöht.

Eine Erniedrigung der Serumalbuminkonzentration scheint typisch für hypervoläme Hämodialysepatienten zu sein. Dies konnte bereits in anderen Studien belegt werden (Dekker, M.J.E., Marcelli D. et al., 2017; Antlanger M. et al., 2013; Kim Y.J. et al., 2015; Zsom L. et al., 2019). Hierfür sind mehrere Erklärungen denkbar. Möglich wäre ein Verdünnungseffekt des Blutes durch die Überwässerung; es konnte jedoch auch eine Korrelation zwischen verminderten Albumin- und erhöhten CRP-Werten gezeigt werden (Sheinenzon A. et al., 2021), so dass eine Verminderung der Serumalbuminkonzentration im Zusammenhang mit dem vermehrt vorliegenden Entzündungszustand bei Hypervolämien ebenfalls denkbar wäre.

Des Weiteren lag in der überwässerten Gruppe ein signifikant höherer Kreatininwert, vereinbar mit einer schlechteren Nierenfunktion, und eine signifikant verminderte Kt/V_{urea} , welche eine verminderte Adäquatheit der Dialyse anzeigt, vor.

5.2. IL-10-Analyse

Generell kommt es bei Hämodialysepatienten häufiger zu entzündungsauslösenden Zuständen, beispielsweise durch das erhöhte Vorliegen von Urämietoxinen, den wiederholten Kontakt des Blutes mit Fremdoberflächen in Form von Dialysemembranen und teilweise auch durch bakterienkontaminierte Dialysate (Girndt M., 2002). Obwohl diese Ursachen auf alle Hämodialysepatienten gleichermaßen zutreffen, weisen überwässerte Hämodialysepatienten doch vermehrt gesteigerte Entzündungsparameter auf, was für häufigere oder verlängerte Entzündungsreaktionen spricht. Somit könnte in Betracht gezogen werden, dass unter hypervolämien Patienten möglicherweise ein Defekt in der Gegenregulation entzündlicher Vorgänge vorliegt. Ein wesentlicher antiinflammatorischer Faktor in diesem Zusammenhang ist das Interleukin-10. Hierbei handelt es sich um ein Zytokin, das in vielen Immunzellen, darunter Monozyten, Makrophagen und T- Zellen, aber auch in B-Zellen oder dendritischen Zellen gebildet wird und eine Vielzahl antiinflammatorischer Signalwege auslöst. Es nimmt unter anderem Einfluss auf die Zytokinfreisetzung von Monozyten und Makrophagen, aber auch auf die Aktivität von CD4-positiven T-Zellen oder regulatorischen T-Zellen (Rutz S. et al., 2016). Ein vermindertes Vorliegen dieses Zytokins könnte somit die reduzierte Fähigkeit bedeuten, vorliegende Entzündungsreaktionen physiologisch einzudämmen. Wir analysierten daher das Vorliegen von IL-10 auf Protein- und mRNA-Ebene.

5.2.1. Basale IL-10 mRNA-Expression

Sowohl in Vollblut, als auch in isolierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) zeigten sich in der Gruppe der hypervolämien Patienten signifikant erhöhte IL-10 mRNA-Werte. Dies spricht dafür, dass im Zuge der gesteigerten Entzündungsreaktion, einhergehend mit

erhöhten Entzündungsparametern, physiologisch korrekt auch eine antiinflammatorische Gegenregulation über erhöhte Transkription der IL-10 mRNA eingeleitet wird.

5.2.2. Stimulierte IL-10 mRNA-Expression und IL-10-Proteinexpression in Serum und PBMCs

Betrachtet man nun die IL-10-Proteinexpression im Serum, wie auch unter basalen ex-vitro-Bedingungen in Monozyten und Lymphozyten, so zeigt sich hier differierend zu den mRNA-Werten kein Unterschied zwischen der normovolämen und der hypervolämen Gruppe. Diese Auffälligkeit konnte bereits in einer anderen Studie festgestellt werden (Ulrich C. et al., 2020) und deutet stark auf eine veränderte posttranskriptionelle Beeinflussung der IL-10-Produktion bei hypervolämen Patienten hin. Es scheint, als würde bei hypervolämen Patienten zwar genug IL-10 mRNA gebildet, jedoch durch eine Hemmung auf posttranskriptioneller oder translationaler Ebene nicht entsprechend viel IL-10-Protein exprimiert. Dass die IL-10-Proteinexpressionswerte von Serum und PBMCs kongruent sind, validiert unser Ergebnis zum einen und belegt zum Zweiten, dass die wesentliche IL-10-Produktion im Blut durch die PBMCs übernommen wird.

Um eine Infektion bzw. den Kontakt mit Bakterien zu simulieren und eine weitere Steigerung der Entzündungsreaktion, sowie auch der physiologischen regulatorischen Gegenregulationen auszulösen, stimulierten wir die Proben mit LPS. Des Weiteren untersuchten wir den Einfluss der Zugabe eines Antagonisten des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors. Hierbei handelt es sich um einen Ligand-aktivierten Transkriptionsfaktor, zu dessen Liganden auch Urämietoxine wie z.B. Indoxylsulfat zählen (Gutiérrez-Vázquez C. et al., 2018). Bei chronisch Nierenkranken konnte bereits korrelierend mit verminderter GFR und erhöhter Indoxylsulfat-Konzentration eine deutlich erhöhte AhR-Aktivierung nachgewiesen werden (Dou L. et al., 2018). Zudem gab es Hinweise darauf, dass dieser Transkriptionsfaktor in die IL-10-Produktion von Makrophagen involviert ist (Zhu J. et al., 2018). Da im Falle unserer Hämodialysepatienten ebenfalls mit erhöhten Urämietoxinen und einer daraus resultierenden erhöhten AhR-Aktivität zu rechnen ist, untersuchten wir, ob und wie sich eine Hemmung dieses Rezeptors auf die IL-10-Produktion auswirkt.

Unter LPS-Stimulation zeigte sich in beiden Gruppen ein deutlicher Anstieg der IL-10-positiven Monozyten, sowie der IL-10-Expressionsdichte in diesen Zellen, wobei kein Unterschied zwischen hypervolämen und normovolämen Patienten zu verzeichnen war. Die gemeinsame Zugabe von LPS und AhR-Antagonist führte im Vergleich zur LPS-Stimulation zu keinem weiteren Anstieg der IL-10-Expressionsdichte der Monozyten, lediglich deren IL-10-Expressionsfrequenz stieg in der hypervolämen Gruppe leicht, jedoch nicht signifikant, an. Der Anteil IL-10-

exprimierender Lymphozyten änderte sich weder durch Stimulation mit LPS, noch durch Stimulation mit LPS/AhR-A und zeigte auch keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

Eine Stimulation der IL-10-Produktion durch LPS in Monozyten, nicht aber in Lymphozyten ist durch die verschiedenen Signalwege der einzelnen Zellgruppen zu erklären. Die Stimulation der IL-10-Produktion in Monozyten und Makrophagen wird wesentlich über sogenannte TLRs (Toll-like Rezeptoren) vermittelt. Hierbei handelt es sich um Rezeptoren, die mikrobielle Produkte, unter anderem auch LPS, erkennen können. T-Zellen hingegen werden im Rahmen ihrer vollen Aktivierung zur IL-10-Produktion angeregt. Hierfür ist in der Regel die Simulation über den T-Zell-Rezeptor in Kombination mit der Präsenz spezieller Zytokine notwendig (Rutz S. et al., 2016). Diese T-Zell-Aktivierung konnten wir mit reiner LPS-Stimulation nicht erzielen.

Auf mRNA-Ebene zeigte sich ebenfalls in beiden Gruppen ein signifikanter Anstieg der IL-10 mRNA-Expression unter LPS-Stimulation im Vergleich zu basalen Bedingungen. Es war jedoch, wie schon unter basalen Bedingungen, eine deutlich erhöhte IL-10 mRNA-Expression unter hypervolämen im Vergleich zu normovolämen Patienten nachweisbar. Die Stimulation mit LPS/AhR-A zeigte keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur reinen LPS-Stimulation.

Somit zeigt sich, dass die LPS-vermittelte Induktion der monozytären IL-10-Genexpression generell nicht eingeschränkt zu sein scheint, die Translation der mRNA jedoch auch hier weiterhin gestört bleibt. So können eigentlich höhere IL-10 mRNA-Werte der hypervolämen Patienten nur eine IL-10-Proteinexpression erzielen, die denen der normovolämen Patienten gleicht.

Der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) scheint entgegen unserer Vermutung keine wesentliche Rolle bei der IL-10-Regulation in diesen Zellen zu spielen.

5.3. STAT3-Expression

Weiterhin untersuchten wir die Expression des Transkriptionsfaktors STAT3, für den bereits gezeigt werden konnte, dass er zum einen die IL-10-Genexpression über Bindung an der Promotorregion des IL-10-Gens steigern kann (Benkhart E.M. et al., 2000) und zum anderen auch wesentlich an der Downstream-Vermittlung von IL-10-Effekten beteiligt ist (Lang R. et al., 2002; Takeda K. et al., 1999).

Dieser Transkriptionsfaktor wird durch Phosphorylierung eines Tyrosinrestes an Position 705 (Tyr705) aktiviert, dimerisiert daraufhin, transloziert in den Kern und interagiert mit der DNA. Die Tyrosinphosphorylierung wird häufig durch Januskinasen (JAKs), aber auch durch Rezeptor- und Nichtrezeptortyrosinkinase vermittelt. Zu den Stimuli, welche eine STAT3-Aktivierung

auslösen, zählen unter anderem Zytokine und Wachstumsfaktoren (Hu W. et al., 2018; Chen Q. et al., 2019). Zudem kann STAT3 auch an einem Serinrest an Position 727 (Ser727) phosphoryliert werden. Als verantwortliche Kinasen wurden hier unter anderem bereits mTOR, die ERK-Familie der MAP-Kinasen (MAPK), sowie Proteinkinasen C δ und C ϵ identifiziert (Chung J. et al., 1997; Sakaguchi M. et al., 2012; Yokogami K. et al., 2000; Jain N. et al., 1999; Aziz M.H. et al., 2010).

Wir untersuchten nun die Expression von an Tyr705-phosphoryliertem (STAT3 (P705)) und an Ser727-phosphoryliertem STAT3 (STAT3 (P727)) in Monozyten. Sowohl unter basalen, als auch unter LPS- und LPS/AhR-A-Stimulation konnten wir keine Unterschiede in der STAT3 (P705)-Expression zwischen normo- und hypervolämer Gruppe und auch keine Veränderung der Expression durch Stimulation feststellen.

Für STAT3 (P727) zeigten sich jedoch sowohl unter basalen, als auch unter stimulatorischen Bedingungen signifikant erhöhte Expressionsdichten in den Monozyten der normovolämen Gruppe. Des Weiteren war generell in beiden Gruppen ein signifikanter Anstieg der STAT3 (P727)-Expressionsdichte durch LPS-Stimulation zu sehen. Die Expressionsdichten von LPS und LPS/AhR-A-Stimulation unterschieden sich wiederum nicht signifikant. Somit scheint eine LPS-vermittelte Steigerung der Phosphorylierung des Serinrestes an Position 727 von STAT3 vorzuliegen, die zwar in beiden Patientengruppen stattfindet, ihren Effekt jedoch in der hypervolämen Gruppe nicht voll entfalten kann. AhR scheint auch hier keine wesentliche Rolle zu spielen.

Nähere Recherchen zu dem Effekt der Ser727-Phosphorylierung von STAT3 zeigten, dass diese überwiegend in der erhöhten Aktivität von STAT3 mit verstärkter DNA-Bindung und Genexpression zu resultieren scheint (Yokogami K. et al., 2000; O'Rourke L. et al., 2002; Aziz M.H. et al., 2010). Im Zusammenhang mit der IL-6-assoziierten Ser727-Phosphorylierung von STAT3 durch Proteinkinase C δ wurden aber auch negative Effekte bezüglich DNA-Bindung und Transkriptionsaktivität beschrieben (Jain N. et al., 1999).

Wie bereits zuvor erwähnt, konnte beschrieben werden, dass STAT3 die Transkription des IL-10 Gens verstärken kann (Benkhart E.M. et al., 2000). Eine viel wichtigere Rolle scheint STAT3 jedoch bei der Vermittlung immunsuppressiver Effekte von IL-10 (Downstream) zu haben, indem es seinerseits Einfluss auf die Genexpression nimmt (Murray P., 2005). In einer Studie von Lang und Kollegen konnte für alle durch IL-10 gesteigert exprimierten Gene eine STAT3-Abhängigkeit nachgewiesen werden (Lang R. et al., 2002). Die hohe Relevanz von STAT3 im Rahmen der Immuntoleranz konnte vielfach gezeigt werden. In Makrophagen und neutrophilen

Granulozyten von Mäusen ohne STAT3-Gen waren alle IL-10-vermittelten immunsuppressiven Effekte völlig aufgehoben, was in einer erhöhten Produktion inflammatorischer Zytokine und einer erhöhten Anfälligkeit für einen Endotoxin-Schock resultierte (Takeda K. et al., 1999). Löste man unter STAT3-defizienten Bedingungen in oben genannten Zellen eine septische Peritonitis aus, so waren hier Entzündung, Zytokinproduktion und Organschäden deutlich massiver ausgeprägt; die Makrophagen zeigten eine verschlechterte bakterizide Aktivität (Matsukawa A. et al, 2003). Zuletzt konnte für Makrophagen mit blockierter STAT3-Genexpression gezeigt werden, dass nahezu alle IL-10-vermittelten Effekte gehemmt waren. Bis auf eine kurzfristige TNF α -Bildung zeigte sich zudem auch die Hemmung der LPS-vermittelten Produktion proentzündlicher Zytokine von STAT3 abhängig (Williams L. et al., 2004).

Betrachtet man nun unsere Ergebnisse, die in der hypervolämen Gruppe eine deutliche Erniedrigung des an Ser727-phosphorylierten STAT3, nicht aber des Tyr705-phosphorylierten STAT3 aufzeigt, und bezieht mit ein, dass die Serinphosphorylierung in den meisten Fällen eine Funktionssteigerung von STAT3 bewirkt, so wäre hiermit durchaus eine Reduktion der Immuntoleranz bzw. Immunsuppression, einhergehend mit einer gesteigerten proinflammatorischen Zytokinproduktion erklärbar.

Erwähnt werden sollte an dieser Stelle auch das Ergebnis zweier Studien, die herausfanden, dass eine STAT3-Phosphorylierung an Ser727 eine gesteigerte Dephosphorylierung von Tyr705 und damit Inaktivierung und nur kurze Aktivitätsdauer von STAT3 bedingte. Beide Arbeiten untersuchten jedoch die IL-6-vermittelte Aktivierung von STAT3 (Wakahara R. et al., 2012; Yang J. et al., 2020). Betrachtet man weiterhin die Studie von Braun und Kollegen, die zeigen konnten, dass eine IL-6-Stimulation lediglich zu einer kurzen, eine IL-10-Stimulation jedoch zu einer anhaltenden STAT3-Aktivierung führte und dass das Verkürzen der IL-10-bedingten STAT3-Aktivität zu einer transkriptionellen und sekretorischen Antwort ähnlich der IL-6-vermittelten Aktivierung führte, so ist anzunehmen, dass dieser Mechanismus speziell die IL-6-vermittelte STAT3-Aktivierung betrifft. Er ist hierbei vermutlich notwendig, um die Aktivitätsdauer von STAT3 zu vermindern und so einen Unterschied zu der langanhaltenden IL-10-vermittelten STAT3-Aktivierung zu erreichen (Braun D.A. et al., 2013).

Wie könnte nun die unterschiedliche Phosphorylierung von STAT3, möglicherweise in Abhängigkeit von IL-10 zustande kommen?

Klar ist, dass die Phosphorylierung von Tyrosin und Serin über verschiedene Signalwege vermittelt wird. Einer der am besten bekannten IL-10-Signalwege ist die Aktivierung der

Tyrosinkinase JAK1 und TYK2, welche ihrerseits unter anderem STAT3 phosphorylieren, allerdings lediglich am Tyrosinrest (Moore K.W. et al., 2001).

Einen möglichen Signalweg, der über IL-10 zu einer Ser727-Phosphorylierung führen könnte, wurde in einer Studie von Zhu und Kollegen aufgezeigt. Sie konnten nachweisen, dass IL-10 eine Aktivierung von AMPK (Adenosin 5'-Monophosphat-aktivierte Protein-Kinase) und in weiterer Folge eine Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges auslöste, welche letztendlich in einer Aktivierung von mTORC1 resultierte. mTORC1 wiederum ist in der Lage, STAT3 an Ser727 zu phosphorylieren. Zuletzt zeigte die Studie auch, dass eine durch das Fehlen von AMPK α 1 (einer katalytischen Untereinheit von AMPK) verminderte IL-10-induzierte STAT3-Phosphorylierung mit einer verminderten Reduktion LPS-induzierter proinflammatorischer Zytokine einherging (Zhu YP. et al., 2014). Auch weitere Studien belegten die antiinflammatorische Wirkung von AMPK (Sag D. et al., 2008), PI3K (Medina E.A. et al., 2010) und mTOR (Weichhardt T. et al., 2008; Weichhardt T. et al., 2011).

Im Fall der hypervolämischen Patienten wäre somit die Vermutung möglich, dass die ausbleibende Steigerung der IL-10-Produktion zu einer reduzierten mTOR-Aktivierung und resultierender verringerter STAT3-Ser727-Phosphorylierung führt. Somit wäre die STAT3-Aktivität reduziert und könnte zu verminderten antiinflammatorischen Signalwegen nur vermindert aktivieren.

5.4. miR-142-Analyse

Mit STAT3 (P727) konnten wir einen vermutlich relevanten Downstream-Effektor von IL-10 identifizieren, der möglicherweise durch IL-10 Mangel vermindert vorliegt.

Ein weiteres wesentliches Ziel war es, den Grund für die verminderte IL-10 mRNA Translation bei vorausgehender regulärer IL-10 mRNA-Transkription zu identifizieren.

Da wir aufgrund der vorliegenden Diskrepanz von IL-10 mRNA und IL-10-Proteinexpression von einer Regulation auf Translationsebene ausgingen, konzentrierten wir uns auf die Analyse von microRNAs in den zuvor isolierten PBMCs. Diese einzelsträngigen, nichtcodierenden RNA-Moleküle mit einer Länge von circa 19 bis 24 Basenpaaren sind in der Lage, die Translation von mRNA zu behindern. Entweder binden sie exakt komplementär eine spezifische Region der untranslatierten Region (UTR) der mRNA und führen zu ihrem Abbau, bei nicht komplett komplementärer Paarung führen sie dagegen zu einer Behinderung der Initiation oder Elongation (Sharma S., 2017). Bereits mehrere Studien konnten microRNAs mit einem Einfluss auf die IL-10 mRNA-Translation identifizieren, darunter direkte Hemmungen unter anderem

durch miR-142-3p (Ding S. et al., 2012), miR106a (Sharma A. et al., 2009) oder Let-7 (Swaminathan S. et al., 2012).

Wir entschieden uns letztendlich für eine Analyse unserer Proben auf das Vorliegen der beiden Isoformen der miR-142; miR-142-3p und miR-142-5p; da sich bei dieser microRNA generell eine große Beteiligung an Regulationen des Immunsystems und der Immunität zeigt. Unter anderem scheint sie involviert in die Makrophagenpolarisation (Xu S. et al., 2014), die Aktivität CD4-positiver T-Zellen (Huang B. et al., 2009; Kleinstauber K. et al., 2013), sowie regulatorischer T-Zellen (Huang B. et al., 2009; Gao J. et al., 2019; Lu Y. et al., 2018), dendritischer Zellen (Mildner A. et al., 2013) und deren Interaktionen untereinander zu sein.

Bei unserer Analyse zeigte sich nun ein signifikanter Unterschied für die miR-142-3p-Expression. Diese war bei hypervolämen Patienten signifikant höher, als bei normovolämen. Verknüpft man die translationsinhibitorischen Mechanismen der microRNAs mit dem Fakt, dass bei hypervolämen Patienten eine Behinderung der IL-10 mRNA-Translation vorzuliegen scheint, so liegt die Vermutung nahe, dass miR-142-3p die IL-10 mRNA-Translation in dieser Gruppe aufgrund ihrer gesteigerten Expression verstärkt behindert.

Eine Stimulation mit LPS ging in der normovolämen Gruppe mit einem signifikanten miR-142-3p-Anstieg einher. Der LPS-stimulierte Wert wies keinen weiteren klaren Unterschied zur Expression unter kombinierter LPS/AhR-A-Stimulation auf. In der hypervolämen Gruppe waren sowohl bei LPS-, als auch bei LPS/AhR-A-Stimulation keine signifikanten Unterschiede zu den basalen Werten zu registrieren. Dass eine LPS-Stimulation nur in der normovolämen, nicht aber in der hypervolämen Gruppe eine signifikante Erhöhung der miR-142-3p-Expression nach sich zieht, könnte dafür sprechen, dass in der überwässerten Gruppe bereits unter basalen Bedingungen ein Großteil der Expressionskapazität für miR-142-3p genutzt wird und unter zusätzlicher Stimulation nur noch eine leichte Steigerung der Produktion dieser miR möglich ist. Eine Beeinflussung des AhR-Rezeptors scheint in beiden Gruppen keine Auswirkung auf die Produktion der miR-142-3p zu haben.

Die miR-142-5p zeigte hingegen keine Unterschiede zwischen der hypervolämen und der normovolämen Gruppe, weder unter basalen, noch unter stimulatorischen Bedingungen.

Eine Hemmung der IL-10-Translation durch miR-142-3p konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden. Ding und Kollegen konnten nachweisen, dass in CD4-positiven T-Zellen von Patienten mit systemischen Lupus erythematodes eine Downregulation von miR-142-3p und miR-142-5p und eine negative Assoziation dieser miRs mit IL-10, CD84 sowie SAP vorlag. Im

weiteren Verlauf konnten sie belegen, dass miR-142-3p direkt die IL-10- sowie die CD84-Translation hemmt, während die miR-142-5p eine hemmende Wirkung auf die Translation des SAP-Proteins hatte (Ding S. et al., 2012). Dies deckt sich mit unserer Studie, die ebenfalls nur für miR-142-3p einen Einfluss auf IL-10 nachweisen konnte, nicht jedoch für miR-142-5p.

Für induzierte regulatorische T-Zellen konnte eine weitere Studie weiterhin ebenfalls zeigen, dass eine Überexpression von miR-142-3p mit signifikantem Absinken von IL-10 (und TGF- β) einherging (Gao J. et al., 2019). Ein Knockout von miR-142 in dendritischen Zellen bewirkte in einer anderen Studie eine gesteigerte IL-10-Produktion (Sun Y. et al., 2017).

Somit konnte für T-Zellen sogar bereits eine direkte Hemmung der IL-10-Translation durch miR-142-3p nachgewiesen werden. Eine Hemmung antiinflammatorischer bzw. Steigerung proinflammatorischer Mechanismen durch miR-142-3p scheint in dieser Zellgruppe zudem auch über weitere Signalwege zu erfolgen. So ist miR-142-3p in der Lage, die cAMP-produzierende Adenylatcyclase 9 (AC9) in „klassischen“ CD4-positiven T-Zellen zu hemmen, was einen niedrigen cAMP-Spiegel in diesen Zellen bewirkt, der wiederum für ihren Aktivitätszustand benötigt wird. Passend dazu, sind FOXP3-positive T-regulatorische Zellen in der Lage, cAMP über „Gap Junctions“ auf diese T-Zellen zu übertragen und so ihre Aktivität zu hemmen. Diese regulatorischen T-Zellen wiederum erreichen die für sie typischen hohen cAMP-Spiegel über eine Herunterregulierung der miR-142-3p mittels FOXP3 und damit eine erhöhte AC9-Aktivität (Huang B. et al., 2009). Weitere Studien konnten zudem zeigen, dass eine Hemmung von miR-142-3p in induzierten, sowie in thymusgereiften regulatorischen T-Zellen zu einem gesteigerten Überleben und einer erhöhten Aktivität führt (Gao J. et al., 2019; Lu Y. et al., 2018). Die miR-142-3p scheint also die Aktivität von T-Effektorzellen (vor allem CD4-positiven) zu steigern und immunmodulatorische T-regulatorische Zellen zu hemmen.

Für Monozyten/Makrophagen konnte nach Wissen der Autorin bis jetzt noch keine direkte Hemmung der IL-10-Translation durch miR-142-3p nachgewiesen werden. Auch generell scheint diese microRNA in genannten Zellen eine vielgestaltige Rolle mit teils pro- und teils antiinflammatorischen Effekten einzunehmen.

Kongruent mit der von uns vermuteten eher proinflammatorischen Wirkung finden sich Studien, die nachweisen konnten, dass die durch CSF1 induzierte Polarisation von Monozyten in den antiinflammatorischen M2-Makrophagen-Phänotyp mit einer stark verminderten miR-142-3p-Expression einherging (Shi J. et al., 2020). Auch konnte in tumorinfiltrierenden Makrophagen, welche in der Regel auch den tumorunterstützenden und immunsuppressiven Phänotyp aufweisen, eine starke Herunterregulierung von miR-142-3p nachgewiesen werden. In

derselben Studie wurden zudem die miR-Expressionen von M1- und M2-Makrophagen verglichen und erneut bestätigt, dass M2-Makrophagen deutlich weniger miR-142-3p aufwiesen. Eine Überexpression von miR-142-3p induzierte zudem die selektive Apoptose von M2-Makrophagen (Xu S. et al., 2014).

Im Gegensatz dazu lieferten jedoch auch mehrere Studien Hinweise auf eine antientzündliche Wirkung von miR-142-3p in Monozyten oder Makrophagen.

In Makrophagen von Mäusen konnte gezeigt werden, dass miR-142-3p die IL-6-Translation hemmt (Liu Y. et al., 2016). Weiterhin bewirkte eine Überexpression von miR-142-3p in Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und PBMCs eine Hemmung von Phagozytose und Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF α , IL-6 und IL12-p40 (Naqvi A. R. et al., 2015). Ein ähnlicher Effekt bezüglich der Zytokinproduktion konnte auch bei gesteigerter miR-142-3p-Expression während der Monozytendifferenzierung zu Makrophagen und zu DCs nachgewiesen werden (Fordham J. B. et al., 2015).

Zusammengefasst scheint miR-142-3p in PBMCs mit vielen verschiedenen Signalwegen zu interagieren und vielgestaltige Wirkungen zu erzielen.

Bezüglich der T-Zellen ist eher eine proinflammatorische Wirkung zu verzeichnen. In diesen Kontext fügt sich die von uns vermutete Hemmung der IL-10 mRNA-Translation gut ein. In Monozyten und Makrophagen scheinen die Effekte komplexer und die Wirkungen der miR-142-3p teilweise dichotom zu sein. Nichtsdestotrotz wäre es auch hier durchaus möglich, dass diese microRNA einen regulierenden Einfluss auf die Translation von IL-10 hat.

Inwiefern die in unserer Studie gezeigten Effekte monozytär oder lymphozytär bedingt sind – möglicherweise treten sie sogar in beiden Zelltypen auf – bleibt Spekulation. Hierzu ist es notwendig, nicht nur PBMCs zu analysieren, sondern Monozyten und Lymphozyten getrennt zu isolieren und zu untersuchen.

Ebenfalls sind weiterführende Versuche wie Transfektionsexperimente zu empfehlen, um den hemmenden Einfluss der miR-142-3p auf die IL-10 mRNA abschließend zu beweisen.

Bei anschließenden Forschungen könnten zudem zusätzliche Folgen der erhöhten miR-142-3p, abseits der IL-10-Regulation in Betracht gezogen werden. Besonders bezogen auf die T-Zellen ist es nicht auszuschließen, dass das gesteigerte Vorliegen der miR-142-3p bei hypervolämen Patienten noch andere Effekte bedingt, die den Entzündungszustand aufrechterhalten. Hier

wären beispielsweise eine übermäßige Aktivierung der CD4+-T-Effektorzellen und eine übermäßige Hemmung T-regulatorischer Zellen mögliche Ursachen.

Trotz seiner teils gegensätzlichen Effekte auf Makrophagen wäre es auch in dieser Zellgruppe möglich, dass miR-142-3p über IL-10 hinaus Einfluss auf das Persistieren des Entzündungszustandes nimmt.

Hier wäre eine negative Beeinflussung der antiinflammatorischen M2-Makrophagen, beispielsweise durch eine erhöhte Apoptoserate in dieser Zellgruppe, in Betracht zu ziehen.

Diese Vermutungen sind jedoch lediglich hypothetische Annahmen auf Basis der Erkenntnisse anderer Studien. Besonders in Bezug auf Hypervolämie sind noch weitere Forschungen notwendig.

5.5. Einschränkungen

Als Einschränkungen sind die relativ geringe Probandenzahl, die leicht differierende Harnstoffeliminationsrate (Kt/V), die aus einer im Quartal durchgeführten Referenzdialyse entnommen wurde, sowie die nicht altersgepaarte Gruppeneinteilung zu nennen. Die Rezirkulationsraten und die wöchentlichen Dialysezeiten differierten nicht zwischen beiden Gruppen. Deshalb lassen die Daten eine gute Einschätzung zur IL-10-Expression bei hypervolämen und normovolämen Dialysepatienten, sowie einen möglichen Einfluss durch miR-142-3p zu. Anschließende Versuche wie Transfektionsexperimente zum endgültigen Beweis der hemmenden Wirkung der miR-142-3p und weiterführende Studien mit größeren Patientenkollektiven sollten ergänzend durchgeführt werden.

Des Weiteren wiesen einige Probanden eine konstante, niedrig-dosierte Einnahme von Steroiden auf ($n=7$; $4,3 \pm 2,7$ mg/d Prednisolonäquivalenz), was theoretisch die Funktion der Immunzellen beeinträchtigen könnte. Diese Probanden auszuschließen, hätte zum einen zu einer Reduktion der Probandenzahl geführt, zum anderen kann aufgrund der oben genannten stabilen Prednisolon-Therapie über mehr als 3 Monate ein Effekt vernachlässigt werden.

6. Zusammenfassung

Mithilfe der Hämodialyse werden bei niereninsuffizienten Patienten nicht nur Korrekturen des Elektrolyt- und Säure-Base-Haushaltes vorgenommen, sondern dem Blut auch harnpflichtige Substanzen entzogen. Eine wichtige Aufgabe ist ebenso der Entzug von überschüssiger, retinierter Flüssigkeit. Sowohl das Ermitteln der korrekten Menge des zu entziehenden Volumens, als auch die reine Durchführung sind jedoch schwierig umzusetzen, so dass einige Hämodialysepatienten in einem permanenten Zustand der Überwässerung verbleiben (Barenbrock M., Schäfer R.M., 2004; Huang S.-H.S, 2015).

Dieser Zustand der Hypervolämie scheint mit verschiedenen negativen Folgeerscheinungen assoziiert zu sein. Neben dem erhöhten kardiovaskulären Risiko und einer generell erhöhten Mortalität zählt hierzu auch das erhöhte Vorliegen von Entzündungsmarkern (Hung S.-C. et al., 2014; Zoccali C. et al., 2017; Zsom L. et al., 2019).

Ziel dieser Studie war es, eine mögliche Ursache für den gesteigerten Entzündungszustand in hypervolämischen Hämodialysepatienten zu finden. Hierfür konzentrierten wir uns auf die Regulation des antiinflammatorischen Zytokins Interleukin-10 und bauten auf die Erkenntnisse unserer Vorläuferstudie auf. Diese konnte bereits Hinweise auf eine translationale Hemmung im Zuge der IL-10-Proteinsynthese aufzeigen (Ulrich C. et al., 2020).

Wir legten unser Hauptaugenmerk dabei auf das mögliche Vorliegen sogenannter microRNAs, welche in der Lage sind, regulatorisch in die Translation einzugreifen. Speziell konzentrierten wir uns dabei auf die miR-142. Weiterhin analysierten wir die IL-10-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene, um die Hinweise auf eine translationale Hemmung erneut zu belegen und untersuchten den Transkriptionsfaktor STAT3, welcher eng in die IL-10-Signalketten involviert ist (Benkhart E.M. et al., 2000; Lang R. et al., 2002). Zuletzt prüften wir einen möglichen Einfluss der Hemmung des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors auf die IL-10-Produktion, da dieser durch Urämietoxine aktiviert werden kann und in anderen Studien bereits einen Einfluss auf die IL-10-Produktion zeigte (Gutiérrez-Vázquez C. et al., 2018; Zhu J. et al., 2018).

Hierzu konnten wir 40 Hämodialysepatienten rekrutieren, die wir mittels Bioimpedanzmessung in die Gruppen hypervoläm und normovoläm untergliederten. Im Anschluss wurden Blutproben dieser Probanden mittels klassischer biomolekularer Methoden analysiert und die Ergebnisse beider Gruppen gegenübergestellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unsere Studie zum einen erhöhte Entzündungswerte in der überwässerten Gruppe bestätigen konnte. Zum anderen konnten wir eine bestehende „entzündliche“ Diskrepanz zwischen deutlich erhöhter IL-10 mRNA, aber nicht erhöhter IL-10-Proteinexpression unter Hypervolämie feststellen. Weiterhin konnten wir zeigen, dass in der

Gruppe der hypervolämischen Probanden eine deutlich erhöhte Expression der miR-142-3p nachzuweisen war, welche sich, im Gegensatz zur normovolämischen Gruppe, durch LPS-Stimulation nicht mehr signifikant steigern ließ. Da für diese miR bereits mehrfach gezeigt werden konnte, dass sie in der Lage ist, die IL-10-Translation zu hemmen (Ding S. et al., 2012; Gao J. et al., 2019), können wir den starken Verdacht äußern, dass bei hypervolämischen Hämodialysepatienten die übermäßig exprimierte miR-142-3p zu einer Hemmung der IL-10-Proteinsynthese und damit zu einer unzureichenden physiologischen Gegenregulation entzündlicher Vorgänge führt. Eine Bestätigung dieses Verdachtes mittels weiterführender Transfektionsexperimente ist zu empfehlen.

Zuletzt stellten wir bei Analysen des Transkriptionsfaktors STAT3 fest, dass dieser sich lediglich in dem Vorliegen seiner an Serin727 phosphorylierten Form unterschied, welche in der hypervolämischen Gruppe vermindert vorlag. Ob dies direkt durch den IL-10-Mangel in dieser Gruppe bedingt ist und zu einer verminderten Aktivität des Transkriptionsfaktors beiträgt, welcher viele Downstream-Effekte von IL-10 vermittelt, lässt sich aktuell nur vermuten und bedarf weiterer Forschung.

Für den Arylhydrocarbonrezeptor konnten wir keinen Einfluss auf die IL-10-Produktion feststellen.

7. Literaturverzeichnis

- Alhaji M, Zubair M, Farhana A. Enzyme Linked Immunosorbent Assay. 2023 Apr 23. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 32310382
- Ammirati AL. Chronic Kidney Disease. *Rev Assoc Med Bras* (1992). 2020 Jan 13;66Suppl 1(Suppl 1):s03-s09. doi: 10.1590/1806-9282.66.S1.3. PMID: 31939529.
- Antlanger M, Hecking M, Haidinger M, Werzowa J, Kovarik JJ, Paul G, Eigner M, Bonderman D, Hörl WH, Säemann MD. Fluid overload in hemodialysis patients: a cross-sectional study to determine its association with cardiac biomarkers and nutritional status. *BMC Nephrol*. 2013 Dec 2;14:266. doi: 10.1186/1471-2369-14-266. PMID: 24295522; PMCID: PMC4219439.
- Arnemann J. Schmelzkurvenanalyse. In: Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. 3. Auflage. Herausgeber: Axel M. Gressner, Torsten Arndt. Springer-Verlag. 2019. S. 2121. ISBN 978-3-662-48986-4. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4>
- Aziz MH, Hafeez BB, Sand JM, Pierce DB, Aziz SW, Dreckschmidt NE, Verma AK. Protein kinase C ϵ mediates Stat3Ser727 phosphorylation, Stat3-regulated gene expression, and cell invasion in various human cancer cell lines through integration with MAPK cascade (RAF-1, MEK1/2, and ERK1/2). *Oncogene*. 2010 May 27;29(21):3100-9. doi: 10.1038/onc.2010.63. Epub 2010 Mar 15. PMID: 20228845; PMCID: PMC2947343
- Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM, Rao DS, Taganov KD. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol*. 2008 Aug;9(8):839-45. doi: 10.1038/ni.f.209. PMID: 18645592.
- Barenbrock M, Schäfer RM. Kapitel 4 – Hämodialyse, Hämofiltration und Hämodiafiltration. *Dialyseverfahren in Klinik und Praxis*. 6., vollständig neu bearbeitete Auflage. Herausgeber: Walter C. Hörl, Christoph Wanner. Georg Thieme Verlag. 2004. Seiten 37-49. ISBN 3-13-497706-0. doi: 10.1055/b-002-26616.
- Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009 Jan 23;136(2):215-33. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002. PMID: 19167326; PMCID: PMC3794896.
- Benkhart EM, Siedlar M, Wedel A, Werner T, Ziegler-Heitbrock HW. Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. *J Immunol*. 2000 Aug 1;165(3):1612-7. doi: 10.4049/jimmunol.165.3.1612. PMID: 10903771.
- Braun DA, Fribourg M, Sealfon SC. Cytokine response is determined by duration of receptor and signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) activation. *J Biol Chem*. 2013 Feb 1;288(5):2986-93. doi: 10.1074/jbc.M112.386573. Epub 2012 Nov 19. PMID: 23166328; PMCID: PMC3561523.
- Brenner S, Prösch S, Schenke-Layland K, Riese U, Gausmann U, Platzer C. cAMP-induced Interleukin-10 promoter activation depends on CCAAT/enhancer-binding protein expression and monocytic differentiation. *J Biol Chem*. 2003 Feb 21;278(8):5597-604. doi: 10.1074/jbc.M207448200. Epub 2002 Dec 18. PMID: 12493739.
- Cao S, Liu J, Chesi M, Bergsagel PL, Ho IC, Donnelly RP, Ma X. Differential regulation of IL-12 and IL-10 gene expression in macrophages by the basic leucine zipper transcription factor c-Maf fibrosarcoma. *J Immunol*. 2002 Nov 15;169(10):5715-25. doi: 10.4049/jimmunol.169.10.5715. PMID: 12421951.

- Chen Q, Lv J, Yang W, Xu B, Wang Z, Yu Z, Wu J, Yang Y, Han Y. Targeted inhibition of STAT3 as a potential treatment strategy for atherosclerosis. *Theranostics*. 2019 Aug 14;9(22):6424-6442. doi: 10.7150/thno.35528. PMID: 31588227; PMCID: PMC6771242.
- Chen TK, Knicely DH, Grams ME. Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management: A Review. *JAMA*. 2019 Oct 1;322(13):1294-1304. doi: 10.1001/jama.2019.14745. PMID: 31573641; PMCID: PMC7015670.
- Chomarat P, Risoan MC, Banchereau J, Miossec P. Interferon gamma inhibits interleukin 10 production by monocytes. *J Exp Med*. 1993 Feb 1;177(2):523-7. doi: 10.1084/jem.177.2.523. PMID: 8426121; PMCID: PMC2190918.
- Chung J, Uchida E, Grammer TC, Blenis J. STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol*. 1997 Nov;17(11):6508-16. doi: 10.1128/MCB.17.11.6508. PMID: 9343414; PMCID: PMC232504.
- Daugirdas JT. Bedside formulas for K.t/V. A kinder, gentler approach to urea kinetic modeling. *ASAIO Trans*. 1989 Jul-Sep;35(3):336-8. doi: 10.1097/00002480-198907000-00052. PMID: 2597477.
- Dekker MJE, van der Sande FM, van den Berghe F, Leunissen KML, Kooman JP. Fluid Overload and Inflammation Axis. *Blood Purif*. 2018;45(1-3):159-165. doi: 10.1159/000485153. Epub 2018 Jan 26. PMID: 29478061; PMCID: PMC6492921.
- Dekker MJE, Marcelli D, Canaud BJ, Carioni P, Wang Y, Grassmann A, Konings CJ, Kotanko P, Leunissen KM, Levin NW, van der Sande FM, Ye X, Maheshwari V, Usvyat LA, Kooman JP; MONDO Initiative. Impact of fluid status and inflammation and their interaction on survival: a study in an international hemodialysis patient cohort. *Kidney Int*. 2017 May;91(5):1214-1223. doi: 10.1016/j.kint.2016.12.008. Epub 2017 Feb 13. PMID: 28209335.
- Ding S, Liang Y, Zhao M, Liang G, Long H, Zhao S, Wang Y, Yin H, Zhang P, Zhang Q, Lu Q. Decreased microRNA-142-3p/5p expression causes CD4+ T cell activation and B cell hyperstimulation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2012 Sep;64(9):2953-63. doi: 10.1002/art.34505. PMID: 22549634.
- Doss-McQuitty S. Strategies for removing fluids during hemodialysis. *Nephrol Nurs J*. 2014 May-Jun;41(3):257-63; quiz 264. PMID: 25065059.
- Dou L, Poitevin S, Sallée M, Addi T, Gondouin B, McKay N, Denison MS, Jourde-Chiche N, Duval-Sabatier A, Cerini C, Brunet P, Dignat-George F, Burtey S. Aryl hydrocarbon receptor is activated in patients and mice with chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2018 Apr;93(4):986-999. doi: 10.1016/j.kint.2017.11.010. Epub 2018 Feb 1. PMID: 29395338.
- El-Hajjar L, Ali Ahmad F, Nasr R. A Guide to Flow Cytometry: Components, Basic Principles, Experimental Design, and Cancer Research Applications. *Curr Protoc*. 2023 Mar;3(3):e721. doi: 10.1002/cpz1.721. PMID: 36946745.
- Fordham JB, Naqvi AR, Nares S. Regulation of miR-24, miR-30b, and miR-142-3p during macrophage and dendritic cell differentiation potentiates innate immunity. *J Leukoc Biol*. 2015 Aug;98(2):195-207. doi: 10.1189/jlb.1A1014-519RR. Epub 2015 May 19. PMID: 25990241; PMCID: PMC4501676.

- Forte GI, Scola L, Bellavia D, Vaccarino L, Sanacore M, Sisino G, Scazzone C, Caruso C, Barbieri R, Lio D. Characterization of two alternative Interleukin(IL)-10 5'UTR mRNA sequences, induced by lipopolysaccharide (LPS) stimulation of peripheral blood mononuclear cells. *Mol Immunol*. 2009 Jul;46(11-12):2161-6. doi: 10.1016/j.molimm.2009.04.034. Epub 2009 May 27. PMID: 19477525
- Fueldner C, Kohlschmidt J, Riemschneider S, Schulze F, Zoldan K, Esser C, Hauschildt S, Lehmann J. Benzo(a)pyrene attenuates the pattern-recognition-receptor induced proinflammatory phenotype of murine macrophages by inducing IL-10 expression in an aryl hydrocarbon receptor-dependent manner. *Toxicology*. 2018 Nov 1;409:80-90. doi: 10.1016/j.tox.2018.07.011. Epub 2018 Jul 24. PMID: 30053493.
- Gabryšová L, Howes A, Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 expression. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2014;380:157-90. doi: 10.1007/978-3-662-43492-5_8. PMID: 25004818.
- Gao J, Gu J, Pan X, Gan X, Ju Z, Zhang S, Xia Y, Lu L, Wang X. Blockade of miR-142-3p promotes anti-apoptotic and suppressive function by inducing KDM6A-mediated H3K27me3 demethylation in induced regulatory T cells. *Cell Death Dis*. 2019 Apr 15;10(5):332. doi: 10.1038/s41419-019-1565-6. PMID: 30988391; PMCID: PMC6465300.
- Girndt M, Köhler H, Schiedhelm-Weick E, Schlaak JF, Meyer zum Büschenfelde KH, Fleischer B. Production of interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 in vitro correlates with the clinical immune defect in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int*. 1995 Feb;47(2):559-65. doi: 10.1038/ki.1995.70. PMID: 7723241.
- Girndt M, Sester U, Sester M, Deman E, Ulrich C, Kaul H, Köhler H. The interleukin-10 promoter genotype determines clinical immune function in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 2001 Dec;60(6):2385-91. doi: 10.1046/j.1523-1755.2001.00062.x. PMID: 11737614.
- Girndt M, Trocchi P, Scheidt-Nave C, Markau S, Stang A. The Prevalence of Renal Failure. Results from the German Health Interview and Examination Survey for Adults, 2008-2011 (DEGS1). *Dtsch Arztebl Int*. 2016 Feb 12;113(6):85-91. doi: 10.3238/arztebl.2016.0085. PMID: 26931624; PMCID: PMC4782264.
- Girndt M, Ulrich C, Kaul H, Sester U, Sester M, Köhler H. Uremia-associated immune defect: the IL-10-CRP axis. *Kidney Int Suppl*. 2003 May;(84):S76-9. doi: 10.1046/j.1523-1755.63.s84.14.x. PMID: 12694315.
- Girndt M. Humoral immune responses in uremia and the role of IL-10. *Blood Purif*. 2002;20(5):485-8. doi: 10.1159/000063553. PMID: 12207099.
- Girndt M, Pietsch M, Köhler H. Tetanus immunization and its association to hepatitis B vaccination in patients with chronic renal failure. *Am J Kidney Dis*. 1995 Sep;26(3):454-60. doi: 10.1016/0272-6386(95)90491-3. PMID: 7645553.
- Gonçalves S, Pecoits-Filho R, Perreto S, Barberato SH, Stinghen AE, Lima EG, Fuerbringer R, Sauthier SM, Riella MC. Associations between renal function, volume status and endotoxaemia in chronic kidney disease patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2006 Oct;21(10):2788-94. doi: 10.1093/ndt/gfl273. Epub 2006 Jul 21. PMID: 16861246.
- Gutiérrez-Vázquez C, Quintana FJ. Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Immunity*. 2018 Jan 16;48(1):19-33. doi: 10.1016/j.immuni.2017.12.012. PMID: 29343438; PMCID: PMC5777317.

- Haddad F, Baldwin KM. Reverse transcription of the ribonucleic acid: the first step in RT-PCR assay. *Methods Mol Biol.* 2010;630:261-70. doi: 10.1007/978-1-60761-629-0_17. PMID: 20301003.
- Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. Biologie in unserer Zeit, Volume 37, Issue 2, S. 120-126, April 2007;* <https://doi.org/10.1002/biuz.200610332>
- Hu W, Lv J, Han M, Yang Z, Li T, Jiang S, Yang Y. STAT3: The art of multi-tasking of metabolic and immune functions in obesity. *Prog Lipid Res.* 2018 Apr;70:17-28. doi: 10.1016/j.plipres.2018.04.002. Epub 2018 Apr 7. PMID: 29635003.
- Huang B, Zhao J, Lei Z, Shen S, Li D, Shen GX, Zhang GM, Feng ZH. miR-142-3p restricts cAMP production in CD4+CD25- T cells and CD4+CD25+ TREG cells by targeting AC9 mRNA. *EMBO Rep.* 2009 Feb;10(2):180-5. doi: 10.1038/embor.2008.224. Epub 2008 Dec 19. PMID: 19098714; PMCID: PMC2637310.
- Huang SH, Filler G, Lindsay R, McIntyre CW. Euvolemia in hemodialysis patients: a potentially dangerous goal? *Semin Dial.* 2015 Jan-Feb;28(1):1-5. doi: 10.1111/sdi.12317. Epub 2014 Oct 27. PMID: 25348058.
- Hung SC, Kuo KL, Peng CH, Wu CH, Lien YC, Wang YC, Tarng DC. Volume overload correlates with cardiovascular risk factors in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2014 Mar;85(3):703-9. doi: 10.1038/ki.2013.336. Epub 2013 Sep 11. PMID: 24025647.
- Hur E, Usta M, Toz H, Asci G, Wabel P, Kahvecioglu S, Kayikcioglu M, Demirci MS, Ozkahya M, Duman S, Ok E. Effect of fluid management guided by bioimpedance spectroscopy on cardiovascular parameters in hemodialysis patients: a randomized controlled trial. *Am J Kidney Dis.* 2013 Jun;61(6):957-65. doi: 10.1053/j.ajkd.2012.12.017. Epub 2013 Feb 15. PMID: 23415416.
- Jain N, Zhang T, Kee WH, Li W, Cao X. Protein kinase C delta associates with and phosphorylates Stat3 in an interleukin-6-dependent manner. *J Biol Chem.* 1999 Aug 20;274(34):24392-400. doi: 10.1074/jbc.274.34.24392. PMID: 10446219.
- Kaufmann S. Bioimpedanzmessungen. In: *Instrumentierung der Bioimpedanzmessung. Aktuelle Forschung Medizintechnik – Latest Research in Medical Engineering.* Springer Vieweg, Wiesbaden. 2015. S. 7 – 11. ISBN 978-3-658-09771-4. https://doi.org/10.1007/978-3-658-09771-4_2.
- Kim YJ, Jeon HJ, Kim YH, Jeon J, Ham YR, Chung S, Choi DE, Na KR, Lee KW. Overhydration measured by bioimpedance analysis and the survival of patients on maintenance hemodialysis: a single-center study. *Kidney Res Clin Pract.* 2015 Dec;34(4):212-8. doi: 10.1016/j.krcp.2015.10.006. Epub 2015 Nov 11. PMID: 26779424; PMCID: PMC4688576.
- Kleinstauber K, Heesch K, Schattling S, Kohns M, Sander-Jülch C, Walzl G, Hesselting A, Mayatepek E, Fleischer B, Marx FM, Jacobsen M. Decreased expression of miR-21, miR-26a, miR-29a, and miR-142-3p in CD4⁺ T cells and peripheral blood from tuberculosis patients. *PLoS One.* 2013 Apr 16;8(4):e61609. doi: 10.1371/journal.pone.0061609. PMID: 23613882; PMCID: PMC3628900.
- Köhler H, Arnold W, Renschin G, Dormeyer HH, Meyer zum Büschenfelde KH. Active hepatitis B vaccination of dialysis patients and medical staff. *Kidney Int.* 1984 Jan;25(1):124-8. doi: 10.1038/ki.1984.18. PMID: 6233450.

- Konings CJ, Kooman JP, Schonck M, Struijk DG, Gladziwa U, Hoorntje SJ, van der Wall Bake AW, van der Sande FM, Leunissen KM. Fluid status in CAPD patients is related to peritoneal transport and residual renal function: evidence from a longitudinal study. *Nephrol Dial Transplant*. 2003 Apr;18(4):797-803. doi: 10.1093/ndt/gfg147. PMID: 12637651.
- Kramer NJ, Wang WL, Reyes EY, Kumar B, Chen CC, Ramakrishna C, Cantin EM, Vonderfecht SL, Taganov KD, Chau N, Boldin MP. Altered lymphopoiesis and immunodeficiency in miR-142 null mice. *Blood*. 2015 Jun 11;125(24):3720-30. doi: 10.1182/blood-2014-10-603951. Epub 2015 Apr 30. PMID: 25931583.
- Kuhlmann MK, Zhu F, Seibert E, Levin NW. Bioimpedance, dry weight and blood pressure control: new methods and consequences. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005 Nov;14(6):543-9. doi: 10.1097/01.mnh.0000185983.48319.00. PMID: 16205473.
- Lagrange B, Martin RZ, Droin N, Aucagne R, Paggetti J, Largeot A, Itzykson R, Solary E, Delva L, Bastie JN. A role for miR-142-3p in colony-stimulating factor 1-induced monocyte differentiation into macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Aug;1833(8):1936-46. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.04.007. Epub 2013 Apr 17. PMID: 23602969.
- Lang R, Patel D, Morris JJ, Rutschman RL, Murray PJ. Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *J Immunol*. 2002 Sep 1;169(5):2253-63. doi: 10.4049/jimmunol.169.5.2253. PMID: 12193690.
- Lau WL, Kalantar-Zadeh K, Vaziri ND. The Gut as a Source of Inflammation in Chronic Kidney Disease. *Nephron*. 2015;130(2):92-8. doi: 10.1159/000381990. Epub 2015 May 9. PMID: 25967288; PMCID: PMC4485546.
- Levin A, Stevens PE, Bilous RW, Coresh J, De Francisco ALM, De Jong PE et al. Kidney disease: Improving global outcomes (KDIGO) CKD work group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney International Supplements*. 2013 Jan 1;3(1):1-150. doi: 10.1038/kisup.2012.73
- Levy J, Brown E, Lawrence A. Dialysis adequacy: urea kinetic modelling. In: Chapter 2 – Haemodialysis. *Oxford handbook of dialysis*. 4th Edition. Oxford University Press. 2016. Pages 164-165. ISBN: 9780199644766.
- Liu Y, Chen Q, Song Y, Lai L, Wang J, Yu H, Cao X, Wang Q. MicroRNA-98 negatively regulates IL-10 production and endotoxin tolerance in macrophages after LPS stimulation. *FEBS Lett*. 2011 Jun 23;585(12):1963-8. doi: 10.1016/j.febslet.2011.05.029. Epub 2011 May 20. PMID: 21609717.
- Liu Y, Song X, Meng S, Jiang M. Downregulated expression of miR-142-3p in macrophages contributes to increased IL-6 levels in aged mice. *Mol Immunol*. 2016 Dec;80:11-16. doi: 10.1016/j.molimm.2016.10.009. Epub 2016 Oct 24. PMID: 27788393.
- Lu Y, Gao J, Zhang S, Gu J, Lu H, Xia Y, Zhu Q, Qian X, Zhang F, Zhang C, Shen H, Hippen KL, Blazar BR, Lu L, Wang X. miR-142-3p regulates autophagy by targeting ATG16L1 in thymic-derived regulatory T cell (tTreg). *Cell Death Dis*. 2018 Feb 19;9(3):290. doi: 10.1038/s41419-018-0298-2. PMID: 29459719; PMCID: PMC5833855.
- Ma W, Lim W, Gee K, Aucoin S, Nandan D, Kozlowski M, Diaz-Mitoma F, Kumar A. The p38 mitogen-activated kinase pathway regulates the human interleukin-10 promoter via the activation of Sp1 transcription factor in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages. *J Biol Chem*. 2001 Apr 27;276(17):13664-74. doi: 10.1074/jbc.M011157200. Epub 2001 Jan 26. PMID: 11278848.

- Marques-Rocha JL, Samblas M, Milagro FI, Bressan J, Martínez JA, Martí A. Noncoding RNAs, cytokines, and inflammation-related diseases. *FASEB J*. 2015 Sep;29(9):3595-611. doi: 10.1096/fj.14-260323. Epub 2015 Jun 11. PMID: 26065857.
- Matsukawa A, Takeda K, Kudo S, Maeda T, Kagayama M, Akira S. Aberrant inflammation and lethality to septic peritonitis in mice lacking STAT3 in macrophages and neutrophils. *J Immunol*. 2003 Dec 1;171(11):6198-205. doi: 10.4049/jimmunol.171.11.6198. PMID: 14634136.
- McIntyre CW, Harrison LE, Eldehni MT, Jefferies HJ, Szeto CC, John SG, Sigrist MK, Burton JO, Hothi D, Korsheed S, Owen PJ, Lai KB, Li PK. Circulating endotoxemia: a novel factor in systemic inflammation and cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011 Jan;6(1):133-41. doi: 10.2215/CJN.04610510. Epub 2010 Sep 28. PMID: 20876680; PMCID: PMC3022234.
- Medina EA, Morris IR, Berton MT. Phosphatidylinositol 3-kinase activation attenuates the TLR2-mediated macrophage proinflammatory cytokine response to Francisella tularensis live vaccine strain. *J Immunol*. 2010 Dec 15;185(12):7562-72. doi: 10.4049/jimmunol.0903790. Epub 2010 Nov 22. PMID: 21098227.
- Mildner A, Chapnik E, Manor O, Yona S, Kim KW, Aychek T, Varol D, Beck G, Itzhaki ZB, Feldmesser E, Amit I, Hornstein E, Jung S. Mononuclear phagocyte miRNome analysis identifies miR-142 as critical regulator of murine dendritic cell homeostasis. *Blood*. 2013 Feb 7;121(6):1016-27. doi: 10.1182/blood-2012-07-445999. Epub 2012 Dec 4. PMID: 23212522.
- Miskulin DC, Weiner DE. Blood Pressure Management in Hemodialysis Patients: What We Know And What Questions Remain. *Semin Dial*. 2017 May;30(3):203-212. doi: 10.1111/sdi.12586. Epub 2017 Mar 6. PMID: 28264150.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:683-765. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.683. PMID: 11244051.
- Murray PJ. The primary mechanism of the IL-10-regulated antiinflammatory response is to selectively inhibit transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jun 14;102(24):8686-91. doi: 10.1073/pnas.0500419102. Epub 2005 Jun 3. PMID: 15937121; PMCID: PMC1150817.
- Naqvi AR, Fordham JB, Nares S. miR-24, miR-30b, and miR-142-3p regulate phagocytosis in myeloid inflammatory cells. *J Immunol*. 2015 Feb 15;194(4):1916-27. doi: 10.4049/jimmunol.1401893. Epub 2015 Jan 19. PMID: 25601927; PMCID: PMC4323870.
- Nowak KL, Chonchol M. Does inflammation affect outcomes in dialysis patients? *Semin Dial*. 2018 Jul;31(4):388-397. doi: 10.1111/sdi.12686. Epub 2018 Mar 7. PMID: 29513906; PMCID: PMC6035073.
- Nutriguard-MS Gebrauchsanleitung, Version 2.0 (2019), Data Input GmbH, <https://www.manualslib.de/manual/475939/Data-Input-Nutriguard-Ms.html>
- Onofriescu M, Siroopol D, Voroneanu L, Hogas S, Nistor I, Apetrii M, Florea L, Veisa G, Mititiuc I, Kanbay M, Sascau R, Covic A. Overhydration, Cardiac Function and Survival in Hemodialysis Patients. *PLoS One*. 2015 Aug 14;10(8):e0135691. doi: 10.1371/journal.pone.0135691. PMID: 26274811; PMCID: PMC4537261.

- O'Rourke L, Shepherd PR. Biphasic regulation of extracellular-signal-regulated protein kinase by leptin in macrophages: role in regulating STAT3 Ser727 phosphorylation and DNA binding. *Biochem J.* 2002 Jun 15;364(Pt 3):875-9. doi: 10.1042/BJ20020295. PMID: 12049654; PMCID: PMC1222639.
- Paulie S, Perlmann P, Perlmann H. Chapter 64 - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Cell Biology - A Laboratory Handbook*. 3rd Edition. Editor: Julio E. Celis. Academic Press. 2006. Pages 533-538. ISBN 9780121647308. <https://doi.org/10.1016/B978-012164730-8/50065-4>.
- Piccoli A. Estimation of fluid volumes in hemodialysis patients: comparing bioimpedance with isotopic and dilution methods. *Kidney Int.* 2014 Apr;85(4):738-41. doi: 10.1038/ki.2013.434. PMID: 24682120.
- Platzer C, Fritsch E, Elsner T, Lehmann MH, Volk HD, Prösch S. Cyclic adenosine monophosphate-responsive elements are involved in the transcriptional activation of the human IL-10 gene in monocytic cells. *Eur J Immunol.* 1999 Oct;29(10):3098-104. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199910)29:10<3098::AID-IMMU3098>3.0.CO;2-H. PMID: 10540320.
- Powell MJ, Thompson SA, Tone Y, Waldmann H, Tone M. Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region. *J Immunol.* 2000 Jul 1;165(1):292-6. doi: 10.4049/jimmunol.165.1.292. PMID: 10861064.
- Quinn SR, O'Neill LA. The role of microRNAs in the control and mechanism of action of IL-10. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2014;380:145-55. doi: 10.1007/978-3-662-43492-5_7. PMID: 25004817.
- Risøe PK, Ryg U, Wang YY, Rutkovskiy A, Smedsrød B, Valen G, Dahle MK. Cecal ligation and puncture sepsis is associated with attenuated expression of adenylyl cyclase 9 and increased miR142-3p. *Shock.* 2011 Oct;36(4):390-5. doi: 10.1097/SHK.0b013e318228ec6f. PMID: 21701418.
- Risović I, Vlatković V, Popović-Pejičić S, Trbojević-Stanković J. Relationship Between Leptin Level, Inflammation, and Volume Status in Maintenance Hemodialysis Patients. *Ther Apher Dial.* 2019 Feb;23(1):59-64. doi: 10.1111/1744-9987.12750. Epub 2018 Sep 18. PMID: 30225886.
- Rutz S, Ouyang W. Regulation of Interleukin-10 Expression. *Adv Exp Med Biol.* 2016;941:89-116. doi: 10.1007/978-94-024-0921-5_5. PMID: 27734410.
- Sag D, Carling D, Stout RD, Suttles J. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype. *J Immunol.* 2008 Dec 15;181(12):8633-41. doi: 10.4049/jimmunol.181.12.8633. PMID: 19050283; PMCID: PMC2756051.
- Sakaguchi M, Oka M, Iwasaki T, Fukami Y, Nishigori C. Role and regulation of STAT3 phosphorylation at Ser727 in melanocytes and melanoma cells. *J Invest Dermatol.* 2012 Jul;132(7):1877-85. doi: 10.1038/jid.2012.45. Epub 2012 Mar 15. PMID: 22418867.
- Sanin DE, Prendergast CT, Mountford AP. IL-10 Production in Macrophages Is Regulated by a TLR-Driven CREB-Mediated Mechanism That Is Linked to Genes Involved in Cell Metabolism. *J Immunol.* 2015 Aug 1;195(3):1218-32. doi: 10.4049/jimmunol.1500146. Epub 2015 Jun 26. PMID: 26116503; PMCID: PMC4505959.

- Sharma A, Kumar M, Aich J, Hariharan M, Brahmachari SK, Agrawal A, Ghosh B. Posttranscriptional regulation of interleukin-10 expression by hsa-miR-106a. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Apr 7;106(14):5761-6. doi: 10.1073/pnas.0808743106. Epub 2009 Mar 23. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Jun 2;117(22):12498-12499. PMID: 19307576; PMCID: PMC2659714.
- Sharma S. Immunomodulation: A definitive role of microRNA-142. *Dev Comp Immunol*. 2017 Dec;77:150-156. doi: 10.1016/j.dci.2017.08.001. Epub 2017 Aug 9. PMID: 28801229.
- Sheinenzon A, Shehadeh M, Michelis R, Shaoul E, Ronen O. Serum albumin levels and inflammation. *Int J Biol Macromol*. 2021 Aug 1;184:857-862. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.06.140. Epub 2021 Jun 25. PMID: 34181998.
- Shi J, Chen M, Ouyang L, Wang Q, Guo Y, Huang L, Jiang S. miR-142-5p and miR-130a-3p regulate pulmonary macrophage polarization and asthma airway remodeling. *Immunol Cell Biol*. 2020 Oct;98(9):715-725. doi: 10.1111/imcb.12369. Epub 2020 Sep 7. PMID: 32524675.
- Slinin Y, Greer N, Ishani A, MacDonald R, Olson C, Rutks I, Wilt TJ. Timing of dialysis initiation, duration and frequency of hemodialysis sessions, and membrane flux: a systematic review for a KDOQI clinical practice guideline. *Am J Kidney Dis*. 2015 Nov;66(5):823-36. doi: 10.1053/j.ajkd.2014.11.031. PMID: 26498415.
- Sun Y, Saunders T, Oravec-Wilson K, Bridges S, McEachin R, Wu J, Kim S, Zajac C, Toubai T, Fujiwara H, Henig I, Peltier D, Reddy P. Metabolic Reprogramming of Dendritic Cells Is Controlled By the Mir-142. *Blood*. Volume 130. Supplement 1. 2017. Page 2265. ISSN 0006-4971. https://doi.org/10.1182/blood.V130.Suppl_1.2265.2265.
- Sun Y, Varambally S, Maher CA, Cao Q, Chockley P, Toubai T, Malter C, Nieves E, Tawara I, Wang Y, Ward PA, Chinnaiyan A, Reddy P. Targeting of microRNA-142-3p in dendritic cells regulates endotoxin-induced mortality. *Blood*. 2011 Jun 9;117(23):6172-83. doi: 10.1182/blood-2010-12-325647. Epub 2011 Apr 7. PMID: 21474672; PMCID: PMC3122940.
- Swaminathan S, Mor V, Mehrotra R, Trivedi AN. Initial Session Duration and Mortality Among Incident Hemodialysis Patients. *Am J Kidney Dis*. 2017 Jul;70(1):69-75. doi: 10.1053/j.ajkd.2016.11.017. Epub 2017 Feb 21. PMID: 28233656; PMCID: PMC5695674.
- Swaminathan S, Suzuki K, Seddiki N, Kaplan W, Cowley MJ, Hood CL, Clancy JL, Murray DD, Méndez C, Gelgor L, Anderson B, Roth N, Cooper DA, Kelleher AD. Differential regulation of the Let-7 family of microRNAs in CD4+ T cells alters IL-10 expression. *J Immunol*. 2012 Jun 15;188(12):6238-46. doi: 10.4049/jimmunol.1101196. Epub 2012 May 14. PMID: 22586040.
- Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Förster I, Akira S. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity*. 1999 Jan;10(1):39-49. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80005-9. PMID: 10023769.
- Tecan Informationsbroschüre, Platten-Reader Infinite 200 Pro, https://lifesciences.tecan.de/plate_readers/infinite_200_pro
- Ulrich C, Wilke A, Schleicher N, Girndt M, Fiedler R. Hypervolemia-Induced Immune Disturbances Do Not Involve IL-1 β but IL-6 and IL-10 Activation in Haemodialysis Patients. *Toxins (Basel)*. 2020 Mar 3;12(3):159. doi: 10.3390/toxins12030159. PMID: 32138278; PMCID: PMC7150829.
- Vanholder R, Glorieux G, Eloit S. Once upon a time in dialysis: the last days of Kt/V? *Kidney Int*. 2015 Sep;88(3):460-5. doi: 10.1038/ki.2015.155. Epub 2015 Jun 10. PMID: 26061543.

Vaziri ND. CKD impairs barrier function and alters microbial flora of the intestine: a major link to inflammation and uremic toxicity. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2012 Nov;21(6):587-92. doi: 10.1097/MNH.0b013e328358c8d5. PMID: 23010760; PMCID: PMC3756830.

Viability dye guide; Miltenyi Biotec; <https://www.miltenyibiotec.com/upload/assets/IM0021192.PDF>, Aufrufdatum: 24.7.23

Wakahara R, Kunimoto H, Tanino K, Kojima H, Inoue A, Shintaku H, Nakajima K. Phospho-Ser727 of STAT3 regulates STAT3 activity by enhancing dephosphorylation of phospho-Tyr705 largely through TC45. *Genes Cells*. 2012 Feb;17(2):132-45. doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01575.x. Epub 2012 Jan 11. PMID: 22233524.

Wang F, Wang XS, Yang GH, Zhai PF, Xiao Z, Xia LY, Chen LR, Wang Y, Wang XZ, Bi LX, Liu N, Yu Y, Gao D, Huang BT, Wang J, Zhou DB, Gong JN, Zhao HL, Bi XH, Yu J, Zhang JW. miR-29a and miR-142-3p downregulation and diagnostic implication in human acute myeloid leukemia. *Mol Biol Rep*. 2012 Mar;39(3):2713-22. doi: 10.1007/s11033-011-1026-5. Epub 2011 Jun 16. PMID: 21678057.

Weichhart T, Haidinger M, Katholnig K, Kopecky C, Poglitsch M, Lassnig C, Rosner M, Zlabinger GJ, Hengstschläger M, Müller M, Hörl WH, Säemann MD. Inhibition of mTOR blocks the anti-inflammatory effects of glucocorticoids in myeloid immune cells. *Blood*. 2011 Apr 21;117(16):4273-83. doi: 10.1182/blood-2010-09-310888. Epub 2011 Mar 2. PMID: 21368289.

Weichhart T, Costantino G, Poglitsch M, Rosner M, Zeyda M, Stuhlmeier KM, Kolbe T, Stulnig TM, Hörl WH, Hengstschläger M, Müller M, Säemann MD. The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response. *Immunity*. 2008 Oct 17;29(4):565-77. doi: 10.1016/j.immuni.2008.08.012. Epub 2008 Oct 9. PMID: 18848473.

Wen Z, Zhong Z, Darnell JE Jr. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell*. 1995 Jul 28;82(2):241-50. doi: 10.1016/0092-8674(95)90311-9. PMID: 7543024.

Williams L, Bradley L, Smith A, Foxwell B. Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages. *J Immunol*. 2004 Jan 1;172(1):567-76. doi: 10.4049/jimmunol.172.1.567. PMID: 14688368.

Wizemann V, Wabel P, Chamney P, Zaluska W, Moissl U, Rode C, Malecka-Masalska T, Marcelli D. The mortality risk of overhydration in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 May;24(5):1574-9. doi: 10.1093/ndt/gfn707. Epub 2009 Jan 7. PMID: 19131355; PMCID: PMC2668965.

Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*. 2005 Jul;39(1):75-85. doi: 10.2144/05391RV01. PMID: 16060372.

Xiong S, Xu W. 10.06 - Human Immune System. *Comprehensive Biomedical Physics*. Editor: Anders Brahme. Elsevier. 2014. Pages 91-114. ISBN 9780444536334. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53632-7.01008-X>.

Xu S, Wei J, Wang F, Kong LY, Ling XY, Nduom E, Gabrusiewicz K, Doucette T, Yang Y, Yaghi NK, Fajt V, Levine JM, Qiao W, Li XG, Lang FF, Rao G, Fuller GN, Calin GA, Heimberger AB. Effect of miR-142-3p on the M2 macrophage and therapeutic efficacy against murine glioblastoma. *J Natl Cancer Inst*. 2014 Jun 28;106(8):dju162. doi: 10.1093/jnci/dju162. PMID: 24974128; PMCID: PMC4271080.

- Yang J, Kunimoto H, Katayama B, Zhao H, Shiromizu T, Wang L, Ozawa T, Tomonaga T, Tsuruta D, Nakajima K. Phospho-Ser727 triggers a multistep inactivation of STAT3 by rapid dissociation of pY705-SH2 through C-terminal tail modulation. *Int Immunol*. 2020 Feb 7;32(2):73-88. doi: 10.1093/intimm/dxz061. PMID: 31555812.
- Yokogami K, Wakisaka S, Avruch J, Reeves SA. Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Curr Biol*. 2000 Jan 13;10(1):47-50. doi: 10.1016/s0960-9822(99)00268-7. PMID: 10660304.
- Zhu J, Luo L, Tian L, Yin S, Ma X, Cheng S, Tang W, Yu J, Ma W, Zhou X, Fan X, Yang X, Yan J, Xu X, Lv C, Liang H. Aryl Hydrocarbon Receptor Promotes IL-10 Expression in Inflammatory Macrophages Through Src-STAT3 Signaling Pathway. *Front Immunol*. 2018 Sep 19;9:2033. doi: 10.3389/fimmu.2018.02033. PMID: 30283437; PMCID: PMC6156150.
- Zhu YP, Brown JR, Sag D, Zhang L, Suttles J. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulates IL-10-mediated anti-inflammatory signaling pathways in macrophages. *J Immunol*. 2015 Jan 15;194(2):584-94. doi: 10.4049/jimmunol.1401024. Epub 2014 Dec 15. PMID: 25512602; PMCID: PMC4343033.
- Ziegler-Heitbrock L, Lötzerich M, Schaefer A, Werner T, Frankenberger M, Benkhart E. IFN-alpha induces the human IL-10 gene by recruiting both IFN regulatory factor 1 and Stat3. *J Immunol*. 2003 Jul 1;171(1):285-90. doi: 10.4049/jimmunol.171.1.285. PMID: 12817009.
- Zoccali C, Moissl U, Chazot C, Mallamaci F, Tripepi G, Arkossy O, Wabel P, Stuard S. Chronic Fluid Overload and Mortality in ESRD. *J Am Soc Nephrol*. 2017 Aug;28(8):2491-2497. doi: 10.1681/ASN.2016121341. Epub 2017 May 4. PMID: 28473637; PMCID: PMC5533242.
- Zsom L, Faludi M, Fülöp T, Dossabhoy NR, Rosivall L, Tapolyai MB. The association of overhydration with chronic inflammation in chronic maintenance hemodiafiltration patients. *Hemodial Int*. 2019 Jul;23(3):384-391. doi: 10.1111/hdi.12742. Epub 2019 Mar 5. PMID: 30834635.

8. Thesen

1. Bei überwässerten Hämodialysepatienten liegt eine erhöhte IL-10 mRNA-Expression im Vollblut und in isolierten PBMCs vor.
2. Diskrepanz zu der erhöhten IL-10 mRNA weisen überwässerte Hämodialysepatienten keine erhöhte IL-10-Proteinexpression im Serum, in Lymphozyten oder in Monozyten auf.
3. Hypervolämie Hämodialysepatienten zeigen eine stark erhöhte Expression der microRNA-142-3p.
4. Die Expression der microRNA-142-5p zeigt keine Unterschiede zwischen normovolämen und hypervolämen Hämodialysepatienten.
5. Gemäß der inhibitorischen Funktion der miR-142-3p in anderen Zellsystemen ist zu vermuten, dass die miR-142-3p auch in der Lage ist, die Translation der IL-10 mRNA in PBMCs zu hemmen und dass dieser Effekt in überwässerten Hämodialysepatienten verstärkt auftritt.
6. Überwässerte Hämodialysepatienten weisen unter basalen und stimulatorischen Bedingungen eine verminderte monozytäre Expression des an Position 727 phosphorylierten STAT3 auf, die Expression von an Position 705 phosphoryliertem STAT3 zeigt keine Unterschiede in beiden Gruppen.
7. Eine Hemmung des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors beeinflusst weder die IL-10 mRNA, die IL-10-Proteinexpression, noch die STAT3- oder miR-142-Expression

9. Anhang

9.1. Material

Verbrauchsmaterialien

Tab. 4: Verbrauchsmaterialien, die im Rahmen der Studie eingesetzt wurden

Material	Hersteller
KIMTECH® Science Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark Professional™, Koblenz, D
Pipettenspitzen 0,5-20µl	Ilona Schubert, Leipzig, D
Pipettenspitzen 1-200µl	Ilona Schubert, Leipzig, D
Pipettenspitzen 100-1250µl	VWR International, Radnor, USA
Pipettenspitzen 1-5ml Makro	Ilona Schubert, Leipzig, D
Gestopfte Pipettenspitzen 0,5-20µl Ultra Micro Tips	Ilona Schubert, Leipzig, D
Gestopfte Pipettenspitzen 1-100µl	VWR International, Radnor, USA
Gestopfte Pipettenspitzen 1-200µl	VWR International, Radnor, USA
Gestopfte Pipettenspitzen 100-1000µl	Sorenson BioScience, Inc., Salt Lake City, USA
Minicooler für PCR-Tubes	Ilona Schubert, Leipzig, D
Pasteurpipetten (Glas)	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Einmalpipetten (serologisch): 5ml, 10ml, 25ml	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, AU
Zentrifugenröhrchen 50ml	Ilona Schubert, Leipzig, D
BD Falcon, 5ml Polystyrene Round-Bottom Tube	BD Biosciences, San Jose, USA
Leucosept 50ml steril	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, AU
S-Monovette, 9ml EDTA	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
S-Monovette, 4,9ml Serum Gel	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Tempus Blood RNA Tube 9ml	Applied Biosystems, California, USA)
Vacurette Holdex Single Use Holder PP	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, AU
PCR Tubes 0,2ml	Nippon Genetics Europe GmbH, Dueren, D
Multi-SafeSeal Tubes, 0,5ml	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Reaktionsgefäße mit Deckel Safe fit, 1,5ml	Ilona Schubert, Leipzig, D
Reaktionsgefäße mit Deckel Safe fit, 2ml	Ilona Schubert, Leipzig, D
PCR-Plate, 96 Well für ABI Cycler	Ilona Schubert, Leipzig, D
QuickSeal PCR Sheets	iST Scientific, Surrey, GB
Handschuhe, Latex, Gr. S	Lohmann und Rauscher GmbH, Neuwied, D

Geräte

Tab. 5: Geräte, die im Rahmen der Studie eingesetzt wurden

Gerät	Hersteller
Kühlschrank (Gerätetyp: Spezial-468)	Kirsch GmbH, Offenburg, D
Kühlschrank (GT: Labo-100)	Kirsch GmbH, Offenburg, D
Kühlschrank UKS 500 I	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, D
Gefrierschrank -20°C GNP 3056	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, D
Gefrierschrank -20°C KGGUU41A	Siemens, München, D
Gefrierschrank -20°C MediLine LGex 3410	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, D
Tiefkühlschrank -80°C, MDF-U74V	Sanyo, München, D
Universal 320 Tischzentrifuge (mit Zyto-System)	Hettich GmbH, Tuttlingen, D
Rotina 380R Tischzentrifuge	Hettich GmbH, Tuttlingen, D
FastGene HighSpeed Mini Centrifuge	Nippon Genetics Europe GmbH, Dueren, D
Vortexer (GT: Q1)	VWR International, Radnor, USA
Sicherheitswerkbank Labgard Klasse II (GT: NU-437-400)	NuAire, Inc. Plymouth, USA
CO2 Incubator (Brutschrank) MCO-170AICUVH	PHC Corporation, Gunma, Japan
Real Time PCR Step one Plus (GT: Primer Express 3,0)	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, D
MACSQuant TM Analyser (GT: MACSQuant)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
MiniAmp Thermal Cyclers	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, D
Microzentrifuge (Gerätetyp: UniFuge)	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Hettich Microliter Centrifuge, Mikro 220R	Hettich GmbH, Tuttlingen, D
Vortex Genie 2 (GT: G-560 E)	Bender und Hobein AG, München, D
Mini-Plate Centrifuge NG040	Nippon Genetics Europe GmbH, Dueren, D
Micro plate shaker M1CF61024014	Fisher Scientific, Schwerte, D
Kompaktwaage (EMB 600-2)	Kern & Sohn GmbH, Balingen, D
Tecan Infinite M200 Pro Nanoquant	Tecan, Trading AG, Männedorf, CHE
Ultra microplate Reader Elx 808 IU	BIOTEK Instruments INC, Winooski, USA
HLC Vakuum – Sicherheits – Absaugsystem (GT: AZ04)	Hettich GmbH, Kirchenlengern, D
Labsolute® Pipettierhelfer	Th. Geyer GmbH Co. KG, Renningen, D

Pipettenset (I5001419) 0,5-10µl, 2-20µl, 10-100µl, 20-200µl, 100-1000µl	VWR International, Radnor, USA
DistriMan™ Mehrfachdispenser	Gilson, Middleton, USA
8-Kanal-Pipette 50-300µl	VWR International, Radnor, USA
Nutriguard-MS	Data Input GmbH, Pöcking, D

Monoklonale Antikörper

Tab. 6: Liste der eingesetzten monoklonalen Antikörper

Monoklonale Antikörper	Klon	Hersteller
Anti-CD3 FITC human	BW 264/56	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Anti-Human-CD15 eFluor450	HI98	ThermoFisher, Massachusetts, USA
Anti-Human-CD14 Pe-Cyanine7	61D3	ThermoFisher, Massachusetts, USA
7-AAD Viability Staining Solution		ThermoFisher, Massachusetts, USA
Anti-IL-10 APC	JES3-9D7	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Anti-Stat3 (pS727) PE	49/p-Stat3	BD Biosciences, San Jose, USA
Anti-Stat3 Phospho (Tyr705) Brilliant Violet 421	13A3-1	BioLegend, San Diego, USA
Anti-CD86 PECy7	IT2.2	ThermoFisher, Massachusetts, USA
Anti-CD4 APC eF780	RPA-T4	ThermoFisher, Massachusetts, USA
IgG1 Isotype-APC	G0114F7	BioLegend, San Diego, USA
IgG1 Isotype-PE	G0114F7	BioLegend, San Diego, USA

FITC = Fluoresceinisothiocyanat; PE=Phycoerythrin, APC= Allophycocyanin, 7-AAD= 7-Aminoactinomycin D)

Substanzen

Tab. 7: Substanzen, die im Rahmen der Studie eingesetzt wurden

Substanz	Hersteller
Phosphate-buffered saline (PBS)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Pancoll human, density: 1.077g/ml	PAN Biotech, Aidenbach, D
RPMI 1640, without L-Glutamine	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

L-Glutamine (200mM) LE Low Endotoxin	Biochrom AG, Berlin, D
Penicillin/Streptomycin; flüssig	Merck KGaA, Darmstadt, D
Fötale Bovines Serum (FBS)	Biochrom AG
Humanes Albumin 20% Behring Infusionslösung	CDL Behring
Sodium azide (Natriumazid)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Lipopolysaccharid 0127:B8 E.coli (LPS)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
AhR-Antagonist	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Monensin solution	BioLegend, San Diego, USA
Saponin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Paraformaldehyd	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Viability 405/452 Fixable Dyes	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
PD Phosflow Perm Buffer III	BD Biosciences, San Jose, USA
Quick-RNA Miniprep Kit (Cat: R1055) <ul style="list-style-type: none"> - RNA Lysis Buffer - RNA Prep Buffer - RNA Wash Buffer - DNA/ RNase freies Wasser - Zymo-Spin™ IIICG Columns - Spin-Away™ Filters 	ZYMO Research, Freiburg, D
miRCURY LNA™ RT Kit <ul style="list-style-type: none"> - 5x miRCURY RT Reaction Buffer - 10x miRCURY RT Enzyme Mix - RNA Spike in template; (Uni SP6 Spike) 	QIAGEN GmbH, Hilden, D
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit <ul style="list-style-type: none"> - 10x RT Buffer - 25x dNTP Mix - 10x RT Random Primers - MultiScribe™ RT 	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, D
TaqMan Gene Expression Assay <ul style="list-style-type: none"> - qPCRBIO Probe Mix Hi-Rox - Gen: RPL37a, HS01102345_m1 - Gen: IL6, Hs00985639_m1 	Nippon Genetics Europe GmbH, Dueren, D (Hi-Rox) Gene: ThermoFisher, Massachusetts, USA

<ul style="list-style-type: none"> - Gen: IL10, Hs00961622_m1 - Gen: AHR, Hs00169233_m1 	
<p>miRCURY LNA SYBRGreen PCR Kit</p> <ul style="list-style-type: none"> - ROX Reference Dye - 2x miRCURY LNA SYBRGreen Master Mix - Gen: Hsa-mir-142-3p, YP00204291 - Gen: Hsa-mir-142-5p, YP00204722 - Gen: Cel-mir-39-3p, YP00203952 - Gen: UniSp6, YP00203954 	QIAGEN GmbH, Hilden, D
<p>Interleukin-10 high sensitivity ELISA Kit</p> <ul style="list-style-type: none"> - Biotin-Concentrate anti-human IL10 - Streptavidin-HRP - IL-10 Standard vial - High control vial - Sample Diluent - Amplification Diluent Concentrate - Amplification Reagent I - Amplification Reagent II - Stop Solution - Wash Buffer Concentrate (20x) - Substrate Solution 	IBL International, Hamburg, D

Puffer und Medien

Tab. 8: Zusammensetzungen der eingesetzten Puffer und Medien

Name	Ingredienz	Menge
RPMI-Medium mit 4% FBS/HSA	RPMI-Medium Penicillin/Streptomycin Glutamin (200mM) 20% HSA FBS	377,3ml 3,85ml 3,85 ml 95ml 20ml
PBS/EDTA 2mM	1x PBS-Lösung 0,5M EDTA-Lösung	1l 4ml
FACS-Puffer	1x PBS-Lösung 10% Natriumazid-Lösung Bovines Serumalbumin	1l 7ml 4g
Saponin 5%	1x PBS-Lösung Saponin	40ml 2g

Saponin 0,1%	FACS-Puffer 5% Saponinlösung	100ml 2ml
PFA 4%	1x PBS-Lösung Paraformaldehyd	200ml 8g
PFA 1%	4% PFA-Lösung FACS-Puffer	12,5ml 37,5ml
AhR-Antagonist 2mg/ml	AhR-Stock (10mg/ml) 0,2% PBS/HSA-Lösung	2ml 8ml
LPS 10ng/ml	LPS-Stock (1mg/ml) PBS	10µl 990µl

9.2. Eidesstattliche Erklärung

Ich, Eva Herberger, erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Datum, Unterschrift

9.3. Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, Eva Herberger, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

Datum, Unterschrift

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei den Personen bedanken, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Insbesondere danke ich Herrn PD Dr. Fiedler für die Betreuung dieser Dissertation und die tatkräftige Unterstützung.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Dr. Ulrich für seine wertvolle Hilfe und ständige Ansprechbarkeit, sowie Frau Hajri für die angenehme Arbeitsatmosphäre und Unterstützung im Labor.

Dem gesamten Team des KfH danke ich für die freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit.

Zuletzt danke meiner Familie, die mich mit wertvollen Tipps, viel Zuspruch und ständiger liebevoller Unterstützung in die Lage versetzt hat, diese Arbeit schreiben zu können.