

Aus dem Berliner Institut für Gesundheitsforschung – Zentrum für
Regenerative Therapien
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Chemokine im Kontext der verzögerten Nierentransplantatfunktion und
deren Sekretion durch primäre renale tubuläre epitheliale Zellen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Annemarie Müskes

aus Berlin

Datum der Promotion: 4. März 2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	8
Abbildungsverzeichnis	9
Zusammenfassung.....	11
Abstract.....	12
1 Einleitung.....	13
1.1 Chronische Nierenerkrankungen (CKD).....	13
1.1.1 Epidemiologie	13
1.1.2 Funktion der Nieren im Gesunden.....	13
1.1.3 Definition und Klassifikation.....	14
1.1.4 Ursachen.....	19
1.1.5 Therapie.....	19
1.2 Nierentransplantation.....	20
1.2.1 Rechtliche Grundlagen der Organspende in Deutschland	20
1.2.2 Eurotransplant.....	21
1.3 Verzögerte Transplantatfunktion (<i>Delayed Graft Function</i> , DGF)	21
1.3.1 Definition	21
1.3.2 Epidemiologie	22
1.3.3 Risikofaktoren	23
1.3.4 Pathophysiologie.....	24
1.4 Chemokine.....	26
1.5 Uringewonnene primäre renale epitheliale Zellen als humanes Zellmodell (uTEC) ...	26

2	Fragestellung	28
2.1	Chemokine im Plasma von DGF und nonDGF-Patienten	28
2.2	Chemokinsekretion durch primäre uTEC	28
3	Material	30
3.1	Geräte	30
3.2	Verbrauchsmaterialien	30
3.3	Basalmedien und Zusätze	31
3.4	Sonstige Reagenzien	32
3.5	Zellkulturmedien	32
3.6	Stimulantien: Zytokine und TLR-Agonisten	33
3.7	Assays	33
3.8	Analysesoftware	33
4	Methoden	34
4.1	<i>In-vivo</i> -Studie: Plasma-Chemokine in DGF- und nonDGF-Patienten	34
4.1.1	Rekrutierung von Patienten	34
4.1.2	Gruppenzuordnung (DGF/nonDGF)	34
4.1.3	Plasmaprobenverarbeitung	35
4.1.4	Datenabfrage	36
4.2	<i>In-vitro</i> -Studie: Sekretion von Chemokinen durch primäre uTEC	36
4.2.1	Isolation von uTEC	36
4.2.2	Kultivierung von uTEC	37
4.2.3	Ernten von uTEC	37
4.2.4	Einfrieren und Auftauen von uTEC	38
4.2.5	Stimulation von uTEC	38
4.3	Durchflusszytometrie: Quantifizierung von Chemokinen	41
4.3.1	Funktionsprinzip LEGENDplex™-Assay	42
4.3.2	Versuchsdurchführung LEGENDplex™-Assay	42

4.4	Statistische Auswertung.....	43
5	Ergebnisse.....	45
5.1	<i>In-vivo</i> -Studie: Plasma-Chemokine in DGF- und nonDGF-Patienten.....	45
5.1.1	Charakterisierung der Patientenkohorte	45
5.1.2	Chemokine im Plasma der Nierentransplantatempfänger.....	48
5.2	<i>In-vitro</i> -Studie: Sekretion von Chemokinen durch primäre uTEC	52
6	Diskussion	63
6.1	<i>In-vivo</i> -Studie: Plasma-Chemokine in DGF- und nonDGF-Patienten.....	63
6.2	<i>In-vitro</i> -Studie: Sekretion von Chemokinen durch primäre uTEC	68
6.2.1	Zytokin-vermittelte Sekretion von Chemokinen durch uTEC.....	68
6.2.2	TLR-Liganden-vermittelte Sekretion von Chemokinen durch uTEC.....	70
6.3	Limitierung	73
6.4	Zusammenfassung und Ausblick	74
7	Literatur.....	75
8	Eidesstattliche Versicherung	90
9	Lebenslauf	91
10	Publikationen.....	92
11	Danksagung.....	93

Abkürzungsverzeichnis

ACR	Albumin Creatinine Ratio
AER	Albumin Excretion Rate
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body-Mass-Index
CKD	Chronic Kidney Disease
CKD-EPI	Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DARC	Duffy-Antigen-Rezeptor
DGF	Delayed Graft Function (Verzögerte Transplantatfunktion)
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
dsRNA	double-stranded RNA
FSGS	Fokale Segmentale Glomerulosklerose
GAG	Glykosaminoglykan
GBD	Global Burden Disease (Studie)
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HKLM	Heat Killed Listeria monocytogenes
HLA Mismatch	Humanes Leukozytenantigen Mismatch
IFN- γ	Interferon-gamma
IL-17A	Interleukin 17A
KDIGO	Kidney Disease – Improving Global Outcomes
LPS	Lipopolysaccharid
MANOVA	multivariate Varianzanalyse
MDRD	Modification-of-Diet-in-Renal-Disease-Studie
mixed ANOVA	mixed-design Varianzanalyse
NTx	Nierentransplantation

Abkürzungsverzeichnis

PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
Poly(I:C) HMW	Polyinosinic-polycytidylic acid High Molecular Weight
Poly(I:C) LMW	Polyinosinic-polycytidylic acid Low Molecular Weight
PRR	Pattern-Recognition-Rezeptor
SA-PE	Streptavidin-Phycoerythrin
ssRNA	single-stranded RNA
TEC	(renale) tubuläre epitheliale Zellen
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TPG	Transplantationsgesetz
Tx	Transplantation
uTEC	Uringewonnene (renale) tubuläre epitheliale Zellen

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kriterien der CKD-Definition nach KDIGO Leitlinien 2012	15
Tabelle 2: GFR-Kategorien der CKD nach KDIGO-Leitlinien 2012	17
Tabelle 3: Albuminurie-Kategorien der CKD nach KDIGO-Leitlinien 2012	17
Tabelle 4: DGF-Inzidenz US-amerikanischer Studien.....	23
Tabelle 5: Risikofaktoren einer DGF:.....	24
Tabelle 6: Material - Geräte	30
Tabelle 7: Material - Verbrauchsmaterialien	30
Tabelle 8: Material - Basalmedien	31
Tabelle 9: Material - Zusätze	31
Tabelle 10: Material - Reagenzien.....	32
Tabelle 11: Material - Zellkulturmedien.....	32
Tabelle 12: Material - Stimulantien	33
Tabelle 13: Material - Assays	33
Tabelle 14: Material - Analysesoftware.....	33
Tabelle 15: Ein- und Ausschlusskriterien der <i>In-vivo</i> -Studie	34
Tabelle 16: Gruppenzuordnung (DGF/nonDGF) und Patientenzahl je Gruppe zu den Zeitpunkten Tag 0 und Tag 3.....	35
Tabelle 17: Stimulation von uTEC: eingesetzte Konzentrationen der TLR-Agonisten und Zytokine	41
Tabelle 18: Eigenschaften der Patientenkohorte (Nierentransplantatempfänger und Nierentransplantatspender)	45

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prognose der CKD nach GFR- und Albuminurie-Kategorien (KDIGO 2012)	18
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Methodik der Isolation und Kultivierung von TEC aus Urinproben (uTEC)	37
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Stimulationsversuche mit uTEC	39
Abbildung 4: Patienten-Outcome nach Nierentransplantation (A) Anzahl Krankenhaustage; (B) eGFR	47
Abbildung 5: Konzentration von (A) CCL2, (B) CCL3, (C) CCL4, (D) CCL5, (E) CCL11, (F) CCL17 im Plasma von Patienten mit DGF und Patienten ohne DGF (nonDGF) vor und nach Nierentransplantation (Tag 0, Tag 3)	49
Abbildung 6: Konzentration (A) CCL20, (B) CXCL1, (C) CXCL5, (D) CXCL8, (E) CXCL9, (F) CXCL10 im Plasma von Patienten mit DGF und Patienten ohne DGF (nonDGF) vor und nach Nierentransplantation (Tag 0, Tag 3)	50
Abbildung 7: Konzentration von CXCL11 im Plasma von Patienten mit DGF und Patienten ohne DGF (nonDGF) vor und nach Nierentransplantation (Tag 0, Tag 3)	51
Abbildung 8: Konzentration von CXCL10 im Zellkulturüberstand von uTEC nach Stimulation mit (A) Zytokinen und (B) TLR-Agonisten	52
Abbildung 9: Konzentration von CXCL11 im Zellkulturüberstand von uTEC nach Stimulation mit (A) Zytokinen und (B) TLR-Agonisten	53
Abbildung 10: Konzentration von CXCL9 im Zellkulturüberstand von uTEC nach Stimulation mit (A) Zytokinen und (B) TLR-Agonisten	54
Abbildung 11: Konzentration von CXCL1 im Zellkulturüberstand von uTEC nach Stimulation mit (A) Zytokinen und (B) TLR-Agonisten	55
Abbildung 12: Konzentration von CXCL5 im Zellkulturüberstand von uTEC nach Stimulation mit (A) Zytokinen und (B) TLR-Agonisten	56
Abbildung 13: Konzentration von CCL5 im Zellkulturüberstand von uTEC nach Stimulation mit (A) Zytokinen und (B) TLR-Agonisten	57

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 14: Konzentration von CCL2 im Zellkulturüberstand von uTEC nach Stimulation mit (A) Zytokinen und (B) TLR-Agonisten.....	58
Abbildung 15: Konzentration von CCL11 im Zellkulturüberstand von uTEC nach Stimulation mit (A) Zytokinen und (B) TLR-Agonisten.....	59
Abbildung 16: Konzentration von CCL17 im Zellkulturüberstand von uTEC nach Stimulation mit (A) Zytokinen und (B) TLR-Agonisten.....	60
Abbildung 17: Konzentration von CCL20 im Zellkulturüberstand von uTEC nach Stimulation mit (A) Zytokinen und (B) TLR-Agonisten.....	61
Abbildung 18: Konzentration von CCL3 im Zellkulturüberstand von uTEC nach Stimulation mit (A) Zytokinen und (B) TLR-Agonisten.....	62
Abbildung 19: Konzentration von CCL4 im Zellkulturüberstand von uTEC nach Stimulation mit (A) Zytokinen und (B) TLR-Agonisten.....	62

Zusammenfassung

Teil 1: Chemokine sind Signalproteine, welche durch Modulation der Migration und Rekrutierung von Immunzellen eine wichtige Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung von Entzündungsreaktionen spielen. Renale Inflammation im Kontext der Nierentransplantation kann sich klinisch als verzögerte Transplantatfunktion (*Delayed Graft Function*, DGF) manifestieren. Diese Arbeit stellt die Hypothese auf, dass freie Chemokine im Plasma von Nierentransplantatempfängern mit dem Auftreten einer DGF assoziiert sind. **Methodik:** Plasmaproben wurden von Nierentransplantatempfängern (n=42) vor und nach Nierentransplantation (Tag 0, Tag 3) akquiriert. Das Patientenkollektiv wurde hinsichtlich des Auftretens einer DGF in Gruppen eingeteilt (DGF und nonDGF). In Plasmaproben erfolgte die Quantifizierung von Chemokinen mit einem *Bead*-basierten Multiplex-Immunoassay. **Ergebnis:** CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL17 und CCL20 waren zu beiden Zeitpunkten im Plasma von Nierentransplantatempfängern nachzuweisen. Die multivariate Datenanalyse ergab keine signifikanten Unterschiede in der Plasma-Konzentration der genannten Chemokine zwischen den Patientengruppen DGF und nonDGF vor und nach Nierentransplantation. **Fazit:** Freie Chemokine im Plasma waren in dieser Kohorte nicht für die Vorhersage einer DGF geeignet.

Teil 2: Tubuläre epitheliale Zellen (TEC) können renale Inflammation aggravieren, indem sie Chemokine sezernieren. Diese Verstärkung der lokalen Immunantwort durch Anlocken von Immunzellen könnte neue Optionen für therapeutische Interventionen bieten. Grundlage für die Erforschung solcher Interaktionen stellen *in-vitro*-Versuche dar. Bisher verfügbare Zellmodelle werden aus Gewebeproben/Biopsien oder anderen Spezies gewonnen. Dagegen stellt die Isolierung von humanen TEC aus Urin (uTEC) eine einfache, nichtinvasive und unbegrenzt verfügbare Ressource dar, welche zusätzlich weniger ethische Bedenken mit sich führt. Es ist derzeit nicht bekannt, unter welchen Bedingungen uTEC Chemokine produzieren können. Die Charakterisierung des sekretorischen Phänotyps von uTEC stellt eine wichtige Voraussetzung für künftige *in-vitro* Versuche dar. **Methodik:** Die Kultivierung von uTEC wurde nach etabliertem Protokoll durchgeführt. Im explorativen Design erfolgte die Stimulation von uTEC mit Zytokinen und mikrobiellen Substanzen. In Zellkulturüberständen wurden Chemokine mit einem Multiplex-Immunoassay analysiert. **Ergebnis:** Eine Sekretion von CC- und CXC-Chemokinen durch uTEC kann durch TNF α , IFN γ , IL17A und mikrobielle Substanzen wie dsRNA, Lipopeptid, CpG-Oligonukleotid und Flagellin induziert werden. **Fazit:** Die Daten dieser Arbeit charakterisieren erstmals, unter Berücksichtigung des explorativen Designs, den sekretorischen Phänotyp von uTEC. Dies unterstreicht die *in-vitro* erhaltene sekretorische Funktionalität der Zellen. Nach Durchführung entsprechender Validierungsstudien könnten mögliche zukünftige Versuche die Interaktion von uTEC mit Immunzellen sowie deren Migrationsverhalten erforschen.

Abstract

Part 1: Chemokines are signaling proteins which play an important role in developing and maintaining inflammatory responses by modulating immune cell migration. Renal inflammation in the context of renal transplantation may clinically manifest as delayed graft function (DGF). This work hypothesizes that free chemokines in plasma of renal transplant recipients are associated with the occurrence of DGF. **Methods:** Plasma samples were acquired from renal transplant recipients (n=42) before and after renal transplantation (day 0, day 3). Patients were divided into groups based on the occurrence of DGF (DGF and nonDGF). Chemokines were quantified in plasma samples using a bead-based multiplex immunoassay. **Results:** CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL17 and CCL20 were detectable in the plasma of renal transplant recipients at both time points. Multivariate data analysis revealed no significant differences in plasma concentrations of the above chemokines between DGF- and nonDGF-patients before and after kidney transplantation. **Conclusion:** Chemokines in plasma were not predictive of DGF in this cohort.

Part 2: Tubular epithelial cells (TEC) can aggravate renal inflammation by secreting chemokines. This enhancement of the local immune response by attracting immune cells may provide new options for therapeutic intervention. The basis for exploring such interactions is provided by *in-vitro* experiments. So far, available cell models are obtained from tissue samples/biopsies or other species. In contrast, isolation of human TEC from urine (uTEC) represents a simple, noninvasive, and infinitely available resource with fewer ethical concerns. The conditions under which uTEC can produce chemokines are still unknown. Characterization of the secretory phenotype of uTEC represents an important prerequisite for future *in-vitro* experiments. **Methods:** Cultivation of uTEC was performed according to an established protocol. Within an exploratory design, stimulation of uTEC was performed with cytokines and microbial substances. Chemokines were analyzed in cell culture supernatants using a multiplex immunoassay. **Results:** Secretion of CC- and CXC-chemokines by uTEC can be induced by TNF α , IFN γ , IL17A and microbial substances such as dsRNA, lipopeptide, CpG oligonucleotide and flagellin. **Conclusion:** The data in this work characterizes the secretory phenotype of uTEC for the first time. This highlights obtained secretory functionality of these cells *in-vitro*. After validating these findings in further studies, possible future experiments could explore the interaction of uTEC with immune cells as well as their migration behavior.

1 Einleitung

1.1 Chronische Nierenerkrankungen (CKD)

Chronische Nierenerkrankungen (Englisch; Chronic Kidney Disease, CKD) stellen eine wichtige globale Herausforderung dar, als direkte Ursache für Morbidität und Mortalität und Risikofaktor für Herz-Kreislauf-Erkrankungen. CKD können zum Nierenversagen mit Notwendigkeit der Nierenersatztherapie führen und sind mit einer erhöhten kardiovaskulären sowie Gesamtmortalität assoziiert (1).

1.1.1 Epidemiologie

Die Prävalenz der CKD variiert in verschiedenen Ländern und wird weltweit auf 3-18% geschätzt (2, 3). In der Auswertung der Global Burden Disease (GBD) - Studie wird die absolute Gesamtzahl von Erwachsenen mit CKD im Jahr 2010 auf über 497 Millionen geschätzt, davon zeigten 236 Millionen eine moderate oder schwere Verminderung der Nierenfunktion (4). Das globale Bevölkerungswachstum und die zunehmende Langlebigkeit nehmen Einfluss auf die Epidemiologie der CKD. Im Jahr 2017 stieg die absolute Anzahl von Erwachsenen mit CKD auf fast 700 Millionen, die Prävalenz wird dabei mit 9,1% angegeben (5). Die GBD-Studie ist die bislang umfassendste epidemiologische Beobachtungsstudie weltweit und beschreibt die globale, nationale und regionale Mortalität und Morbidität von verschiedenen Krankheiten. Die Anzahl der durch CKD verursachten Todesfälle lag im Jahr 1990 bei 0,6 Millionen, im Jahr 2016 und 2017 bei jeweils bei 1,2 Millionen. Damit waren CKD weltweit die 11-häufigste Todesursache im Jahr 2016 und 12-häufigste Todesursache im Jahr 2017 (5, 6). Prognosen gehen von ~3 Millionen Todesfällen weltweit durch CKD im Jahr 2040 aus (7). Vor diesem Hintergrund ist die Erforschung von Therapiemöglichkeiten hoch relevant.

1.1.2 Funktion der Nieren im Gesunden

Die paarigen Nieren fungieren in erster Linie als lebenswichtiges Ausscheidungsorgan und sind für die Regulation von Wasser-, Säure-Basen- und Salzhaushalt des Menschen bedeutend. Durch die Ultrafiltration des Blutes und Bildung von Harn können harnpflichtige Substanzen ausgeschieden werden. Die Nieren erfüllen darüber hinaus eine endokrine Funktion. Sie sind für die Regulation des Blutdrucks durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System wichtig und sind der Hauptsyntheseort des Hormons Erythropoetin, welches die Bildung von Erythrozyten aus Vorgängerzellen im Knochenmark steuert. Durch Aktivierung von Calcidiol in die hormonelle aktive Form Calcitriol (Vitamin D) hat die Niere Einfluss auf den Calciumhaushalt und Knochenstoffwechsel (8, 9) .

Pro Minute fließen ~1 Liter Blut durch die Gefäßsysteme beider Nieren, dies entspricht etwa 20% des Herzzeitvolumens (10). In den Nierenkörperchen der äußeren Rindenzone, welche aus einer mehrfach gewundenen Gefäßschlinge (Glomerulus) mit umgebender Kapsel (Bowman-Kapsel)

bestehen, findet die Ultrafiltration des Blutes statt. Hierdurch wird der sogenannte Primärharn gebildet, wobei unter Druck Wasser und darin gelöste niedermolekulare Blutbestandteile abfiltriert werden. Durch eine Filtrationsschranke innerhalb der Glomeruli (Blut-Harn-Schranke) können keine größeren Proteine, z.B. Plasmaproteine, unter physiologischen Bedingungen abfiltriert werden und verbleiben somit im Blut. Die Nierenkörperchen verbinden das Gefäßsystem der Niere mit den Nierenkanälchen (Tubulussystem). Zusammen bilden sie die kleinste funktionelle Einheit: das Nephron. Jede Niere besitzt ungefähr 1 Million Nephrone. Hier werden jeden Tag ~1700 Liter Blut zu ~170 Liter Primärharn filtriert (8). Der Primärharn wird während der Passage in den verschiedenen Segmenten des Tubulussystems modifiziert und zum Endharn konzentriert. Dabei spielen die Epithelien des Tubulussystems eine entscheidende Rolle: sie resorbieren über 99% des Wassers sowie viele gelöste Bestandteile (z.B. Glukose, Aminosäuren, Phosphat) zurück, es werden aber auch Stoffe (z.B. Ionen) durch Sekretion zugeführt. Nach Reduktion des Primärharnvolumens verbleiben täglich insgesamt ~1,7 Liter Endharn, welcher über die Nierenkelche in das am Nierenhilum gelegene Nierenbecken und über den anschließenden Harnleiter, Harnblase und -röhre ausgeschieden werden kann (8, 9).

1.1.3 Definition und Klassifikation

Chronische Nierenerkrankungen werden in der allgemeinen Definition der aktuellen Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) - Leitlinien als abnorme Nierenstruktur und/oder Nierenfunktion über eine Dauer von mindestens 3 Monaten mit Implikationen für die Gesundheit beschrieben (11). KDIGO ist eine globale Organisation, welche evidenzbasierte Richtlinien für die klinische Praxis bei Nierenerkrankungen entwickelt. KDIGO wurde 2003 von der National Kidney Foundation, einer US-amerikanischen freiwilligen Gesundheitsorganisation, gegründet und wurde 2013 zu einer unabhängigen gemeinnützigen Organisation, die von einem internationalen freiwilligen Exekutivkomitee geleitet wird (12). Die nachfolgende Tabelle 1 führt die KDIGO-Kriterien der Definition der CKD auf.

Tabelle 1: Kriterien der CKD-Definition nach KDIGO Leitlinien 2012 (11)

CKD-Kriterien (≥1 Kriterium >3 Monate erfüllt)	
Zeichen der Nierenschädigung	Albuminurie (AER ≥30mg/24h; ACR ≥30mg/g [≥3mg/mmol])
	Abnormes Urinsediment
	Elektrolytstörungen/ andere Störungen aufgrund tubulärer Schädigung
	Pathologischer Befund in der Histologie
	Abnorme Nierenstruktur in der Bildgebung
	Zustand nach Nierentransplantation
Verminderte GFR	GFR <60ml/min/1,73m ²

Abkürzungen: Chronic Kidney Disease (CKD), Glomeruläre Filtrationsrate (GFR), Albumin Excretion Rate (AER), Albumin-Kreatinin-Quotient (ACR)

Chronische Nierenerkrankungen lassen sich anhand der Nierenfunktionsleistung in Stadien einteilen. Hierbei wird die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) zur Einschätzung der Nierenfunktion herangezogen (11). Sie ist ein Maß für die Menge an Plasma, welches in den Nierenkörperchen pro Minute filtriert wird (Bildung von Primärharn). Die GFR wird relativ zu einer durchschnittlichen Körperoberfläche von 1,73 m² angegeben (ml/min/1,73m²), da sie physiologisch von der Nierengröße abhängig ist, welche wiederum in Relation zur Körperoberfläche steht (13). Dies ermöglicht einen Vergleich mit Normwerten. Der durchschnittliche Wert der GFR für gesunde Erwachsene unter 40 Jahren liegt bei 120-130ml/min/1,73 m² und nimmt mit dem Alter ab (14).

Die GFR kann klinisch nicht direkt gemessen werden. Sie kann indirekt als Clearance von exogenen oder endogenen Filtrationsmarkern gemessen (Englisch; measured GFR, Abk. mGFR) oder aus den Serumspiegeln von endogenen Filtrationsmarkern mit Hilfe mathematischer Formeln abgeschätzt werden (Englisch; estimated GFR, Abk. eGFR) (15). Die 1999 publizierte Formel der Modification-of-Diet-in-Renal-Disease-Studie (MDRD) stellt eine weit verbreitete Methode zur Abschätzung der Nierenfunktion dar und ist automatisiert anwendbar. In der 6-Variablen-MDRD-Formel wird die GFR anhand von Serum-Kreatinin, Serum-Albumin, Harnstoffwert im Serum, Alter, Geschlecht und Ethnie berechnet. (16). In der 4-Variablen-MDRD-

Formel wird die GFR anhand von Serum-Kreatinin, Alter, Geschlecht und Ethnie berechnet (17). Ein Nachteil der MDRD-Formel besteht darin, dass im hohen Werte-Bereich die wahre GFR unterschätzt wird und es somit bei der Berechnung der *eGFR* zu Ungenauigkeiten kommen kann. Aus diesem Grund wurde sie zunehmend von der im Jahr 2009 publizierte Chronic-Kidney-Disease-Epidemiology-Collaboration-Formel (CKD-EPI) abgelöst, welche vor allem im hohen Werte-Bereich ($>60 \text{ ml/min/1,73m}^2$) exaktere Werte im Vergleich zur MDRD-Formel liefert (18). In der CKD-EPI-Formel werden die Variablen Serum-Kreatinin, Alter, Geschlecht und Ethnie berücksichtigt. Die aktuellen 2012-KDIGO-Leitlinien empfehlen für die initiale Beurteilung der GFR bei Erwachsenen die Messung des Serum-Kreatinins sowie Bestimmung der Kreatin-basierten *eGFR* ($eGFR_{\text{creat}}$) unter Verwendung der 2009 CKD-EPI-Formel. Bei der Beurteilung der $eGFR_{\text{creat}}$, müssen Bedingungen, die das Serum-Kreatinin unabhängig von der GFR beeinflussen können (z.B. extreme Muskelmasse, Diät) bedacht werden (11). Neben der Verwendung von Serum-Kreatinin als endogenen Filtrationsmarker, hat Cystatin C in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Kreatinin ist ein Stoffwechsel-Abbauprodukt und wird relativ konstant über den Urin ausgeschieden. Das körpereigene Protein Cystatin C wird am Glomerulus frei filtriert, im Tubulussystem fast vollständig resorbiert und nur in geringe Mengen im Urin ausgeschieden, weswegen der Serumspiegel relativ konstant ist (19). Es konnte gezeigt werden, dass eine kombinierte Kreatinin/Cystatin C-basierte CKD-EPI-Formel ($eGFR_{\text{creat-cys}}$) zu einer verbesserten Genauigkeit der GFR-Schätzung führt (20). Die Bestimmung der $eGFR_{\text{creat-cys}}$ kann als zusätzlicher Test, beispielsweise als Bestätigung einer verminderten $eGFR_{\text{creat}}$, eingesetzt werden (11). Eine genaue Schätzung der GFR ist für die Diagnose, Klassifikation und Management der CKD von wesentlicher Bedeutung.

Die Klassifikation der CKD erfolgt neben der Ursache anhand der GFR-Kategorie (G1-G5, aufgeführt in Tabelle 2) und der Albuminurie-Kategorie (A1-A3, aufgeführt in Tabelle 3) (11).

Einleitung

Tabelle 2: GFR-Kategorien der CKD nach KDIGO-Leitlinien 2012 (11)

GFR-Kategorie	Bezeichnung	GFR (ml/min/1,73m²)
G1	normal oder erhöht	≥90
G2	leicht erniedrigt	60-89
G3a	leicht bis moderat erniedrigt	45-59
G3b	moderat bis stark erniedrigt	30-44
G4	stark erniedrigt	15-29
G5	Nierenversagen	<15

Tabelle 3: Albuminurie-Kategorien der CKD nach KDIGO-Leitlinien 2012 (11)

Kategorie	Bezeichnung	AER (mg/24h)	ACR (annähernd gleich)	
			(mg/mmol)	(mg/g)
A1	normal bis moderat erhöht	<30	<3	<30
A2	moderat erhöht ¹	30-300	3-30	30-300
A3	stark erhöht ²	>300	>30	>300

Abkürzungen: Albumin Excretion Rate (AER), Albumin-Kreatinin-Quotient (ACR)

¹relativ zu Normwerten junger Erwachsener

² Inklusiv nephrotisches Syndrom (AER >2200mg/24h [ACR >220mg/mmol; >2200mg/g])

Die GFR- und Albuminurie-Kategorien haben eine Relevanz für die Prognose und Therapie der CKD. Die Kombination der beiden Parameter ermöglicht eine prognostische Abschätzung der chronischen Nierenerkrankung. Dies wird in der folgenden

Abbildung 1 durch farbliche Markierung dargestellt.

				Persistierende Albuminurie-Kategorien		
				A1	A2	A3
Prognose der CKD nach GFR- und Albuminurie-Kategorien: KDIGO 2012				normal bis leicht erhöht	moderat erhöht	stark erhöht
				<30mg/g	30-300 mg/g	>300 mg/g
				<3 mg/mmol	3-30 mg/mmol	>30 mg/mmol
GFR-Kategorien (ml/min/1,73m ²)	G1	normal oder erhöht	≥90			
	G2	leicht erniedrigt	60-89			
	G3a	leicht bis moderat erniedrigt	45-59			
	G3b	moderat bis stark erniedrigt	30-44			
	G4	stark erniedrigt	15-29			
	G5	Nierenversagen	<15			

grün: geringes Risiko (in Abwesenheit anderer Zeichen der Nierenschädigung, keine CKD); gelb: mäßiges Risiko; orange: hohes Risiko; rot: sehr hohes Risiko

Abbildung 1: Prognose der CKD nach GFR- und Albuminurie-Kategorien (KDIGO 2012), Risiko bezieht sich auf Gesamt-Mortalität, Kardiovaskuläre Mortalität, chronisches Nierenversagen, akutes Nierenversagen (Acute Kidney Injury) und Progressive CKD (11)

1.1.4 Ursachen

Zu den weltweit häufigsten Ursachen einer chronischen Nierenerkrankung zählen die diabetische Nephropathie und hypertensive Nephropathie (5). Die renalen Grunderkrankungen der im Jahr 2018 ständig dialysepflichtigen Patienten in Deutschland umfassten diabetische Nephropathien (22,72%), vaskuläre Nephropathien (20,93%), glomeruläre Nephropathien (ohne diabetische, 20,64%), interstitielle Nephropathien (5,05%), Zystennieren (6,18%), Systemerkrankungen (3,51%) sowie andere Nierenerkrankungen (20,96%) (21).

1.1.5 Therapie

Im klinischen Management der CKD spielen die kausale Behandlung der Grunderkrankung sowie Maßnahmen zur Verhinderung der Progression der CKD und Minimierung des kardiovaskulären Risikos eine wichtige Rolle. Hierzu zählen die Einstellung und Optimierung des Blutdrucks und des Blutzuckers, eine moderate Eiweißzufuhr, ein reduzierter Salzkonsum, Vermeidung nephrotoxischer Substanzen/Medikamente, und Lifestyle-Modifikationen (sportliche Aktivität im Rahmen der individuellen Möglichkeit des Patienten, Ziel-BMI 20-25 kg/m², Nikotinkarenz). Weiterhin ist in der Therapie der CKD die Behandlung von CKD-assoziierten Komplikationen, wie der renalen Anämie, renalen Osteopathie oder Azidose, relevant. Bei Patienten mit progressiver CKD und Risiko eines Nierenversagens sollte die Planung einer Nierenersatztherapie erfolgen (11).

Die Nierenersatztherapie stellt die Behandlungsmöglichkeit des chronischen Nierenversagens (Stadium G5 der CKD, Nierenversagen) dar. Zur Nierenersatztherapie stehen die Nierenersatzverfahren (Hämodialyse, Peritonealdialyse) und die Nierentransplantation zur Verfügung (11). In Deutschland belief sich laut Jahresbericht 2018 zur Qualität in der Dialyse die Anzahl von gesetzlich versicherten Personen in vertragsärztlicher Dialysebehandlung auf 91.914 Patienten (Jahresprävalenz). Dabei war die Hämodialyse das häufigste angewandte Verfahren (21).

Neben der GFR-Kategorie als Kriterium für den Beginn einer Nierenersatztherapie schlagen die 2012-KDIGO-Leitlinien den Beginn der Dialyse vor, wenn eines oder mehrere der folgenden Kriterien vorliegen: Symptome, die auf ein Nierenversagen zurückzuführen sind (Serositis, Säure-Base- oder Elektrolytstörungen, Pruritus); Unfähigkeit, den Volumenstatus oder Blutdruck zu kontrollieren; eine fortschreitende Verschlechterung des Ernährungszustands, die auf diätetische Eingriffe nicht anspricht; oder kognitive Beeinträchtigungen (11). Langfristig wird in der Therapie des chronischen Nierenversagens die Nierentransplantation angestrebt.

1.2 Nierentransplantation

Die Nierentransplantation stellt die Therapie der Wahl bei Patienten mit chronischem Nierenversagen dar. Im Vergleich zur Dauerdialysetherapie ist die Transplantation für Patienten mit einer geringeren Mortalität verbunden, bietet eine höhere Lebensqualität und ist langfristig kosteneffektiver (22–24).

Die Niere war das in Deutschland im Jahr 2019 das häufigste transplantierte Organ. Insgesamt wurden im Jahr 2019 in Deutschland 2132 Nierentransplantationen durchgeführt, davon erfolgten 1612 Nierentransplantationen nach postmortaler Spende (75,6%) und 520 Nierentransplantationen nach Lebendspende (24,4%). Es gab 2449 Neuanmeldungen für die Warteliste zur Nierentransplantation im Jahr 2019, die Anzahl von Patienten auf der aktiven Warteliste betrug 7148. Die Anzahl von Patienten, welche auf eine Nierentransplantation warten ist somit deutlich höher als die Anzahl transplantierte Nieren. Es sind 343 Patienten, welche im Jahr 2019 auf der Warteliste für eine Nierentransplantation gelistet waren, verstorben (25). Die Wartezeit auf ein Spenderorgan (Niere, postmortale Spende) beträgt in Deutschland derzeit etwa 5-6 Jahre (26).

1.2.1 Rechtliche Grundlagen der Organspende in Deutschland

Die rechtlichen Grundlagen einer Organ-/ Gewebespende („Gesetz über die Spende, Entnahme und Übertragung von Organen und Geweben“ (27)) werden im deutschen Transplantationsgesetz (TPG) festgelegt. Das TPG regelt die postmortale Organspende („Entnahme von Organen und Geweben bei toten Spendern“ (Abschnitt 2, TPG)) und Lebendspende („Entnahme von Organen und Geweben bei lebenden Spendern“ (Abschnitt 3, TPG)) (27).

Die Entnahme von Organen bei postmortaler Organspende ist im Rahmen der in Deutschland geltenden Entscheidungslösung nur dann zulässig, wenn der Spender des Organs zu Lebzeiten eingewilligt hat oder Angehörige ihre Zustimmung geben. Eine weitere Voraussetzung der postmortalen Organspende stellt der Nachweis des irreversiblen Hirnfunktionsausfalls (Todeskriterium) des Spenders dar (27). Eine Organentnahme nach Herzstillstand (Englisch; Donation after cardiac death, Non heart-beating donor) ist in Deutschland nicht erlaubt (28). Laut TPG liegt die Richtlinienkompetenz bei der Bundesärztekammer (27). Die Bundesärztekammer erarbeitet Richtlinien zur Feststellung des Hirntodes (29), „Wartelistenführung und Organvermittlung“ (30), „medizinischen Beurteilung von Organspendern und Konservierung von Spenderorganen“ (31) sowie zur Qualitätssicherung im Zusammenhang mit einer Organtransplantation (32). Die Deutsche Stiftung Organtransplantation (DSO) koordiniert in Zusammenarbeit mit den Entnahmekrankenhäusern die postmortale Organspende in Deutschland (25). Im Rahmen der Lebendniere spende können laut TPG nahe Verwandte oder Personen mit engem persönlichen Verhältnis Organe spenden. Der Spender muss die

Voraussetzung der Volljährigkeit erfüllen und nach angemessener Aufklärung in die Organspende einwilligen. Der Spender darf durch den Eingriff vorrausichtlich nicht über das Operationsrisiko hinaus gefährdet sein (27).

1.2.2 Eurotransplant

In Deutschland, Österreich, Belgien, den Niederlanden, Luxemburg, Slowenien, Kroatien und Ungarn liegt die Zuständigkeit für die Zuteilung (Allokation) von Spenderorganen nach medizinischen Auswahlkriterien bei der Stiftung Eurotransplant mit Sitz in Leiden (Niederlande). In den Eurotransplant-Ländern gibt es ein gemeinsames Spender-Meldesystem und eine zentrale Empfängerwarteliste. Durch den Zusammenschluss mehrerer Länder wird für Patienten mit Notwendigkeit einer Organtransplantation die Chance erhöht, ein immunologisch passendes Organ zu finden. Patienten werden vom betreuenden Transplantationszentrum bei Eurotransplant angemeldet und die individuellen Patientenmerkmale werden in die zentrale Datenbank aufgenommen. Für jedes verfügbare (gespendete) Organ wird auf der Grundlage eines Computer-Algorithmus eine Matchliste erstellt. Neben Dringlichkeit und Wartezeit hat für die Allokation der erwartete Erfolg nach Transplantation eine Bedeutung. Weiterhin wird bei der Allokation die nationale Organaustauschbilanz mitberücksichtigt. Nach Erstellung der Matchliste wird das gespendete Organ dem Patienten angeboten, der auf der Rangliste am höchsten gelistet ist. Wird die Organspende angenommen, werden Entnahme sowie Transport des Organs organisiert (33).

1.3 Verzögerte Transplantatfunktion (*Delayed Graft Function, DGF*)

Die verzögerte Transplantatfunktion (Delayed Graft Function, DGF) ist eine in der frühen Phase nach Nierentransplantation auftretende Komplikation. Sie ist die Manifestation des akuten Nierenversagens nach Transplantation und zeichnet sich klinisch durch eine verminderte Nierenfunktion, resultierend in Oligurie aus (34).

Das Vorhandensein einer DGF nach Transplantation geht mit zum Teil schweren Folgen für den Patienten einher. Mehrere Studien zeigten, dass die DGF mit einem deutlich verkürzten Langzeitüberleben des Transplantats assoziiert ist (35–39). Weiterhin ist die DGF mit einem erhöhten Risiko für akute Abstoßungsreaktion verbunden (35, 40).

1.3.1 Definition

In der Literatur gibt es verschiedene Definitionen der DGF, dabei werden Dialyse-basierte und Kreatinin-basierte Definitionen sowie deren Kombination beschrieben (41, 42). In einem systematischen Review wurden, in zwischen 1984 und 2007 veröffentlichten Studien, 18 verschiedene Definitionen der DGF identifiziert, wobei 75% der Studien eine Dialyse-basierte Definition verwendeten. Dabei wird die DGF am häufigsten als Notwendigkeit der Dialyse innerhalb der ersten Woche nach Nierentransplantation definiert (42). Weitere in der Literatur

beschriebene Definitionen der DGF umfassen zum einen Dialyse-basierte Kriterien, wie die Notwendigkeit der Dialyse in der ersten postoperativen Woche mit Ausschluss der ersten 24 Stunden, die Notwendigkeit der Dialyse in den ersten 10 postoperativen Tagen oder die Notwendigkeit von mindestens 2 Dialysen in der ersten postoperativen Woche. Kreatinin-basierte Definitionen der DGF umfassen: das fehlende Absinken des Serum-Kreatinins um 10% an 3 aufeinanderfolgenden Tagen innerhalb der ersten Woche nach Nierentransplantation, ein Serum-Kreatininwert von $>2,5\text{mg/dl}$ am 7. postoperativen Tag, ein Serum-Kreatininwert von $>2,5\text{mg/dl}$ am 10. postoperativen Tag oder der fehlende Abfall des Serum-Kreatinins am ersten und zweiten postoperativen Tag um mindestens 30% (41).

1.3.2 Epidemiologie

Die Inzidenz der DGF bei nierentransplantierten Patienten mit postmortaler Organspende variiert in verschiedenen Veröffentlichungen weltweit und wird mit Werten zwischen 19% und 70,8% berichtet (35, 37, 42–51). Die DGF-Inzidenz ist bei Organspende nach Herztod höher im Vergleich zur Organspende nach Hirntod (39, 41, 52). Die Inzidenz der DGF bei Nierentransplantation eines Lebendspende-Organ ist geringer im Vergleich zur postmortalen Spende und liegt im Durchschnitt bei 5% (34). Im aktuellen US-amerikanischen Jahresbericht 2018 der US Organ Procurement and Transplantation Network (OPTN) und Scientific Registry of Transplant Recipients (SRTR) wird die Inzidenz der DGF bei Lebendspende mit 2,6% angegeben (48).

Die Inzidenz der DGF bei postmortaler Nierentransplantation hat in den letzten Jahrzehnten leicht zugenommen (45, 53). Die nachfolgende Tabelle 4 führt DGF-Inzidenzen US-amerikanischer Studien zu verschiedenen Zeitpunkten auf.

Tabelle 4: DGF-Inzidenz US-amerikanischer Studien

Autor, Jahr	Anzahl der NTx (postmortem Organspende)	Zeitraum der NTx	DGF-Inzidenz
Ojo et al. 1997 (35)	37.216	1985-1992	26,2%
Tapiawala et al. 2010 (51)	50.246	1998-2004	23,0%
Orandi et al. 2015 (50)	82.143	2003-2012	27,0%
Hart et al. 2020 (48)	10.927	2018	27,5%

Abkürzungen: Nierentransplantation (NTx)

¹DGF wird als Notwendigkeit der Dialyse in der ersten postoperativen Woche definiert

1.3.3 Risikofaktoren

Es sind zahlreiche Risikofaktoren für die Entwicklung einer DGF nach der Nierentransplantation bekannt. In einer Studie wurde anhand der Daten von 24.337 Nierentransplantatempfängern zwischen 2003-2006 (postmortale Organspende) ein Modell zur Vorhersage der DGF entwickelt, welches insgesamt 20 unabhängige empfänger- und spenderbezogene Risikofaktoren enthielt. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die kalte Ischämiezeit, das Spender-Kreatinin, der Empfänger-BMI, die Spende nach dem Herztod und das Alter des Spenders wichtige Risikofaktoren der DGF darstellen (54). Eine Übersicht von Risikofaktoren der DGF nach Nashan B, Abbud-Filho M, Citterio F (55) findet sich in der folgenden Tabelle 5.

Tabelle 5: Risikofaktoren einer DGF: Übersicht nach Nashan B, Abbud-Filho M, Citterio F. (55), am häufigsten in der Literatur beschriebene Risikofaktoren sind fett-gedruckt

Transplantatempfänger-betreffende Risikofaktoren	Männliches Geschlecht
	Ethnische Zugehörigkeit
	Präoperative Dialyse
	Dauer und Art der Dialyse
	Restdiurese
	Transfusion vor der Transplantation
	Body-Mass-Index
	Vorhergehende Transplantationen
	Diabetes
	Blutdruck vor der Transplantation
	Lipidprofil vor der Transplantation
	Kardiale Funktion
	Transplantatspender-betreffende Risikofaktoren
Alter	
Body-Mass-Index	
Postmortale Spende versus Lebendspende	
Organspende nach Herztod	
Todesursache (Anoxie versus zerebrovaskulär)	
Dauer der Behandlung auf Intensivstation	
Dauer seit Eintreten des Hirntods	
Diabetes	
Hypertensive Vorerkrankung (oder Blutdruck vor Transplantation)	
Erhöhtes Spender-Serum-Kreatinin	
Artherosklerose des Transplantats	
Organerhaltungs-betreffende Risikofaktoren	Kalte Ischämiezeit
	Warme Ischämiezeit
Transplantat-betreffende Risikofaktoren	Präsensibilisierung
	HLA-Mismatches
	AB0-Blutgruppen-Inkompatibilität

1.3.4 Pathophysiologie

In der Pathophysiologie der DGF spielt der Ischämie-Reperfusionsschaden im Rahmen der Nierentransplantation eine zentrale Rolle (45). Die Ischämiezeit ist die Zeitspanne, in der das Transplantat nicht mit Blut versorgt wird, dabei wird zwischen kalter Ischämiezeit (Zeitspanne ohne Blutversorgung nach Kühlung des Transplantats bis zum Beginn der Anastomosierung) und warmer Ischämiezeit (Zeitspanne ohne Blutversorgung bei Körpertemperatur) unterschieden. Die

Ischämie führt zu einem Sauerstoff- und Nährstoffmangel im Gewebe mit konsekutiver Akkumulierung metabolischer Abbauprodukte (34). Die Beeinträchtigung des oxidativen Stoffwechsels und Erschöpfung des Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP) führt zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. Unter ischämischen Bedingungen führt der Abbau von ATP zur Bildung freier Sauerstoffradikale durch die Xanthinoxidase (56). Mit Wiederherstellung des Blutflusses kommt es im Zuge der Re-Oxygenierung zur weiteren Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, welche zum Zelltod beitragen und das bereits durch Hypoxie beeinträchtigte Gewebe weiter schädigen (34). Der Ischämie-Reperfusionsschaden verursacht eine inflammatorische Antwort des Transplantatgewebes. Es kommt zu einem komplexen Zusammenspiel der Mechanismen des Immunsystems mit Produktion proinflammatorischer Mediatoren (Chemokine und Zytokine), Aktivierung von angeborenem Immunsystem, Komplementsystem sowie adaptivem Immunsystem (57).

Durch die Gewebeschädigung werden sogenannte *Damage-associated molecular patterns* (DAMPs) freigesetzt (45, 58). Dabei handelt es sich um endogene Liganden, die durch Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRR) wie Toll-Like-Rezeptoren (TLR) detektiert werden können. TLR detektieren neben DAMPs auch Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) (59). PAMPs sind spezifische Moleküle, die bei Erregern wie Viren, Bakterien und Pilzen vorkommen. Die Aktivierung von TLRs führt zur Induktion von proinflammatorischen Genen, die zur Produktion von Zytokinen und Chemokinen führen. TLRs werden anhand ihrer zellulären Lokalisation in zwei Gruppen eingeteilt: extrazelluläre TLRs (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR11) und intrazelluläre TLRs (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) (60). Es gibt zwei Hauptsignalwege nach Aktivierung von TLRs: den Myd88-abhängigen Signalweg, welcher zur Aktivierung von NF- κ B und AP-1 führt, sowie den TRIF-abhängigen Signalweg, welcher zur Aktivierung von Typ-I-Interferon führt (59).

Im Zuge des Ischämie-Reperfusionsschadens sind insbesondere endotheliale und tubuläre Zellen betroffen. Endotheliale Zellen tragen zum ischämischen Gewebsschaden bei, indem sie mit einer hochregulierten Expression von Adhäsionsmolekülen reagieren (58, 61). Leukozyten können durch das Endothel in das Interstitium migrieren (Leukodiapedese) und ein interstitielles Ödem bedingen. Weiterhin kommt es durch den Ischämie-Reperfusionsschaden zur Freisetzung von DAMPs aus den nekrotischen Tubuli. DAMPs verursachen eine Permeabilitätsstörung des Nierengefäßendothels und sind mit der Freisetzung von proinflammatorischen Chemokinen und Zytokinen sowie der Aktivierung von TLRs verbunden. TLRs werden nicht nur auf Zellen des Immunsystems, sondern auch auf renalen tubulären epithelialen Zellen (TEC) exprimiert (62–64). TEC nehmen eine aktive Rolle in der Entzündungsreaktion ein, indem sie proinflammatorische Zytokine und Chemokine sezernieren und zur Aktivierung und Rekrutierung von Immunzellen beitragen (59, 65).

1.4 Chemokine

Chemokine (Wortzusammensetzung ‚chemotaktische Zytokine‘) stellen eine Gruppe von Signalproteinen dar, welche für die Zellwanderung (Chemotaxis) von Immunzellen verantwortlich sind sowie deren Rekrutierung aus der Zirkulation in die Gewebe (Leukodiapedese) bewirken können. Sie können von Leukozyten und Gewebezellen produziert werden (66). Lösliche und an extrazelluläre Matrix gebundene Chemokine steuern die Migration von Leukozyten innerhalb von Geweben und können Extra-/Intravasation induzieren (66, 67). Chemokine signalisieren über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und werden je nach der Position des konservierten Cysteinrests in vier verschiedene Gruppen eingeteilt: CXC, CC, CX3C oder C. Die Bezeichnung der Chemokinrezeptoren folgt der der bindenden Chemokine. Dies bedeutet, CC-Chemokine binden an CC-Chemokinrezeptoren, CXC-Liganden an CXC-Rezeptoren (68). Ihrer Funktion nach können Chemokine in inflammatorische und homöostatische Chemokine unterschieden werden. Ohne Gewebeschädigung werden inflammatorische Chemokine nicht in hohen Konzentrationen exprimiert. Sie können von zirkulierenden Leukozyten und anderen Zelltypen bei Aktivierung exprimiert werden und werden daher auch als induzierbare Chemokine bezeichnet. Inflammatorische Mediatoren, wie Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α), Interferon-gamma (IFN- γ) und mikrobielle Produkte stellen mögliche Induktoren dar. Homöostatische Chemokine werden kontinuierlich produziert und spielen eine wichtige Rolle für die Organentwicklung, Angiogenese und Feinlokalisierung von Immunzellen in den lymphatischen Organen (67, 69).

1.5 Uringewonnene primäre renale epitheliale Zellen als humanes Zellmodell (uTEC)

Das Nierenepithel im Tubulussystem ist kontinuierlich der Passage des Primärharns ausgesetzt. Es werden täglich zwischen 2.000-7.000 renale epitheliale tubuläre Zellen (TEC) mit dem Urin ausgeschieden (70, 71). Das Urinsediment stellt daher eine einfache und nichtinvasive Methode dar, TEC für die Kultur zu gewinnen. Hierzu wurde bereits im Jahr 1972 die erste Arbeit veröffentlicht und seither ist es zahlreichen Gruppen gelungen, TEC aus dem Urin von Patienten oder gesunden Probanden zu kultivieren (72–84). Aus Urin isolierte TEC werden im Folgenden als uTEC bezeichnet. Ein wichtiger Punkt im Zusammenhang mit der Kultivierung von uTEC ist die Kontrolle der epithelialen und renalen Herkunft, was bereits in mehreren Arbeiten gezeigt wurde (75, 77, 78, 80–83, 85). Ferner wurde dokumentiert, dass uTEC hauptsächlich aus distalen und proximalen TEC bestehen (82, 83) und ähnliche genetische und funktionelle Eigenschaften aufweisen wie Zellen, die aus Nierengewebe für die Kultur gewonnen werden (84). Die Qualität betreffend, stellen uTEC *in-vitro* voll funktionsfähige Zellen dar (80, 81). Zusammenfassend handelt es sich um eine gut etablierte Methode, auf dessen Grundlage die Zellkulturversuche der hier vorliegenden Arbeit aufbauen (82, 85).

Einleitung

In einer Studie wurde die renale epitheliale Herkunft der Urinzellen durch Immunfluoreszenzfärbung mit Keratin bekräftigt (75), in einer weiteren Veröffentlichung wurden die kultivierten Zellen mittels Elektronenmikroskopie und histochemischer Färbung mit Brush-border Enzym γ -Glutamyltranspeptidase (Marker für renale proximale Zellen) charakterisiert (77). Darüber hinaus wurden in der folgenden Publikation uTEC mittels durchflusszytometrischer Analyse hinsichtlich der Expression von Zytokeratin, CD13 und epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCam) untersucht (82), welche Marker der tubulären Epithelzellen darstellen. Dabei zeigte sich, dass die überwiegende Mehrheit der aus Urin kultivierten Zellen aus TEC bestand, hauptsächlich aus proximalen (CD13+) und in geringerem Maße aus distalen (EpCam+) TEC. Auch die mikroskopische Auswertung bestätigte den epithelialen Phänotyp und die für TEC charakteristische Domformation (82). Die Domformation entsteht durch den transepithelialen Flüssigkeitstransport aus dem Medium zum Raum zwischen Zellkulturoberfläche und Zellmonolayer, was ebenfalls in einer weiteren Publikation im Kontext von renalen epithelialen Zellen aus dem Urin festgehalten wurde (78). Im Zusammenhang mit uringewonnenen Zellen sind auch Urothelzellen (78, 83) sowie Fibroblasten-ähnliche Zellen (82, 83) beschrieben.

2 Fragestellung

2.1 Chemokine im Plasma von DGF und nonDGF-Patienten

Chemokine sind an der Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten beteiligt und spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung renaler Inflammation. Sie sind in die Pathophysiologie des renalen Ischämie-Reperfusionsschadens involviert, welcher im Zuge der Nierentransplantation ausgelöst wird (86). Aber auch die renale Grunderkrankung (87) und Dialysetherapie (88, 89) können eine bereits vor Transplantation bestehende Entzündung beim Nierentransplantatempfänger bedingen. Renale Inflammation im Kontext der Nierentransplantation kann sich klinisch als DGF manifestieren (34, 57). Die DGF wird in dieser Arbeit als Notwendigkeit der Dialyse innerhalb der ersten Woche nach Nierentransplantation definiert.

Darauf aufbauend wird die Hypothese aufgestellt, dass Plasma-Chemokine mit dem Auftreten einer DGF zusammenhängen. Im Rahmen einer *in-vivo*-Studie sollen im ersten Teil der Arbeit freie Chemokine im Plasma von Nierentransplantatempfängern vor und nach Nierentransplantation evaluiert und folgende Fragen dabei adressiert werden:

- Sind freie Chemokine im Plasma von Nierentransplantatempfängern vor und nach Nierentransplantation detektierbar?
- Gibt es DGF-abhängige Unterschiede in der Plasma-Chemokinkonzentration von Transplantatempfängern vor bzw. nach Nierentransplantation?
- Gibt es Unterschiede in der zeitlichen Kinetik der Plasma-Chemokinkonzentration zwischen Transplantatempfängern mit DGF versus ohne DGF (Gruppenunterschiede in Abhängigkeit der Zeit)?
- Wenn ja, können Chemokine als Biomarker der DGF fungieren?

2.2 Chemokinsekretion durch primäre uTEC

Die Fähigkeit von TEC Chemokine zu sezernieren stellt eine wesentliche Funktion ihrer Immunantwort im Rahmen renaler Pathologien dar (86). TEC sind somit an der Rekrutierung von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems beteiligt und können die lokale Immunantwort durch ihre sekretorische Funktion verstärken. Bisher stehen für die *in-vitro* Untersuchung solcher Zellfunktionen Zelllinien zur Verfügung, die z.B. aus Gewebeproben/Biopsien oder anderen Spezies gewonnen werden. Die Kultivierung von humanen TEC aus Urin (uTEC) stellt eine einfache, nichtinvasive und unbegrenzt verfügbare Methode dar. Obwohl uringewonnene Zellen bereits gut charakterisiert sind, liegen bisher keine Daten bezüglich ihrer sekretorischen Funktion vor.

Fragestellung

Im zweiten Teil der Arbeit sollen folgende Fragen im Rahmen einer explorativen *in-vitro*-Studie adressiert werden:

- Können uTEC Chemokine sezernieren?
- Können inflammatorische Stimuli (Zytokine) eine Induktion der Chemokinsekretion in uTEC bewirken?
- Können mikrobielle Stimuli (TLR-Agonisten) eine Induktion der Chemokinsekretion in uTEC auslösen?

3 Material

3.1 Geräte

Tabelle 6: Material - Geräte

Gerät	Modell, Hersteller
Inkubator	MCO-18AIC CO ₂ Inkubator; Sanyo, Osaka, Japan
Lichtmikroskop	AE2000 Series; Motic, Xiamen, China
Zentrifugen	Heraeus Multifuge X3R; Heraeus Fresco 17 Mikrozentrifuge; Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Wasserbad	W12 Wasserbad; Labortechnik medingen, Dresden, Deutschland
Plate-Shaker	Titer Plate Shaker 4625-1cem; Thermo Scientific Barnstaedt Labline, Waltham, Massachusetts, USA
Durchflusszytometer	CytoFLEX S; Beckman/Coulter, Brea, Kalifornien, USA

3.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Material - Verbrauchsmaterialien

Produkt	Bezugsquelle
Kryoröhrchen, CryoPure Tubes	Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland
Gefrierbehälter Mr. Frosty	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Zentrifugenröhrchen 50ml, Falcon	Corning; Corning, New York, USA
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Wellplatten U-Bottom (96-Well)	Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland

Material

Wellplatten V-Bottom (96-Wells)	Biolegend; San Diego, Kalifornien, USA
Zellkulturflaschen	Corning; Corning, New York, USA
Zellschaber Länge 240mm, Schaberbreite 13mm, Version drehbar	TPP Techno Plastic Products; Trasadingen, Schweiz
Plasmaröhrchen	BD (Beckton Dickinson); Franklin Lakes, USA

3.3 Basalmedien und Zusätze

Tabelle 8: Material - Basalmedien

Produkt	Bezugsquelle
Gibco Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) /high glucose	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
HAM's F12	Biochrom; Berlin, Deutschland
Renal Epithelial Basal Medium (REBM)	Lonza; Basel, Schweiz
Roswell Park Memorial Institute-1640 Medium (RPMI)	Biochrom; Berlin, Deutschland

Tabelle 9: Material - Zusätze

Produkt	Bezugsquelle
Penicillin/Streptomycin	Biochrom; Berlin, Deutschland
Amphotericin B	Biochrom; Berlin, Deutschland
Normocin	InvivoGen; San Diego, Kalifornien, USA
Ciprofloxacin	Fresenius Kabi Austria; Graz, Österreich
GlutaMAX	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Gibco® MEM Lösung aus nicht essenziellen Aminosäuren (100X)	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Renal Epithelial Growth Medium (REGM) SingleQuot kit	Lonza; Basel, Schweiz

3.4 Sonstige Reagenzien

Tabelle 10: Material - Reagenzien

Produkt	Bezugsquelle
Gibco TrypLE Select	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Gelatine, Embryomax 0,1% Gelatin Solution	Merck Millipore; Burlington, Massachusetts, USA
Fetales Kälberserum (FBS/FCS)	Biochrom; Berlin, Deutschland
Trypanblau-Lösung 0,4%	Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, USA
Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, USA

3.5 Zellkulturmedien

Tabelle 11: Material - Zellkulturmedien

Medium/Puffer	Zusammensetzung
Primärmedium	DMEM/high glucose und HAM's F12 (1:1 Mix) mit <ul style="list-style-type: none"> - 10% FBS - REGM Single-Quot Kit - 100 U/ml / 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin - 2,5 µg/ml Amphotericin B - 100 µg/ml Normocin - 10 µg/ml Ciprofloxacin
Proliferationsmedium	REBM mit <ul style="list-style-type: none"> - 10% FBS - REGM Single-Quot Kit - 100 U/ml / 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin - 2,5 mM GlutaMAX - 1% MEM Lösung aus nicht essenziellen Aminosäuren
Waschpuffer	DPBS mit <ul style="list-style-type: none"> - 100 U/ml / 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin
Einfriermedium	Lösung I: 60% RPMI, 40% FBS Lösung II: 80% FBS, 20% DMSO Lösung I/II im Verhältnis 1:1 mit Zellen
Transfermedium	DMEM/high Glucose mit <ul style="list-style-type: none"> - 10% FBS - 100 U/ml / 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin

3.6 Stimulantien: Zytokine und TLR-Agonisten

Tabelle 12: Material - Stimulantien

Produkt	Bezugsquelle
Human TLR1-9 Agonist Kit	InvivoGen; San Diego, Kalifornien, USA
Recombinant Human TNF- α (carrier-free)	Biolegend; San Diego, Kalifornien, USA
Recombinant Human IL-17A (Human Cell-expressed) Protein	R&D Systems; Minneapolis, Minnesota, USA
Recombinant Human IFN- γ (carrier-free)	Biolegend; San Diego, Kalifornien, USA

3.7 Assays

Tabelle 13: Material - Assays

Produkt	Bezugsquelle
LEGENDplex™-Assay: Human Proinflammatory Chemokine Panel	Biolegend; San Diego, Kalifornien, USA

3.8 Analysesoftware

Tabelle 14: Material - Analysesoftware

Produkt	Bezugsquelle
LEGENDplex™-Analysesoftware, Version 8.0	Biolegend; San Diego, Kalifornien, USA
Microsoft Excel, Version 25	Microsoft Corporation; Albuquerque, New Mexico, USA
GraphPad Prism, Version 8.0	Graphpad Software; San Diego, Kalifornien, USA
R, Version 3.6.1	R Core Team

4 Methoden

4.1 *In-vivo*-Studie: Plasma-Chemokine in DGF- und nonDGF-Patienten

Ziel der *in-vivo*-Studie war es herauszufinden, ob freie Chemokine im Plasma von Nierentransplantatempfängern prädiktiv für das Auftreten einer DGF sind.

4.1.1 Rekrutierung von Patienten

Im Zeitraum zwischen dem 24.01.2015 und 17.01.2016 wurden Plasmaproben von Patienten gesammelt, bei denen eine Nierentransplantation mit *post-mortem* Organspende an der Charité Campus Virchow Klinikum durchgeführt wurde. Die erste Blutentnahme erfolgte präoperativ bei stationärer Aufnahme zur Nierentransplantation (Tag 0). Eine weitere Blutentnahme erfolgte postoperativ am dritten Tag nach erfolgter Nierentransplantation (Tag 3). Für die Studie rekrutierte Patienten haben ihr Einverständnis für die Teilnahme erklärt.

Die nachfolgende Tabelle führt die für diese Studie angewendete Ein- sowie Ausschlusskriterien auf.

Tabelle 15: Ein- und Ausschlusskriterien der *In-vivo*-Studie

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none"> - Nierentransplantation zwischen dem 24.01.2015 und 17.01.2016 an der Charité Campus Virchow Klinikum - Post-Mortem Nierenspende - Erst-/Zweit-Nierentransplantation 	<ul style="list-style-type: none"> - Nierentransplantation vor dem 24.01.2015 oder nach 17.01.2016 - Nierentransplantation an einem anderen Standort der Charité als Charité Campus Virchow Klinikum - Lebendnierenspende - ≥ 3 Nierentransplantationen in der Vorgeschichte

Insgesamt konnten im oben genannten Zeitraum 42 Patienten für die Studie rekrutiert werden. Bei 32 Patienten konnten Plasmaproben an beiden Zeitpunkten (präoperativ sowie postoperativ) akquiriert werden. Bei 6 Patienten konnten Plasmaproben ausschließlich präoperativ (Tag 0) gewonnen werden. Bei 4 Patienten konnten Plasmaproben ausschließlich postoperativ (Tag 3) gewonnen werden.

4.1.2 Gruppenzuordnung (DGF/nonDGF)

Nach kompletierter Probensammlung im oben genannten Zeitraum wurden die Patienten retrospektiv hinsichtlich des Vorliegens einer DGF gescreent. Die DGF wird in dieser Arbeit als Notwendigkeit der Dialyse innerhalb der ersten Woche nach Nierentransplantation definiert. Patienten, welche innerhalb der ersten Woche nach Nierentransplantation dialysepflichtig waren,

wurden in die Gruppe „DGF“ eingeordnet. Patienten, welche innerhalb der ersten Woche nach Nierentransplantation nicht dialysepflichtig waren, wurden in die Gruppe „nonDGF“ eingeordnet.

Von den insgesamt 42 rekrutierten Patienten wurden 22 Patienten in die Gruppe „DGF“ und 20 Patienten in die Gruppe „nonDGF“ eingeordnet. Bei 15 von 22 DGF- Patienten konnten Plasmaproben zu beiden Zeitpunkten akquiriert werden, bei 7 DGF- Patienten konnten Plasmaproben nur zu einem Zeitpunkt akquiriert werden. Bei 17 nonDGF- Patienten konnten Plasmaproben zu beiden Zeitpunkten gewonnen werden, bei 3 nonDGF- Patienten konnten Plasmaproben von einem Zeitpunkt akquiriert werden. Die nachfolgende Tabelle 16 veranschaulicht die Anzahl der Proben je zugeordneter Patienten-Gruppe zu den verschiedenen Zeitpunkten.

Tabelle 16: Gruppenzuordnung (DGF/nonDGF) und Patientenzahl je Gruppe zu den Zeitpunkten Tag 0 und Tag 3

	Zeitpunkt	nonDGF	DGF
Proben zu beiden Zeitpunkten akquiriert	Tag 0 und Tag 3	n = 17	n = 15
	Proben zu einem Zeitpunkt akquiriert		
	ausschließlich Tag 0	n = 2	n = 4
	ausschließlich Tag 3	n = 1	n = 3
Gesamtanzahl Proben	Tag 0	n=19	n=19
	Tag 3	n=18	n=18
Gesamtanzahl Patienten		n = 20	n = 22

4.1.3 Plasmaprobenverarbeitung

Die Plasmaröhrchen wurden laut Herstellerangaben bei 1200g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Plasma wurde dekantiert und in einem sterilem Reaktionsgefäß (Eppendorf) bei -80°C eingefroren. Im Plasma der Patienten erfolgte später die Quantifizierung proinflammatorischer Chemokine mit einem *Bead*-basiertem Immunoassay (siehe Unterkapitel 4.3).

4.1.4 Datenabfrage

Klinische Parameter und Patientendaten wurden in der klinikinternen Online-Datenbank T-Base abgefragt. Mit Hilfe der elektronischen Patientenakten wurden retrospektiv die folgenden Daten erhoben:

- **Transplantatempfänger:** Geschlecht, Alter zum Zeitpunkt der Transplantation, BMI zum Zeitpunkt der Transplantation, Dialysezeit vor Transplantation, Anzahl der Dialysen in der ersten Woche nach Transplantation, Dauer des stationären Aufenthalts nach Transplantation, Anzahl vorhergehender Transplantationen, Grunderkrankung, Laborwerte im Verlauf nach Transplantation (eGFR nach CKD-EPI zu folgenden Zeitpunkten: 1 Monat nach Transplantation, 1 Jahr nach Transplantation), Immunsuppressive Therapie
- **Transplantatempfänger/-spender:** Kalte Ischämiezeit, HLA Mismatches (MM broad, MMA broad, MMB broad, MMDR broad)
- **Transplantatspender:** Geschlecht, Alter zum Zeitpunkt der Nierenspende, BMI zum Zeitpunkt der Nierenspende, Hypotensive Phasen vor Nierenspende, Dauer der Behandlung auf Intensivstation vor Nierenspende

4.2 *In-vitro*-Studie: Sekretion von Chemokinen durch primäre uTEC

Ziel der experimentellen Versuche war es herauszufinden, ob uringewonnene renale tubuläre epitheliale Zellen (uTEC) unter dem Einfluss mikrobieller und inflammatorischer Stimuli mit einer erhöhten Sezernierung von Chemokinen reagieren können.

4.2.1 Isolation von uTEC

Die folgende Vorgehensweise zur Gewinnung uTEC wurde auf der Grundlage eines bereits veröffentlichten Protokolls nach Zhou et al. (85) durchgeführt. Von gesunden Probanden wurden jeweils bis zu 300ml Mittelstrahlurin in sterilen Gefäßen gewonnen. Im Anschluss wurden die Urinproben in 50 ml Zentrifugenröhrchen 10 Minuten bei Raumtemperatur und 400g zentrifugiert. Das gewonnene Urinsediment wurde in Waschpuffer aufgenommen und erneut 10 min zentrifugiert. Danach wurde das Urinsediment in Primärmedium aufgenommen und in Zellkulturflaschen für adhärente Zellen ausgesät. Nach 72 Stunden Inkubationszeit wurde das Primärmedium durch Proliferationsmedium ersetzt. Die nachfolgende Abbildung 2 veranschaulicht das hier beschriebene Procedere.

Methoden

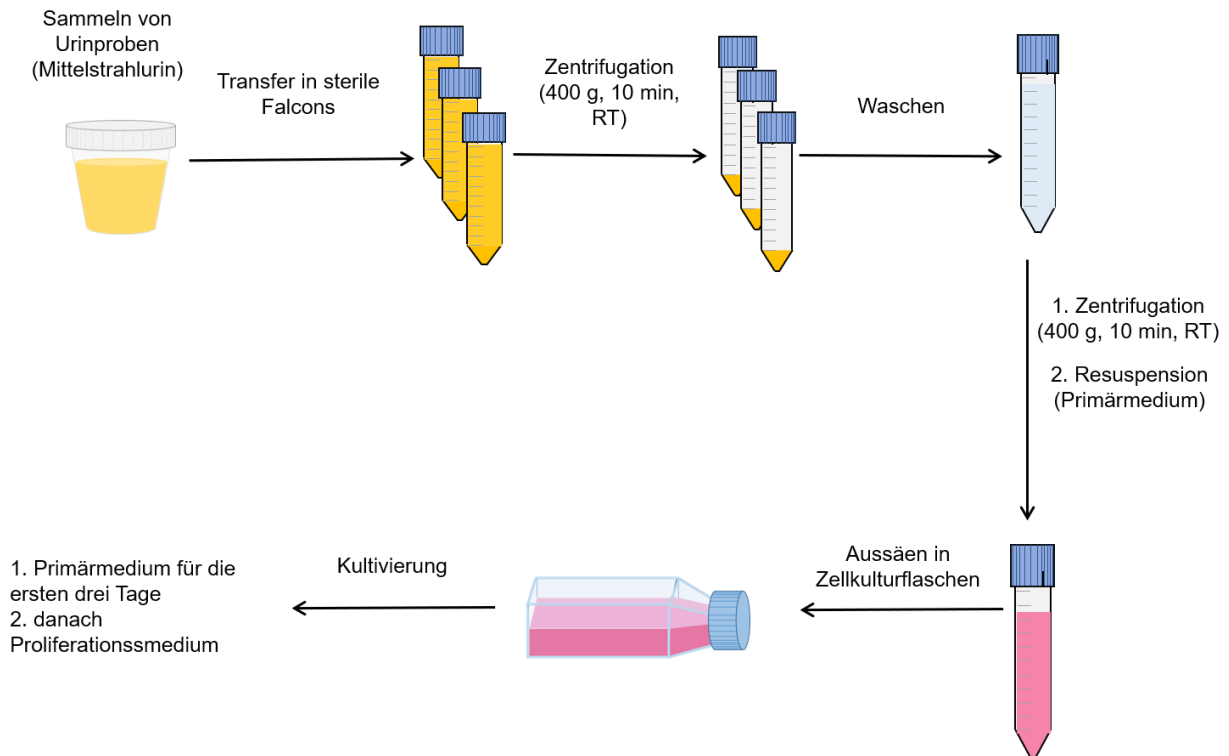


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Methodik der Isolation und Kultivierung von TEC aus Urinproben (uTEC)

4.2.2 Kultivierung von uTEC

Die Kultivierung von uTEC fand im Inkubator bei 37°C sowie 5% CO₂ statt. UTEC wurden in Zellkulturflaschen für adhärenente Zellen kultiviert. Das Proliferationsmedium wurde regelmäßig erneuert. Je nachdem wie viel Fläche des Kulturgefäßes mit adhärenenten Zellen bedeckt war, erfolgte die Erneuerung des Mediums täglich (~konfluent) bzw. alle 2-3 Tage (einzelne Kolonien, nicht konfluent). Weiterhin wurden die Kulturen regelmäßig lichtmikroskopisch überprüft. Erste Zellkolonien konnten nach 3-6 Tagen unter dem Lichtmikroskop beobachtet werden. Konfluenz (lückenlose Bedeckung der Kulturoberfläche mit adhärenenten Zellen) konnte nach 2-3 Wochen Inkubationszeit erzielt werden.

4.2.3 Ernten von uTEC

Vor Erreichen der Konfluenz (etwa 90% der Zellkulturoberfläche mit adhärenenten Zellen bedeckt) wurden die Zellen geerntet. Hierfür wurde zunächst das Proliferationsmedium entnommen. Es folgte ein Waschschriff mit Waschpuffer, um Reste des Proliferationsmediums zu entfernen. Im Anschluss wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA behandelt, zur Lösung der adhärenenten Zellen von der Kulturoberfläche. Die Zellen wurden nach Trypsinieren und vorsichtigem Lösen mit einem Zellschaber in Transfermedium aufgenommen und gewaschen. Die Bestimmung der Anzahl von Zellen wurde unter Zuhilfenahme einer Neubauer Zählkammer durchgeführt. In einer Zellkulturflasche der Größe T75 konnten bis zu 2×10^6 Zellen geerntet werden.

4.2.4 Einfrieren und Auftauen von uTEC

Die Zellen wurden in Einfriermedium in Kryoröhrchen transferiert. Die Kryoröhrchen wurden nach Hinzugabe des Einfriermediums in eine vorgekühlte Einfrierbox (Kühlrate von 1°C/Minute) überführt und anschließend für 4 Tage bei -80°C gelagert. Nach 4 Tagen wurden die Proben für die Langzeitlagerung bei -160°C in Tanks mit flüssigem Stickstoff bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Zum Auftauen wurden eingefrorene Proben in einem 37°C Wasserbad erwärmt. Anschließend wurde die enteiste Zellsuspension aus dem Kryoröhrchen im Verhältnis 1:10 mit vorgewärmten Transfermedium gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur und 400g Raumtemperatur zentrifugiert. Nach einem zweiten Waschschrift und Bestimmung der Zellanzahl wurden die Zellen in Proliferationsmedium aufgenommen, in Gelatine-beschichtete Zellkulturflaschen ausgesät und anschließend inkubiert. Nach 24 Stunden wurden nicht-adhärenente Zellen durch einen Wechsel des Mediums entfernt.

4.2.5 Stimulation von uTEC

Der experimentelle Ablauf der Stimulationsversuche mit uTEC wird zunächst in Abbildung 3 graphisch dargestellt und anschließend detailliert in Textform beschrieben.

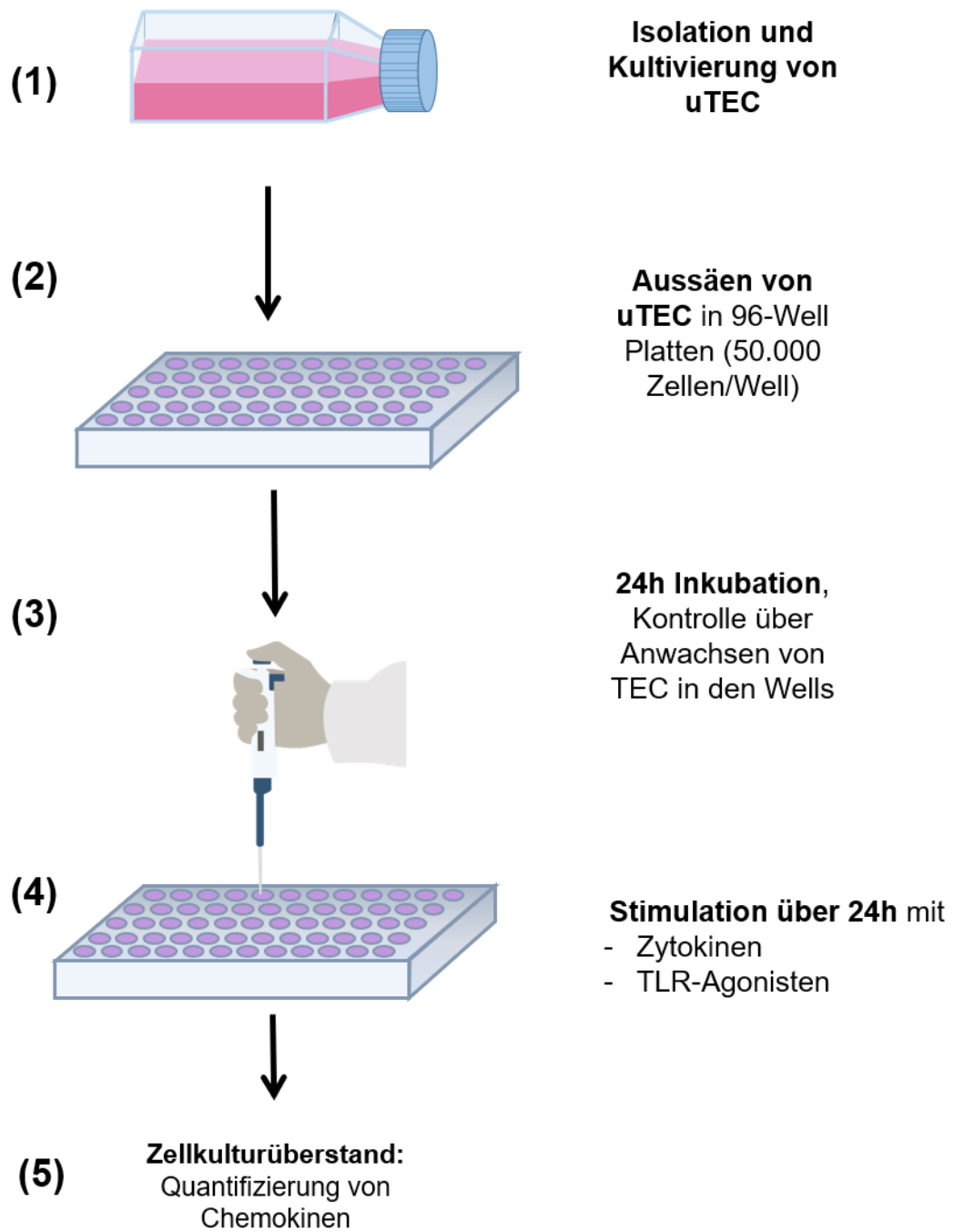


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Stimulationsversuche mit uTEC

- (1)** Die explorativen Stimulationsversuche wurden mit uTEC von insgesamt 7 Probanden durchgeführt (6 männliche und 1 weibliche ProbandInnen, Alter zwischen 20-35 Jahre). Hierfür wurden eingefrorene uTEC jeweils eine Woche vor Beginn der Stimulation aufgetaut und in Kultur genommen (Zellkulturflaschen).
- (2)** Die Stimulation von uTEC wurde in 96-Well-Patten (U-Bottom) durchgeführt. Die Platten wurden vor Aussäen der uTEC mit Gelatine beschichtet. Von den uTEC-Kulturen der Probanden wurden jeweils 2×10^6 Zellen aus den konfluenten Zellkulturflaschen geerntet. Hiernach wurden jeweils 50.000 Zellen pro Well auf die 96-Well-Platten in je 100 μ l RPMI + 10% FCS ausgesät.
- (3)** Die Platten wurden im Anschluss 24 Stunden lang inkubiert, danach erfolgte die lichtmikroskopische Kontrolle über das Anwachsen der Zellen in jedem Well. Vor Hinzugabe der Stimulantien wurde das Medium (RPMI + 10% FCS) gewechselt und etwaige nichtadhärente Zellen im Überstand entfernt.
- (4)** Die uTEC wurden mit folgenden Stimulantien 24 Stunden lang inkubiert:
 - TLR1-9 Agonisten
 - Zytokine: TNF α , IL-17A und IFN γ (einzeln und in Kombination)Die Stimulantien mit Angabe der eingesetzten Konzentrationen sind in der folgenden Tabelle 17 aufgelistet. Insgesamt wurden uTEC in 18 verschiedenen Konditionen getestet (inklusive Negativkontrolle). Die Stimulantien wurden dem Medium RPMI + 10%FCS der jeweiligen Wells hinzugefügt. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte TEC verwendet, das heißt sie wurden ohne Stimulanz inkubiert.
- (5)** Zellkulturüberstand: Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde der Zellüberstand entnommen und bei -20°C eingefroren. In dem gewonnenen Zellüberstand erfolgte dann die Quantifizierung von Chemokinen mit einem *Bead*-basierten Immunoassay (s. Unterkapitel 4.3).

Tabelle 17: Stimulation von uTEC: eingesetzte Konzentrationen der TLR-Agonisten und Zytokine

	Kondition/Stimulanz	Eingesetzte Konzentration
Kontrolle	Keine Stimulation	-
TLR-Agonisten	TLR1/2 Agonist PAM3CSK4	1 µg/ml
	TLR2 Agonist HKLM	2x10 ⁶
	TLR6/2 Agonist FSL-1	2 µg/ml
	TLR4 Agonist LPS	20 µg/ml
	TLR5 Agonist Flagellin	10 µg/ml
	TLR3 Agonist Poly (I:C) HMW	3 µg/ml
	TLR3 Agonist Poly(I:C) LMW	3 µg/ml
	TLR8 Agonist ssRNA40	20 µg/ml
	TLR7 Agonist Imiquimod	20 µg/ml
	TLR9 Agonist ODN2006	2 µg/µM
Zytokine	TNFα	20 ng/ml
	IFNγ	20 ng/ml
	IL-17A	20 ng/ml
	TNFα + IFNγ	je 20 ng/ml
	IL-17A + IFNγ	je 20 ng/ml
	TNFα + IL-17A	je 20 ng/ml
	TNFα + IL-17A + IFNγ	je 20 ng/ml

4.3 Durchflusszytometrie: Quantifizierung von Chemokinen

Für die Bestimmung der Konzentrationen von Chemokinen im Plasma von Nierentransplantatempfängern und Zellkulturüberstand von uTEC wurde das LEGENDplex™-Assay von Biolegend eingesetzt. Das Procedere zur Gewinnung der Plasmaproben von Nierentransplantatempfängern (s. Unterkapitel 4.1) und Zellkulturüberstände stimulierter uTEC (s. Unterkapitel 4.2) wurde vorhergehend beschrieben.

Folgende 13 Chemokine wurden als Teil des humanen proinflammatorischen Chemokin- Panels in den Proben quantifiziert: CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL17 und CCL20.

4.3.1 Funktionsprinzip LEGENDplex™-Assay

Das LEGENDplex™-Assay ist ein *Bead*-basiertes Nachweisverfahren, mit welchem die simultane Bestimmung von bis zu 13 löslichen Faktoren in einer Probe möglich ist. Durchflusszytometrisch können 13 *Bead*-Populationen anhand ihrer Größe und APC-Fluoreszenz voneinander unterschieden werden. Die zu detektierenden Chemokine werden spezifisch durch entsprechende Antikörper-konjugierte *Beads* auf deren Oberfläche gebunden. Somit bindet jede der 13 *Bead*-Populationen spezifisch ein bestimmtes Chemokin. Durch Hinzugabe von biotinylierten Antikörpern und Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE), können die Chemokine über Fluoreszenzsignale durchflusszytometrisch detektiert werden. Dabei ist die Menge der Chemokine proportional zur PE-Signalstärke. Die Konzentrationen der Chemokine in den Proben werden dann auf der Basis von definierten Konzentrationen eines Chemokin-Standards (8-Punkt-Standardkurve) mit der LEGENDplex™-Analysesoftware berechnet (90).

4.3.2 Versuchsdurchführung LEGENDplex™-Assay

Es wurde eine modifizierte Form des Herstellerprotokolls verwendet. Die Modifikationen des Standard-Protokolls sind jeweils für Zellkulturüberstand- und Plasmaproben im Folgenden beschrieben. Alle Versuche wurden in einer 96-Well-V-Bodenplatte durchgeführt. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte am Cytoflex S (Beckman Coluter). Die Rohdaten wurden mit der LEGENDplex™-Analysesoftware Version 8.0 ausgewertet.

Zellkulturüberstände: Die Modifikationen vom Standard-Protokoll beziehen sich ausschließlich auf eingesetzte Assay-Volumina. Ablauf- und Versuchsdurchführung wurde gemäß des Standard-Protokolls des Herstellers befolgt. Zellkulturüberstandproben wurden, gemäß Hersteller-Empfehlung, nicht verdünnt. Folgende modifizierte Volumina wurden im Assay eingesetzt: 12,5µl Assaypuffer pro Well, 12,5µl Standard pro Standard-Well, 12,5µl unverdünnter Zellkulturüberstand pro Proben-Well, 12,5µl Mixed *Beads* pro Well, 12,5µl Detektionsantikörper pro Well, 12,5µl SA-PE pro Well. Messergebnisse unterhalb der Grenze der 8-Punkt-Standardkurven, werden auf den niedrigsten Standard-Assaywert gesetzt. Für die Messung der Zellkulturüberstände aus den Stimulationsversuchen wurden aufgrund der hohen Probenanzahl insgesamt zwei Assays durchgeführt. Es wurden alle Proben von 4 uTEC-Zelllinien simultan in einem Assay (n=4), sowie alle Proben von 3 weiteren uTEC-Zelllinien simultan in einem zweiten Assay (n=3) gemessen. Die Proben eine jeweilige uTEC-Linie (gepaarte Stichproben) betreffend wurden somit unter gleichen Messbedingungen aufgenommen.

Plasmaproben: Die Modifikationen vom Standard-Protokoll beziehen sich ausschließlich auf eingesetzte Assay-Volumina. Ablauf- und Versuchsdurchführung wurde gemäß des Herstellerprotokolls befolgt. Plasmaproben wurden gemäß Empfehlung des Hersteller-Protokolls im 1:1 Verhältnis mit Assaypuffer verdünnt. Folgende modifizierte Volumina wurden im Assay eingesetzt: 12,5µl Matrix B pro Standard-Well, 12,5µl Assaypuffer pro Proben-Well, 12,5µl Standard pro Standard-Well, 12,5µl verdünntes Plasma pro Proben-Well, 12,5µl Mixed *Beads* pro Well, 12,5µl Detektionsantikörper pro Well, 12,5µl SA-PE. Messergebnisse unterhalb der Grenze der 8-Punkt-Standardkurven, werden auf den niedrigsten Standard-Assaywert gesetzt. Alle Plasmaproben wurden gemeinsam in einem LEGENDplex™-Assay mit 8-Punkt-Standardreihe gemessen.

4.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung aller in dieser Arbeit verwendeten Daten erfolgte mit Hilfe der folgenden Programme: Microsoft Excel (Version 25), GraphPad Prism (Version 8.0), und R (Version 3.6.1). Abbildungen im Ergebnisteil wurden mit GraphPad Prism (Version 8.0) erstellt.

***In-Vivo*-Studie: Plasma-Chemokine in DGF- und nonDGF-Patienten:**

- **Risikofaktoren der DGF:** Deskriptive statistische Angaben werden, sofern nicht anders angegeben, als Mittelwert mit Standardabweichung berichtet. Für die Prüfung zweier unabhängiger Stichproben mit normalverteilten Daten wurde der Zweistichproben-t-Test verwendet, und mit nicht normalverteilten Daten wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet (zweiseitige Testung). Die Prüfung von dichotomen Merkmalen erfolgte mittels *Fisher Exact Probability* Test. Ergebnisse werden als signifikant gewertet, wenn der p-Wert bei $<0,05$ liegt. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die Stichprobengröße der Patientengruppen je nach betrachtetem Studienzeitpunkt variiert (s. Tabelle 16 auf Seite 35). Patientencharakteristika und Risikofaktoren einer DGF werden für die Gesamt-Stichprobengröße berichtet.
- Mit der **multivariaten Varianzanalyse (MANOVA)** wurde geprüft, ob sich die Gruppen DGF und nonDGF hinsichtlich der Plasma-Chemokine CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL17 und CCL20 signifikant voneinander unterscheiden. In die Berechnung der multivariaten Varianzanalyse (MANOVA) gehen als unabhängige Variable die Gruppenzugehörigkeit („DGF“/„nonDGF“) und als abhängige Variablen die Konzentration der genannten Chemokine ein. Mit der MANOVA wurden alle gemessenen Chemokine in einem Modell geprüft. Es wurde jeweils eine MANOVA für die Daten an Tag 0 (nonDGF n=19, DGF n=19), sowie an Tag 3 (nonDGF n=18, DGF n=18) berechnet. Ergebnisse werden als signifikant gewertet, wenn der p-Wert bei $<0,05$ liegt.

- Es wurde die **mixed-design Varianzanalyse (mixed ANOVA)** berechnet, um Veränderungen der Chemokinspiegel im Laufe der Zeit zu bewerten (Kinetik). Hierfür wurden die Chemokindaten der Patienten betrachtet, von welchen zu beiden Zeitpunkten Plasmaproben akquiriert wurden (DGF n=15, nonDGF n=17). In die Berechnung gehen als Zwischensubjektfaktor die Gruppenzugehörigkeit (DGF/nonDGF) und als Innersubjektfaktor die Zeit (Tag 0 und Tag 3) ein. Die abhängige Variable stellt die Chemokinkonzentration im Plasma dar (CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL17 und CCL20), welche an zwei Zeitpunkten bei derselben Person gemessen wurde. Es werden die zwei Haupteffekte „Gruppenzugehörigkeit“ und „Zeit“ sowie der Interaktionseffekt (Wirkung beider Haupteffekte zusammen) beurteilt. Die Ergebnisse werden als signifikant gewertet, wenn der p-Wert bei $<0,05$ liegt.

***In-vitro*-Studie Stimulationsversuche mit uTEC (explorativ):** Für die Prüfung zweier gepaarter Stichproben mit nicht normalverteilten Daten wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet (zweiseitige Testung). Bei kleiner Stichprobengröße erfolgte die explorative Auswertung der Daten. Daher wurde auf die Adjustierung des globalen α -Niveaus für multiples Testen verzichtet. Unterschiede zweier gepaarter Stichproben mit einem p-Wert $<0,05$ werden als relevant gewertet und in den Abbildungen des Ergebnisteils mit Asterisk gekennzeichnet ($p < 0,05$: *).

5 Ergebnisse

5.1 *In-vivo*-Studie: Plasma-Chemokine in DGF- und nonDGF-Patienten

5.1.1 Charakterisierung der Patientenkohorte

In der folgenden Tabelle 18 werden die Eigenschaften der Nierentransplantatempfänger und Nierentransplantatspender für die Patientengruppen DGF und nonDGF aufgeführt. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang der DGF mit den für diese Studie untersuchten Risikofaktoren (p-Werte s. Tabelle 18 in Spalte 3): empfängerbezogen (Alter, Geschlecht, BMI, Dialysezeit vor Nierentransplantation, vorhergehende Transplantationen), empfänger-/spenderbezogen (Kalte Ischämiezeit, HLA-Mismatches), spenderbezogen (Alter, Geschlecht, BMI, hypotensive Phasen, Anzahl der Tage auf Intensivstation).

Tabelle 18: Eigenschaften der Patientenkohorte (Nierentransplantatempfänger und Nierentransplantatspender), Daten werden als Mittelwert (\pm Standardabweichung) bzw. Anzahl dargestellt. Der p-Wert ist in der dritten Spalte angegeben (Risikofaktoren einer DGF), Abk. Nierentransplantation (NTx).

		nonDGF (n=20)		DGF (n=22)		p-Wert
NTx-Empfänger	Alter [a]	53,2 (\pm 11,6)		54,6 (\pm 17,1)		0,76
	Geschlecht, männlich/weiblich [n]	13/7		17/5		0,50
	BMI [kg/m ²]	26,1 (\pm 5,2)	n=17	25,7 (\pm 3,9)	n=19	0,80
	Dialysezeit vor NTx [a]	6,9 (\pm 4,5)		7,6 (\pm 2,6)		0,56
	Anzahl Dialysen in der ersten Woche nach NTx	0 (\pm 0)		2,1 (\pm 1,0)		
	vorhergehende Transplantation, ja/nein [n]	3/17		7/15		0,28
	Grunderkrankung CKD					
	Glomerulonephritis	5		1		
	Diabetische Nephropathie	1		3		
	Hypertensive Nephropathie	3		2		
	Polyzystische Nierenerkrankung	2		3		
	Interstitielle Nephritis	1		1		
	IgA-Nephropathie			2		

Ergebnisse

		nonDGF (n=20)		DGF (n=22)		p-Wert
NTx-Empfänger	<i>[Fortsetzung]</i> Grunderkrankung CKD					
	Medikamententoxizität	1		3		
	Nephrozirrhose	1		4		
	FSGS	2				
	chronische Pyelonephritis	1				
	Fabry's Disease	1				
	Morbus Wegener			1		
	Zystinosis	1				
	hypoplastische Nieren			1		
	Zustand nach Nephrektomie			1		
	unbekannte Genese	1				
	Immunsuppression					
	Basiliximab, Tacrolimus, Mycophenolat-Mofetil, Methylprednisolon	19		18		
	Infliximab, Thymoglobulin, Tacrolimus, Mycophenolat-Mofetil, Methylprednisolon	1		4		
	NTx-Empfänger/Spender	Kalte Ischämiezeit [h]	9,6 (±4,1)	n=18	10,3 (±4,0)	n=21
HLA-Mismatches broad [n]		1,7 (±1,9)	n=19	2,6 (±1,7)	n=21	0,11
MM-A broad		0,7 (±0,8)	n=19	0,9 (±0,7)	n=21	0,43
MM-B broad		0,6 (±0,8)	n=19	1,0 (±0,7)	n=21	0,16
MM-DR broad		0,4 (±0,6)	n=19	0,8 (0,7)	n=21	0,13

Ergebnisse

		nonDGF (n=20)		DGF (n=22)		p-Wert
NTx-Spender	Alter [a]	50,0 (±16,8)		57,0 (±16,6)		0,19
	Geschlecht, männlich/weiblich [n]	9/10	n=19	11/11		0,99
	BMI [kg/m ²]	25,8 (±4,8)		27,0 (±4,3)		0,19
	Hypotensive Phasen, ja/nein [n]	0/20		2/19	n=21	0,49
	Anzahl Tage auf Intensivstation [d]	5,8 (±4,7)		6,2 (±4,1)		0,58

Ferner wurde im vorliegenden Patientenkollektiv der Einfluss der DGF auf die Nierenfunktion sowie Länge des Krankenhausaufenthalts nach Transplantation evaluiert. Patienten mit DGF wiesen einen Monat sowie ein Jahr nach erfolgter Transplantation eine signifikant geringere eGFR im Vergleich zu nonDGF-Patienten auf (**s. Abbildung 4B**). Patienten mit DGF hatten nach Nierentransplantation einen signifikant längeren stationären Aufenthalt im Krankenhaus im Vergleich zu nonDGF-Patienten (**s. Abbildung 4A**).

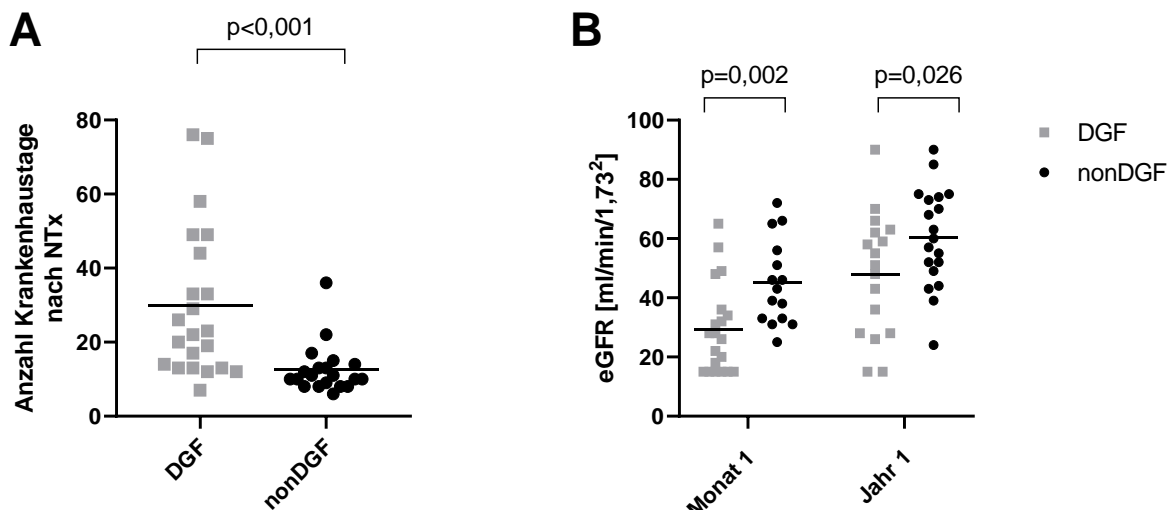


Abbildung 4: Patienten-Outcome nach Nierentransplantation (A) Anzahl Krankenhaustage; (B) eGFR:

(A) Einzelwerte mit Mittelwert für DGF n=22, nonDGF n=20, t-Test (exakter p-Wert);

(B) Einzelwerte mit Mittelwert für Monat 1 nach NTx (DGF n=20, nonDGF n=15) und Jahr 1 nach NTx (DGF n=17, nonDGF n=19), t-Test (exakte p-Werte)

5.1.2 Chemokine im Plasma der Nierentransplantatempfänger

Die Chemokine CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL17 und CCL20 waren zu beiden Zeitpunkten im Plasma von Nierentransplantatempfängern detektierbar (**s. Abbildung 5 A-F, Abbildung 6 A-F, Abbildung 7**). Am höchsten konzentriert waren CCL5 (Median >5000pg/ml Tag 0, >3000pg/ml Tag3; **s. Abbildung 5D**), CCL2 (Median >1000pg/ml Tag 0 und Tag 3; **s. Abbildung 5A**) und CCL11 (Median >800pg/ml Tag 0, >600pg/ml Tag 3; **s. Abbildung 5E**).

Zwischen den untersuchten Gruppen DGF und nonDGF war kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Konzentration von Chemokinen zu beiden untersuchten Zeitpunkten festzustellen. Dabei zeigte die Berechnung der MANOVA für CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL17 und CCL20 im Plasma vor Nierentransplantation (Tag 0) keinen statistisch signifikanten Unterschied (MANOVA: **p=0,403**) zwischen den Patientengruppen DGF und nonDGF (**s. „Tag 0“ Abbildung 5 A-F, Abbildung 6 A-F, Abbildung 7**). Weiterhin erwies sich für die Konzentration der Plasma-Chemokine nach Nierentransplantation (Tag 3) kein statistisch signifikanter Unterschied (MANOVA: **p=0,652**) zwischen den Patientengruppen DGF und nonDGF (**s. „Tag 3“ Abbildung 5 A-F, Abbildung 6 A-F, Abbildung 7**).

Zwischen DGF- und nonDGF-Patienten zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Kinetik der Plasma-Chemokinspiegel. Die Berechnung der mixed ANOVA zeigte keinen statistisch signifikanten Interaktionseffekt für die Chemokine CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL17 und CCL20 (mixed ANOVA Interaktionseffekt $p > 0,05$ für jedes Chemokin). Dies bedeutet, dass für die genannten Chemokine kein signifikanter Unterschied der Gruppen DGF und nonDGF in Abhängigkeit der Zeit bestand. Ferner zeigte sich kein statistisch signifikanter Haupteffekt der Variable Gruppenzugehörigkeit (DGF versus nonDGF) für CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL17 und CCL20 (mixed ANOVA Haupteffekt „Gruppe“ $p > 0,05$ für jedes Chemokin). Dies bedeutet, dass es - unabhängig von den beiden Messzeitpunkten – keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen DGF und nonDGF gegeben hat. Es zeigte sich ein signifikanter Haupteffekt der Variable „Zeit“ (Tag 0 versus Tag 3) für die Chemokine CCL11 ($p < 0,01$) und CCL5 ($p < 0,01$). Dies weist darauf hin, dass es - unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit – eine signifikante Verringerung der Plasmakonzentration von CCL11 und CCL5 zwischen Tag 0 und Tag 3 gegeben hat. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Haupteffekt der Variable „Zeit“ für die Chemokine CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL2, CCL3, CCL4, CCL17 und CCL20 (mixed ANOVA Haupteffekt „Zeit“ $p > 0,05$).

- DGF
- nonDGF

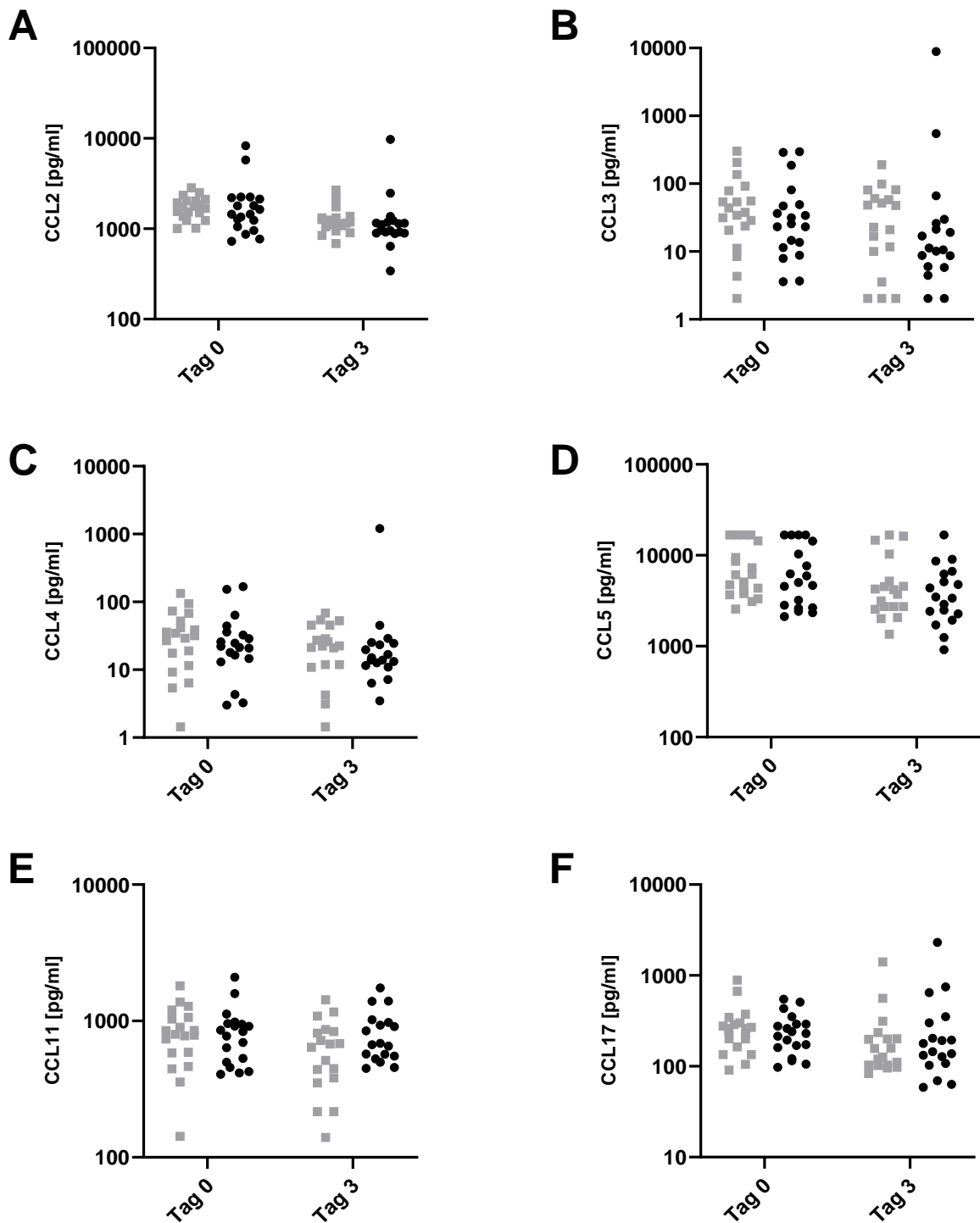


Abbildung 5: Konzentration von (A) CCL2, (B) CCL3, (C) CCL4, (D) CCL5, (E) CCL11, (F) CCL17 im Plasma von Patienten mit DGF und Patienten ohne DGF (nonDGF) vor und nach Nierentransplantation (Tag 0, Tag 3), logarithmische Achsendarstellung der Einzelwerte für n=19 (Tag 0) bzw. n=18 (Tag 3) je Gruppe, Unterschiede zwischen den Gruppen (MANOVA) an Tag 0 ($p=0,403$) und Tag 3 ($p=0,652$) nicht signifikant.

- DGF
- nonDGF

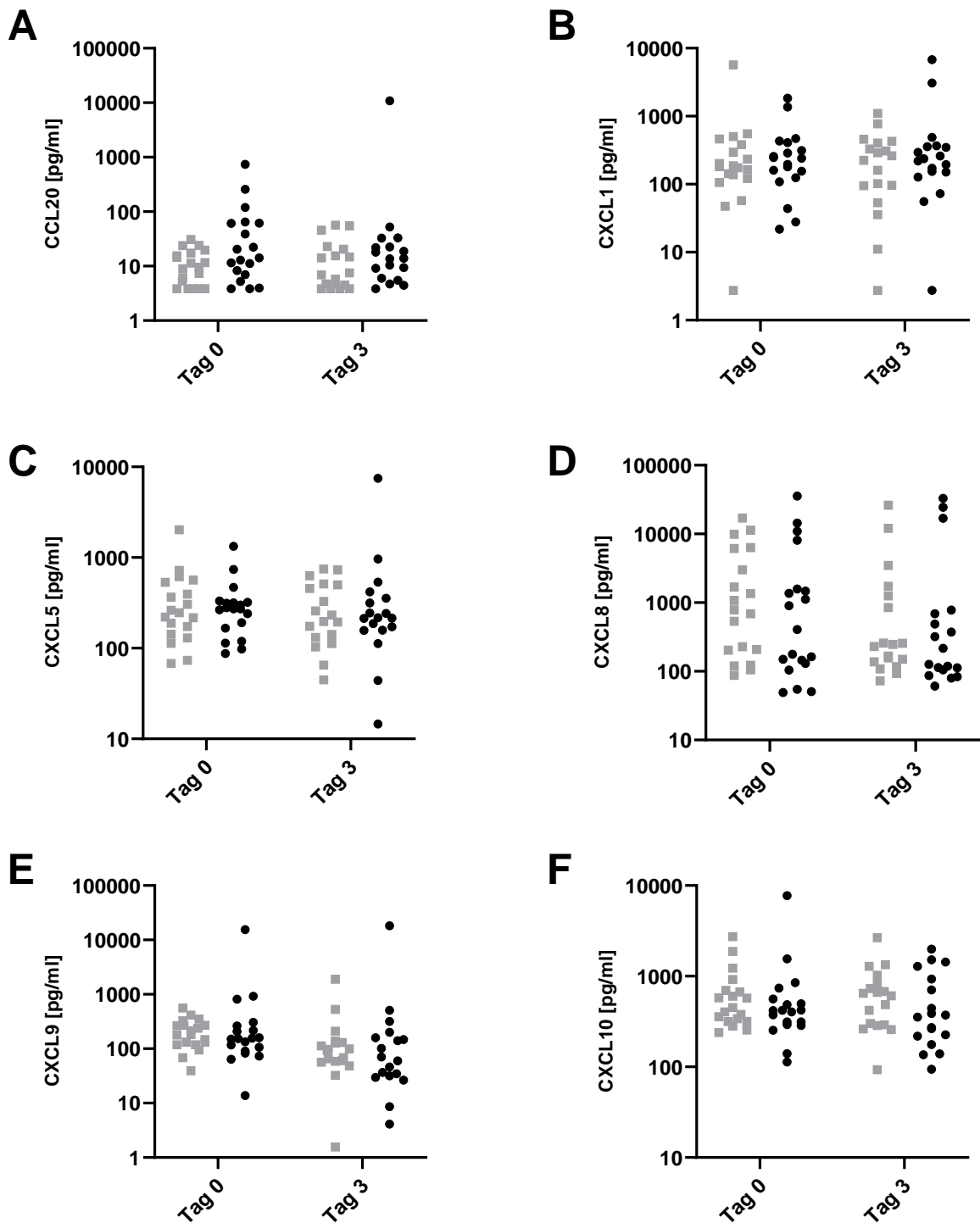


Abbildung 6: Konzentration (A) CCL20, (B) CXCL1, (C) CXCL5, (D) CXCL8, (E) CXCL9, (F) CXCL10 im Plasma von Patienten mit DGF und Patienten ohne DGF (nonDGF) vor und nach Nierentransplantation (Tag 0, Tag 3), logarithmische Achsendarstellung der Einzelwerte für n=19 (Tag 0) bzw. n=18 (Tag 3) je Gruppe, Unterschiede zwischen den Gruppen (MANOVA) an Tag 0 ($p=0,403$) und Tag 3 ($p=0,652$) nicht signifikant.

- DGF
- nonDGF

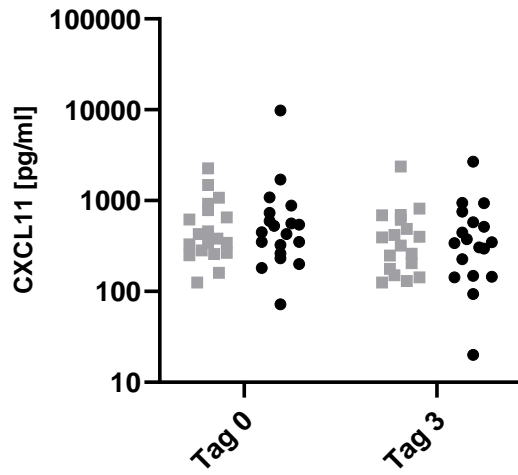


Abbildung 7: Konzentration von CXCL11 im Plasma von Patienten mit DGF und Patienten ohne DGF (nonDGF) vor und nach Nierentransplantation (Tag 0, Tag 3), logarithmische Achsendarstellung der Einzelwerte für $n=19$ (Tag 0) bzw. $n=18$ (Tag 3) je Gruppe, Unterschiede zwischen den Gruppen (MANOVA) an Tag 0 ($p=0,403$) und Tag 3 ($p=0,652$) nicht signifikant.

5.2 *In-vitro*-Studie: Sekretion von Chemokinen durch primäre uTEC

Im Folgenden wurde explorativ untersucht, unter welchen inflammatorischen und mikrobiellen Bedingungen eine Chemokinsekretion durch uTEC induzierbar ist. Hierfür wurden uTEC mit Zytokinen und TLR-Agonisten stimuliert und Chemokine im Zellkulturüberstand quantifiziert (s. Unterkapitel 4.2).

Niedrige Konzentrationen von CXCL10 und CXCL11 waren im Zellkulturüberstand unbehandelter uTEC nachzuweisen. Im Vergleich hierzu führte die Stimulation mit IFN γ (einzeln sowie in Kombination mit TNF α und IL-17A) zu einer starken Induktion von CXCL10 und CXCL11 durch uTEC (s. **Abbildung 8A** und **Abbildung 9A**). Ferner zeigte sich eine deutlich erhöhte Sekretion von CXCL10 und CXCL11 durch uTEC nach Stimulation mit dsRNA (Poly(I:C) HMW und LMW) (s. **Abbildung 8B** und **Abbildung 9B**).

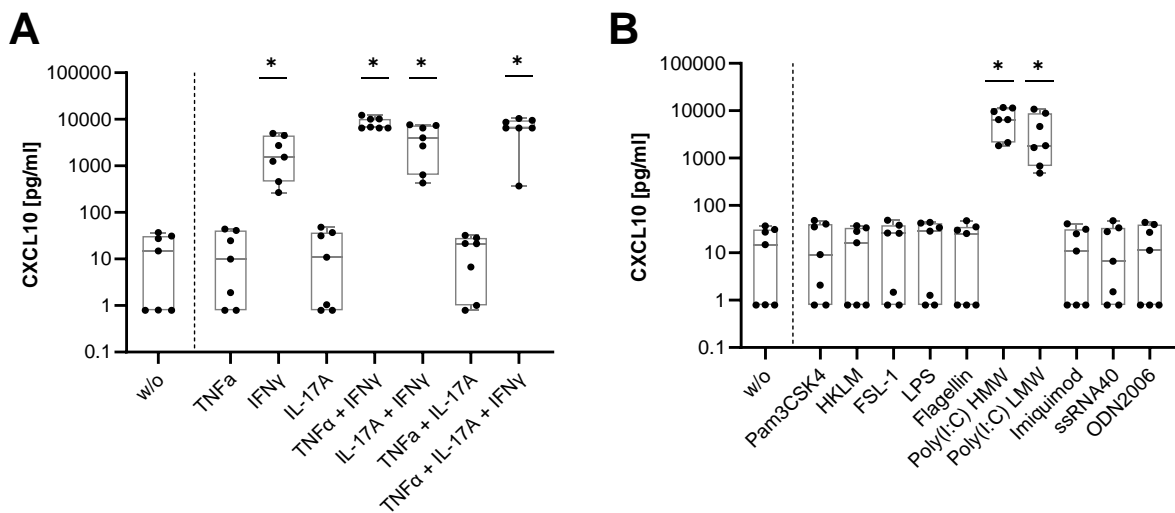


Abbildung 8: Konzentration von CXCL10 im Zellkulturüberstand von uTEC nach Stimulation mit (A) Zytokinen und (B) TLR-Agonisten im Vergleich zur nichtstimulierten Kontrolle (w/o), logarithmische Darstellung der Einzelwerte mit Boxplots für n=7, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (p<0,05: *)

Ergebnisse

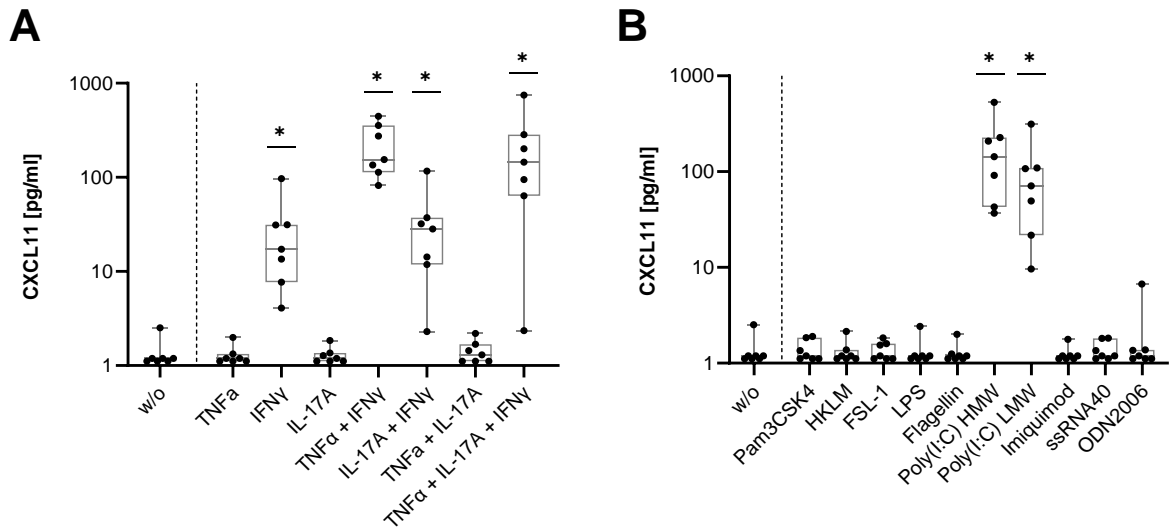


Abbildung 9: Konzentration von CXCL11 im Zellkulturüberstand von uTEC nach Stimulation mit (A) Zytokinen und (B) TLR-Agonisten im Vergleich zur nichtstimulierten Kontrolle (w/o), logarithmische Darstellung der Einzelwerte mit Boxplots für $n=7$, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ($p < 0,05$: *)

Weiterhin waren im Zellkulturüberstand unbehandelter uTEC niedrige Konzentrationen von CXCL9 zu detektieren. Hiergegen war eine leichte Induktion nach kombinierter Zytokin-Stimulation mit IFN γ und/oder TNF α und/oder IL-17A (**s. Abbildung 10A**) zu beobachten. Die CXCL9-Sekretion war ebenfalls nach Stimulation mit triacyliertem Lipopeptid (Pam3CSK4) und dsRNA (Poly(I:C) HMW) (**s. Abbildung 10B**) zu beobachten. Dabei waren die nachgewiesenen Konzentrationen von CXCL9 in allen getesteten Konditionen gering (**s. Abbildung 10A,B**).

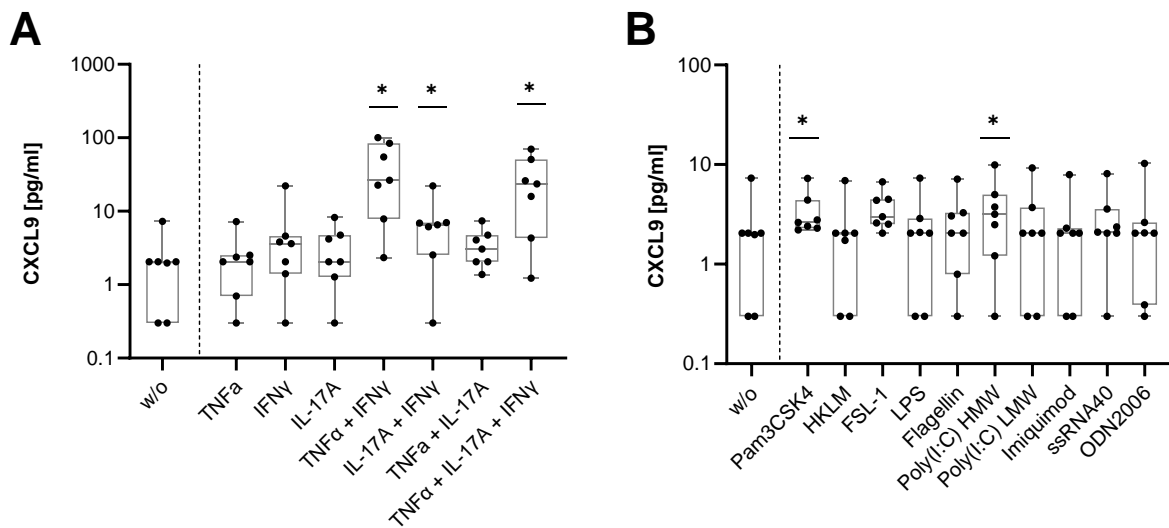


Abbildung 10: Konzentration von CXCL9 im Zellkulturüberstand von uTEC nach Stimulation mit (A) Zytokinen und (B) TLR-Agonisten im Vergleich zur nichtstimulierten Kontrolle (w/o), logarithmische Darstellung der Einzelwerte mit Boxplots für n=7, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ($p < 0,05$: *)

Ergebnisse

Im Vergleich zur nichtstimulierten Kontrolle zeigte sich eine leicht erhöhte Konzentration von CXCL1 nach Stimulation mit TNF α sowie eine deutlich erhöhte Konzentration nach IL17A-Stimulation im Zellkulturüberstand von uTEC. Auch die kombinierte Zytokin-Stimulation mit TNF α und/oder IL-17A und/oder IFN γ führte zu einer deutlich erhöhten Produktion von CXCL1 (**s. Abbildung 11 A**). Darüber hinaus ließ sich CXCL1 durch folgende TLR-Liganden induzieren: Nach Stimulation mit triacyliertem Lipopeptid (Pam3CSK4), diacyliertem Lipopeptid (FSL-1), Flagellin, dsRNA (Poly(I:C) HMW) und CpG-Oligonukleotid (ODN2006) war im Median CXCL1 erhöht (**s. Abbildung 11 B**).

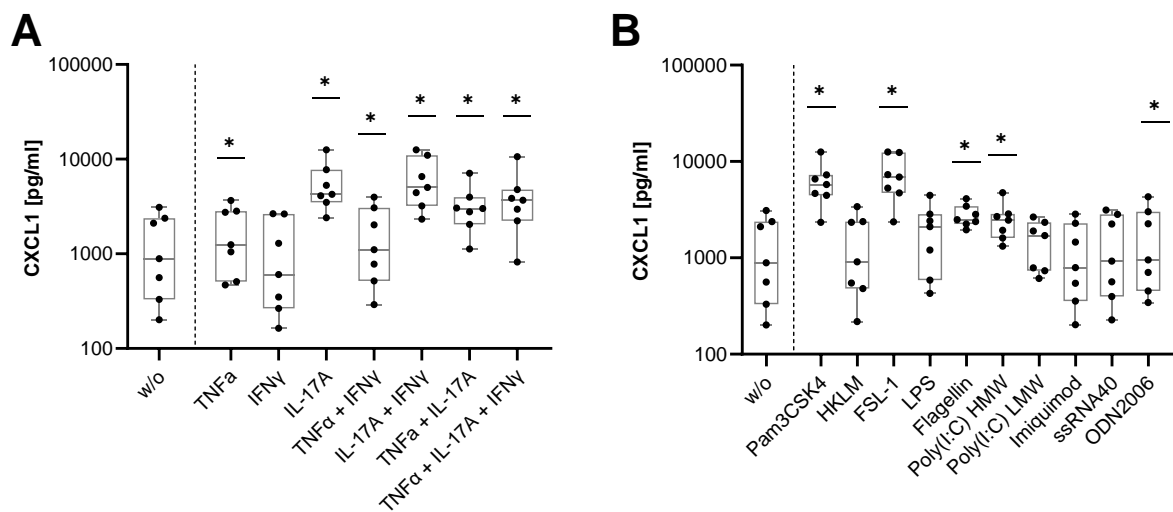


Abbildung 11: Konzentration von CXCL1 im Zellkulturüberstand von uTEC nach Stimulation mit (A) Zytokinen und (B) TLR-Agonisten im Vergleich zur nichtstimulierten Kontrolle (w/o), logarithmische Darstellung der Einzelwerte mit Boxplots für n=7, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ($p < 0,05$: *)

Ergebnisse

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ließ sich eine deutlich erhöhte Konzentration von CXCL5 im Zellkulturüberstand nach Stimulation mit IL17A feststellen (**s. Abbildung 12A**). Auch nach Stimulation mit triacyliertem Lipopeptid (Pam3CSK4) und diacyliertem Lipopeptid (FSL-1) zeigte sich eine mäßig erhöhte Sekretion von CXCL5 durch uTEC. Weiterhin war eine leichte Induktion nach Stimulation mit Flagellin und dsRNA (Poly(I:C) HMW und LMW) zu sehen (**s. folgende Abbildung 12B**).

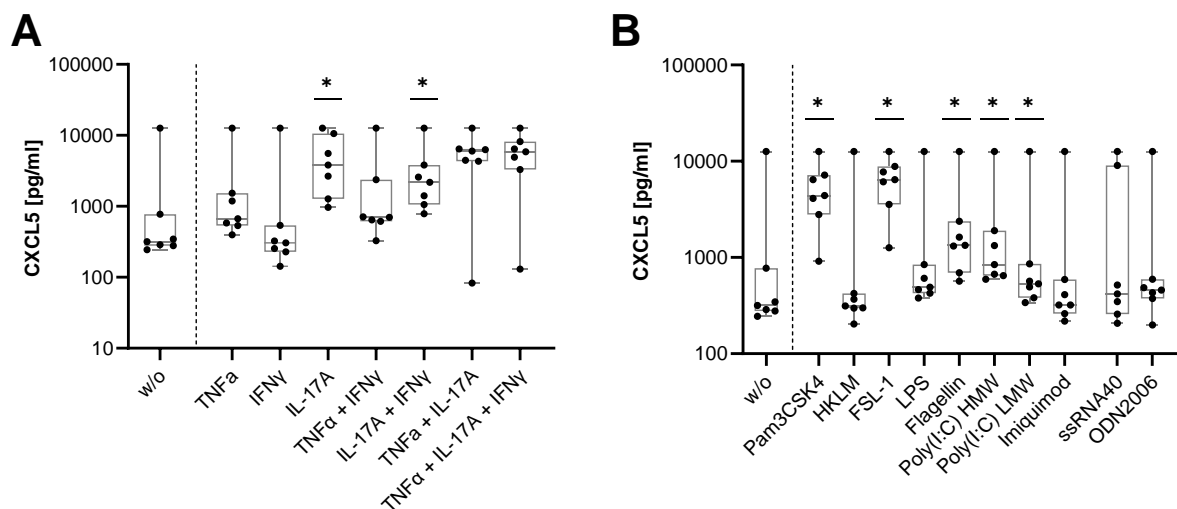


Abbildung 12: Konzentration von CXCL5 im Zellkulturüberstand von uTEC nach Stimulation mit (A) Zytokinen und (B) TLR-Agonisten im Vergleich zur nichtstimulierten Kontrolle (w/o), logarithmische Darstellung der Einzelwerte mit Boxplots für n=7, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ($p < 0,05$: *)

Ergebnisse

Im Zellkulturüberstand nichtstimulierter uTEC waren minimale Konzentrationen von CCL5 nachzuweisen. Hiergegen führte die kombinierte Stimulation mit TNF α , IL-17A und IFN γ zu einer leicht gesteigerten Sekretion von CCL5, dabei war die detektierbaren Konzentrationen in allen Zytokin-stimulierten Konditionen gering (<15pg/ml) (**s. Abbildung 13A**). Eine im Vergleich zur nichtstimulierten Kontrolle deutlich erhöhte Konzentration von CCL5 ließ sich nach Stimulation mit dsRNA (Poly(I:C) HMW und LMW) beobachten. Weiterhin war nach Stimulation mit FSL-1 eine leichte Induktion von CCL5 im Zellkulturüberstand zu beobachten (**s. Abbildung 13B**).

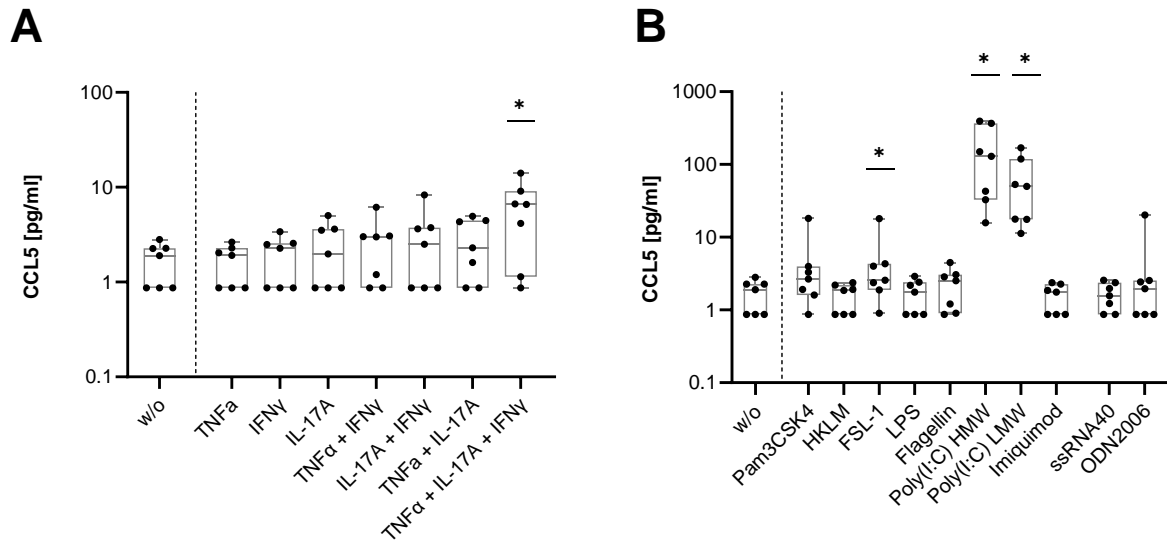


Abbildung 13: Konzentration von CCL5 im Zellkulturüberstand von uTEC nach Stimulation mit (A) Zytokinen und (B) TLR-Agonisten im Vergleich zur nichtstimulierten Kontrolle (w/o), logarithmische Darstellung der Einzelwerte mit Boxplots für n=7, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ($p < 0,05$: *)

Eine im Vergleich zur nichtstimulierten Kontrolle mäßige Induktion von CCL2 war nach Stimulation mit IL17-A sowie eine im Median deutliche Erhöhung nach kombinierter Zytokin-Stimulation zu sehen (**s. Abbildung 14A**). Die Stimulation mit dsRNA (Poly(I:C) LMW) führte zu einer im Median leichten Erhöhung CCL2 (**s. Abbildung 14B**).

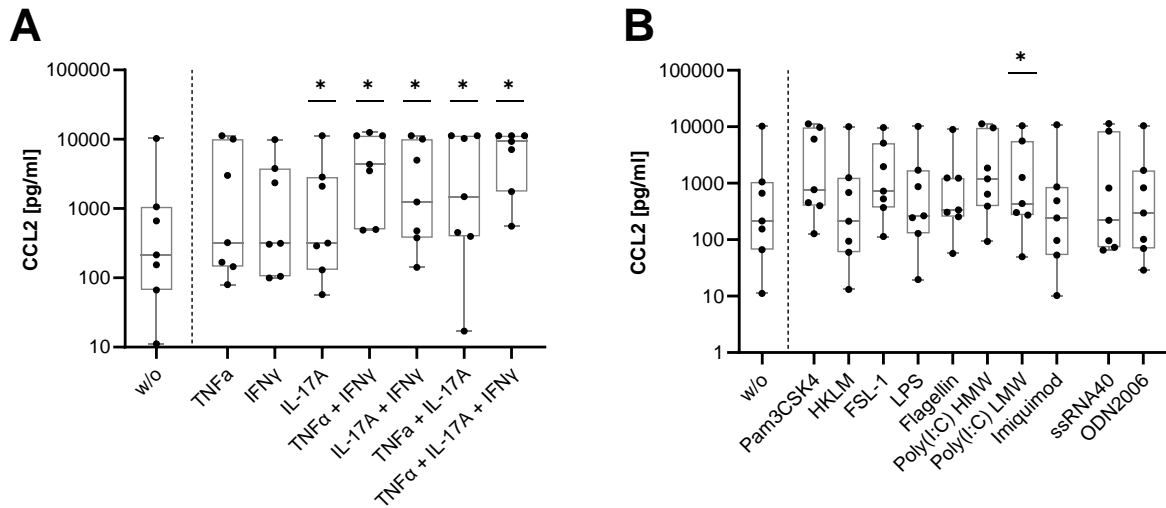


Abbildung 14: Konzentration von CCL2 im Zellkulturüberstand von uTEC nach Stimulation mit (A) Zytokinen und (B) TLR-Agonisten im Vergleich zur nichtstimulierten Kontrolle (w/o), logarithmische Darstellung der Einzelwerte mit Boxplots für n=7, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (p<0,05: *)

Im Vergleich zur nichtstimulierten Kontrolle führte die Stimulation mit triacyliertem Lipopeptid (Pam3CSK4) und diacyliertem Lipopeptid (FSL-1) zu einer leichten Induktion von CCL11 (**s. Abbildung 15B**). Eine ebenfalls leichte Induktion von CLL11 war nach kombinierter Zytokin-Stimulation zu beobachten (**s. Abbildung 15A**). Hierbei zeigten sich die detektierten Konzentrationen von CCL11 in allen getesteten Konditionen gering (**s. Abbildung 15 A,B**).

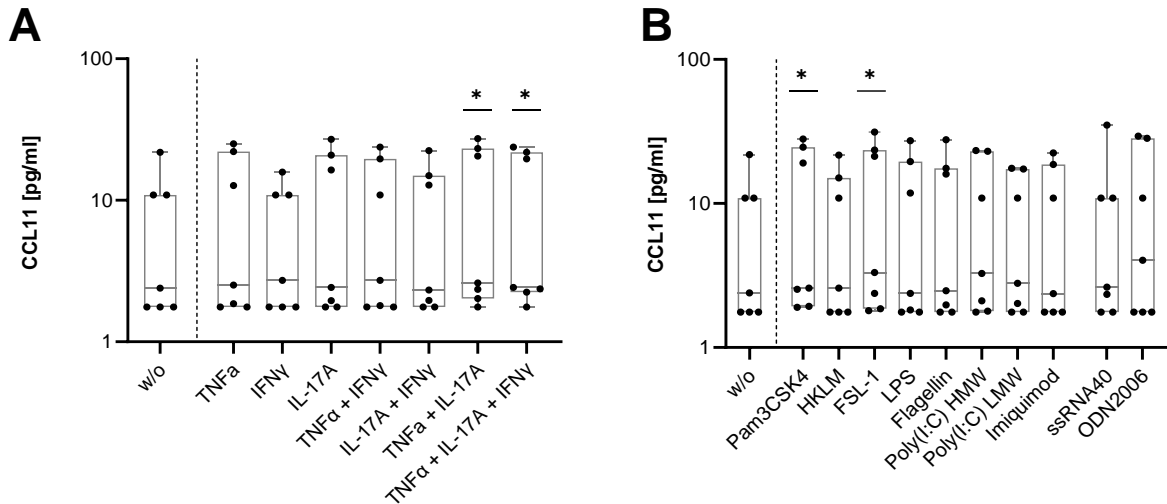


Abbildung 15: Konzentration von CCL11 im Zellkulturüberstand von uTEC nach Stimulation mit (A) Zytokinen und (B) TLR-Agonisten im Vergleich zur nichtstimulierten Kontrolle (w/o), logarithmische Darstellung der Einzelwerte mit Boxplots für n=7, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (p<0,05: *)

Ergebnisse

Niedrige Konzentrationen von CCL17 waren im Zellkulturüberstand unbehandelter uTEC nachzuweisen. Eine hierzu im Vergleich leichte Induktion von CCL17 ließ sich nach Stimulation mit TNF α und IFN γ (**s. Abbildung 16A**) sowie nach Stimulation mit triacyliertem Lipopeptid (Pam3CSK4) und dsRNA (Poly(I:C) HMW) beobachten (**s. Abbildung 16B**). Hierbei ließen sich in allen getesteten Konditionen nur geringe Mengen von CCL17 nachweisen.

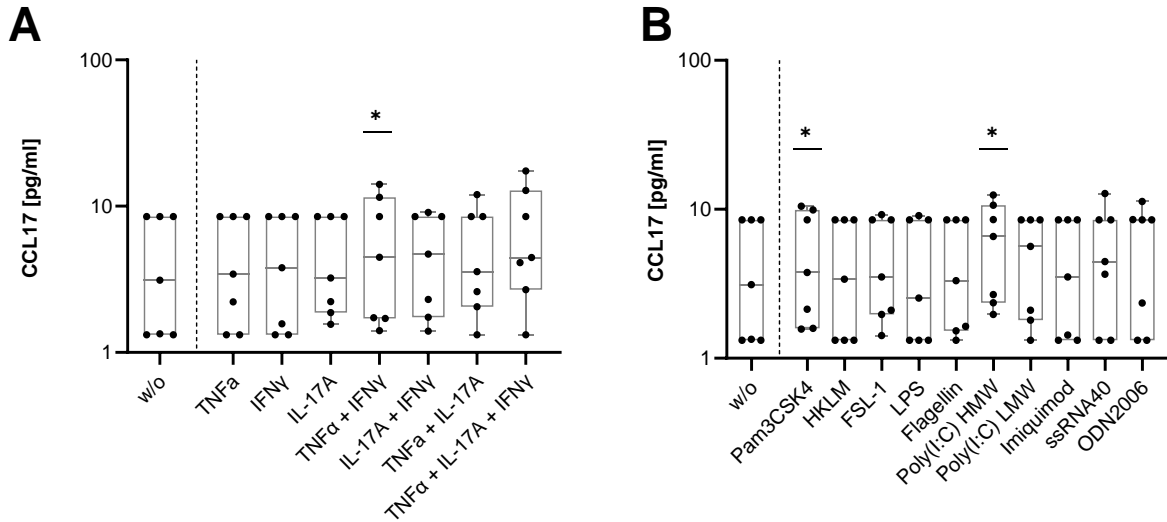


Abbildung 16: Konzentration von CCL17 im Zellkulturüberstand von uTEC nach Stimulation mit (A) Zytokinen und (B) TLR-Agonisten im Vergleich zur nichtstimulierten Kontrolle (w/o), logarithmische Darstellung der Einzelwerte mit Boxplots für $n=7$, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ($p < 0,05$: *)

Im Vergleich zur nichtstimulierten Kontrolle führte die Stimulation mit triacyliertem Lipopeptid (Pam3CSK4) sowie CpG-Oligonukleotid (ODN2006) zu einer moderat erhöhten Konzentration von CCL20 im Zellkulturüberstand (**s. Abbildung 17B**). Eine mäßige Induktion von CCL20 zeigte sich nach Stimulation mit TNF α und IL17A (**s. Abbildung 17A**).

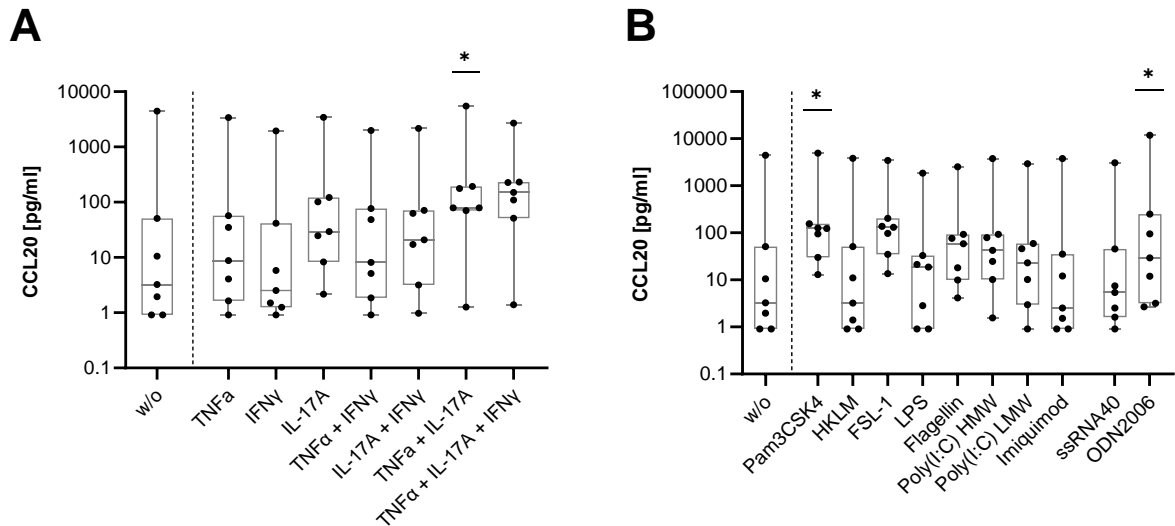


Abbildung 17: Konzentration von CCL20 im Zellkulturüberstand von uTEC nach Stimulation mit (A) Zytokinen und (B) TLR-Agonisten im Vergleich zur nichtstimulierten Kontrolle (w/o), logarithmische Darstellung der Einzelwerte mit Boxplots für n=7, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ($p < 0,05$: *)

Die CCL3- und CCL4-Sekretion durch uTEC zeigte sich nach Stimulation mit Zytokinen und TLR-Liganden nicht erhöht. Dabei waren die detektierbaren Konzentrationen von CCL3 und CCL4 in allen Konditionen mit im Median < 10 pg/ml gering (**s. Abbildung 18 und Abbildung 19**). CXCL8 war in hohen Konzentrationen im Zellkulturüberstand von uTEC messbar, wobei die Mehrheit der Proben über den höchsten Assay-Standardwert lagen. Daher konnte nicht auf eine mögliche Induzierbarkeit von CXCL8 durch die getesteten Stimulationen geschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse

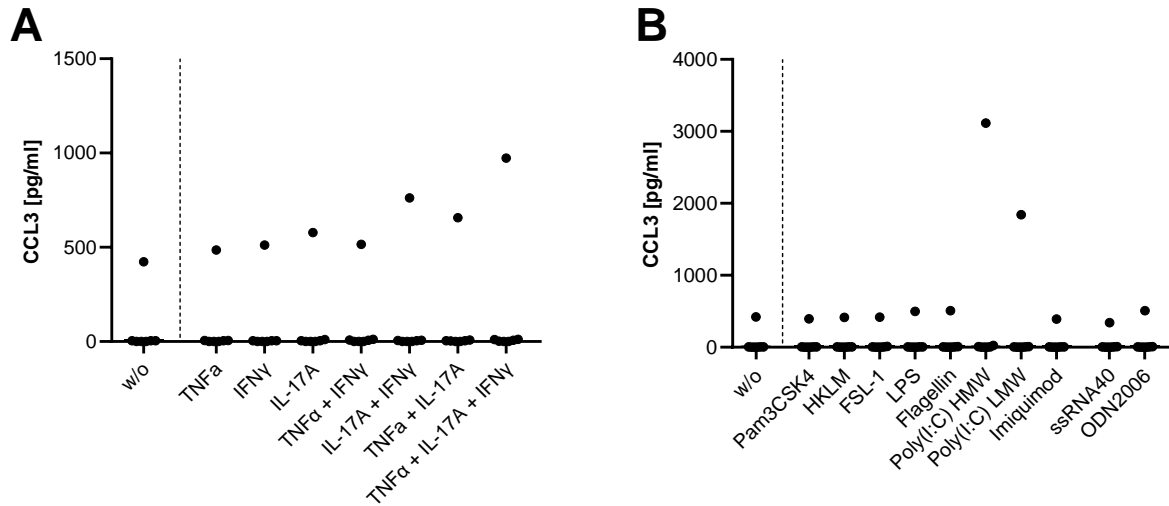


Abbildung 18: Konzentration von CCL3 im Zellkulturüberstand von uTEC nach Stimulation mit (A) Zytokinen und (B) TLR-Agonisten im Vergleich zur nichtstimulierten Kontrolle (w/o), lineare Darstellung der Einzelwerte mit Boxplots für n=7

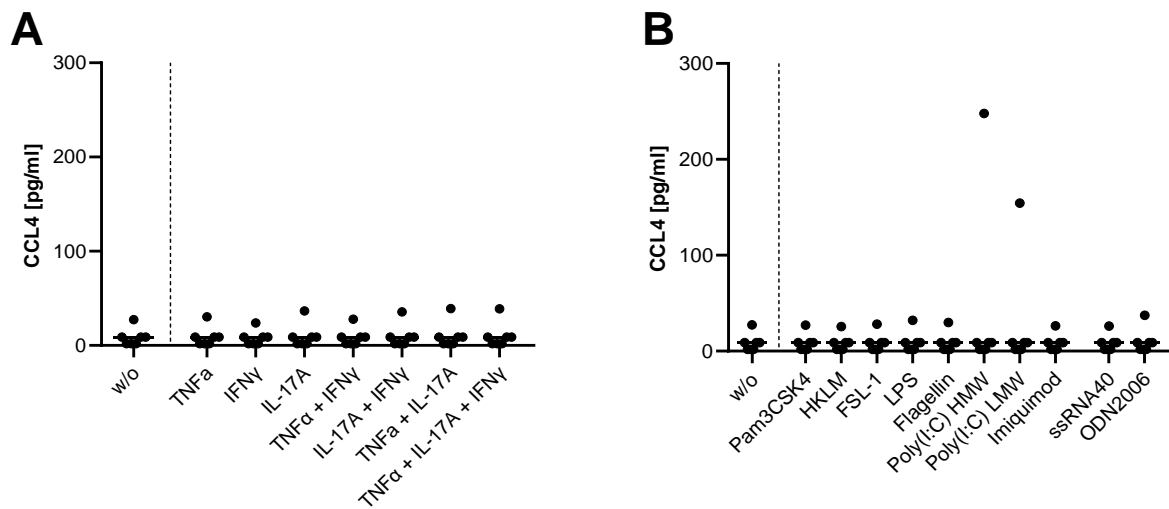


Abbildung 19: Konzentration von CCL4 im Zellkulturüberstand von uTEC nach Stimulation mit (A) Zytokinen und (B) TLR-Agonisten im Vergleich zur nichtstimulierten Kontrolle (w/o), lineare Darstellung der Einzelwerte mit Boxplots für n=7

6 Diskussion

6.1 *In-vivo*-Studie: Plasma-Chemokine in DGF- und nonDGF-Patienten

Die DGF ist eine nach Nierentransplantation häufig auftretende Komplikation und ist mit einem verkürzten Langzeitüberleben des Transplantats sowie einem erhöhten Risiko einer akuten Abstoßungsreaktion assoziiert (35, 54). Trotz verbesserten immunsuppressiven Therapiemöglichkeiten in den letzten Jahrzehnten, hat die Inzidenz der DGF bei postmortalen Nierentransplantation zugenommen (45, 53) und ist bisher nicht kausal behandelbar (55). Die frühzeitige Diagnosestellung einer DGF ist für die individualisierte Patientenversorgung (z.B. Vermeidung nephrotoxischer Substanzen, Anpassung der immunsuppressiven Therapie, rechtzeitige Dialysetherapie, Optimierung des Volumenstatus) und damit für die Verbesserung der Prognose wichtig.

Die Inzidenz der DGF bei nierentransplantierten Patienten mit postmortalen Organspende variiert in verschiedenen Veröffentlichungen weltweit und wird mit Werten zwischen 19% und 70,8% berichtet (35, 37, 42–51). In der hier durchgeführten Single-Center-Studie wiesen 22 von 42 Patienten (\cong 52%) eine DGF nach Nierentransplantation auf, wobei die in der Literatur am häufigsten verwendete Definition der DGF (Notwendigkeit der Dialyse innerhalb der ersten postoperativen Woche) angewandt wurde (42). Die Verwendung verschiedener DGF-Definitionen in Studien erschwert den Vergleich von Endpunkten und kann zu Unterschieden der Häufigkeitsangaben führen (41, 42). In einem Vergleich verschiedener DGF-Definitionen variierte die Inzidenz der DGF je nach angewandter Definition stark im gleichen Patientenkollektiv: die Spannweite der DGF-Inzidenz lag zwischen 24,3% und 70% für Nierentransplantationen mit Organspende nach Hirntod und zwischen 41,2 und 90,5% für Nierentransplantationen mit Organspende nach Herztod (41). Es gibt weitere Faktoren, die durch die fehlende Standardisierung der DGF-Definition bedacht werden müssen. Die Definition „Notwendigkeit der Dialyse“ ist nicht standardisiert und die Entscheidung über den Beginn einer Dialysetherapie ist subjektiv (42). So würden auch Patienten, welche aufgrund anderer Gründe postoperativ dialysepflichtig werden, wie z.B. aufgrund einer Hyperkaliämie, eingeschlossen (34). Weiterhin können klinikinterne Kriterien Einfluss auf die Entscheidung über den Beginn einer Dialysetherapie in der postoperativen Phase nehmen und somit den Vergleich von Endpunkten verschiedener Studien erschweren (50).

In Übereinstimmung mit der Literatur (91, 92), waren in dem Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit Patienten mit DGF im Vergleich zu Patienten ohne DGF signifikant länger hospitalisiert nach Nierentransplantation und wiesen mittel- sowie langfristig (1 Monat bzw. 1 Jahr nach Transplantation) eine signifikant geringere Nierenfunktion (eGFR) auf. Es war kein Zusammenhang der DGF mit den in der Literatur beschriebenen Risikofaktoren festzustellen

(empfängerbezogen: Alter, Geschlecht, BMI, Dialysezeit vor Nierentransplantation, vorhergehende Transplantationen; empfänger-/spenderbezogen: Kalte Ischämiezeit, HLA-Mismatches; spenderbezogen: Alter, Geschlecht, BMI, hypotensive Phasen, Anzahl der Tage auf Intensivstation).

Chemokine sind an der Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten beteiligt und spielen eine bedeutende Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung von renaler Inflammation. Sie sind in die Pathophysiologie des renalen Ischämie-Reperfusionsschadens involviert, welcher im Zuge der Nierentransplantation ausgelöst wird (86). Aber auch die renale Grunderkrankung (87) und Dialysetherapie (88, 89) können eine bereits vor Transplantation bestehende Entzündung beim Nierentransplantatempfänger bedingen. Renale Inflammation im Kontext der Nierentransplantation kann sich klinisch als DGF manifestieren (34, 57).

Basierend auf diesem Paradigma wurde im ersten Teil dieser Arbeit untersucht, ob Chemokine im Plasma von Nierentransplantatempfängern vor und nach Nierentransplantation Marker für das Auftreten einer DGF sein könnten. Aktuell sind keine Daten in der Literatur beschrieben, die den Zusammenhang der DGF und im Plasma quantifizierter Chemokine bei nierentransplantierten Patienten evaluieren. Eine direkte Einordnung der Ergebnisse mit Berichten in der Literatur ist daher derzeit nicht möglich. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Plasma-Konzentration der Chemokine CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL17 und CCL20 zwischen den Patientengruppen DGF und nonDGF, vor und nach Nierentransplantation. Ferner war zwischen DGF- und nonDGF-Patienten kein signifikanter Unterschied in der Kinetik der Plasma-Chemokinspiegel zwischen Tag 0 und Tag 3 festzustellen. Zusammenfassend war kein Zusammenhang für die untersuchten Chemokine mit der DGF in dieser Studienkohorte zu erfassen. Ein möglicher Einsatz der Chemokine als Marker der DGF ist damit in dieser Kohorte nicht gegeben.

Hingegen gibt es Untersuchungen, welche zirkulierende Chemokine im Kontext anderer Nierentransplantations-assoziiierter Komplikationen evaluiert haben. Es wurde in einer Studie berichtet, dass die Serumkonzentrationen von CXCL9, CXCL10 und CXCL11 bei nierentransplantierten Patienten (n=32) während einer T-Zell-vermittelten akuten Abstoßungsepisode, im Vergleich zu Patienten mit stabiler Transplantatfunktion (n= 38) signifikant erhöht war (93). Überdies wurde von einer hochregulierten Expression von CXCL11 und CXCL13 in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) während einer akuten renalen Transplantatabstoßung berichtet (94). Daher wurde in Studien auch die Möglichkeit untersucht, freie Chemokine für die Vorhersage einer bevorstehenden Abstoßungsreaktion zu verwenden. Allerdings ist die Zahl der Studien, die belegen, dass das Vorhandensein spezifischer Chemokine

ein Hinweis auf eine bevorstehende renale Transplantatabstoßung ist, gering (87, 93, 95). Rotondi et al. hielten fest, dass die Messung der CXCL10-Serumkonzentration vor Transplantation, Patienten mit erhöhtem Risiko für Abstoßungsreaktionen und Transplantatversagen identifizieren könnte. Nierentransplantatempfänger mit normaler Transplantatfunktion wiesen signifikant niedrigere CXCL10-Serumkonzentrationen vor Transplantation auf als Patienten, bei denen es zum Transplantatversagen kam. Weiterhin zeigten Patienten mit den höchsten CXCL10-Konzentrationen eine erhöhte Häufigkeit und Schwere von Abstoßungsepisoden (87). In einer weiteren Publikation werden die selben CXCL10-Daten erneut ausgewertet und die Autoren schlussfolgern, dass die Serumkonzentration von CXCL10 vor Transplantation ein erhöhtes Risiko für eine frühe, schwere akute Abstoßung und nachfolgende chronische Transplantatnephropathie anzeigen könnte (95). Limitationen beider Studien (87, 95) sind, trotz relativ großer Stichprobengröße (n=316), die unterschiedliche Zeitspanne zwischen Zeitpunkt der Blutentnahme und Transplantationstermin (innerhalb 1 Monat vor Transplantation), das retrospektive Design mit langer Probensammelungsphase (1991-2001) sowie der Ausschluss von 60 Patienten von der Analyse aufgrund fehlender Proben.

Die lokale Wirkung von Chemokinen bei der Rekrutierung von Immunzellen im Nierentransplantat ist dahingegen gut untersucht und belegt. Dikow et al. (96) zeigten anhand von Transplantatbiopsien von 30 Patienten mit DGF, dass die Expression von CCL5 in glomerulären Zellen und CCR1-positiven eingewanderten Zellen mit der Transplantatfunktion 12 Monate nach Transplantation korrelierte. In Nierentransplantaten mit DGF schien die CCL5-Expression mit konsekutiver Einwanderung CCR1-positiver Zellen eine fortschreitende interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie zu fördern und die Transplantatfunktion zu verschlechtern. Es gibt Hinweise darauf, dass interstitiell infiltrierende Leukozyten, die von Chemokinen angezogen werden, Schlüsselvermittler der Pathogenese der tubulären Nekrose und interstitiellen Fibrose sind. Fiorina et al. (97) beobachteten die Induktion der Expression von CXCL10 und CXCR3 nach renalem Ischämie-/Reperfusionsschaden und berichteten, dass CXCR3-defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifikant niedrigere Serum-Kreatinin-Spiegel, eine bessere Überlebensrate und signifikant weniger akute tubuläre Nekrose und zelluläre Infiltrate aufwiesen. Dieser protektive Effekt des CXCR3-Defizienz war auf eine verminderte Rekrutierung von Th1-Zellen in der ischämischen Niere zurückzuführen. Die CCL2/CCR2-Achse ist auch für die akute tubuläre Nekrose in der ischämischen Niere wichtig, indem sie die Infiltration und Aktivierung von Makrophagen reguliert. In einer Studie wurde gezeigt, dass die Expression von CCL2 bei CCR2-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nach Ischämie-Reperfusionsschaden deutlich reduziert war (98). Weiterhin haben mehrere Studien die Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren in Transplantatbiopsien während akuter Abstoßungsepisoden nach Nierentransplantation untersucht (99–102). Segerer et al. beobachteten eine erhöhte Expression

der Chemokine CXCL10, CCL3, CCL4 und CXCL1, sowie der Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR5 während akuter Transplantatabstoßung. Die Induktion von Chemokinen ging mit der Infiltration von Leukozyten einher, die die entsprechenden Chemokinrezeptoren trugen (99). Eine weitere Studie zeigte, dass CCL2, CCL3, CCL4 und CCL5 von tubulären Epithelzellen während einer akuten Abstoßungsreaktion exprimiert wurden (100). Ferner wurde eine positive Korrelation zwischen den Chemokinen CCL2, CCL3, CCL4 und CCL5 und den Chemokinrezeptoren CCR1, CCR5 und CCR2 und infiltrierenden Leukozyten während der akuten Abstoßung festgestellt (101). Weiterhin zeigte sich, dass das Expressionsniveau von CXCL10 und CXCL11 in Biopsien von Patienten mit Nierentransplantatabstoßung im Vergleich zu Prätransplantations-Biopsien sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene erhöht war (102).

Insgesamt zeigt die Studienlage eine Assoziation der Transplantatabstoßung mit der Expression von Chemokinen, Chemokinrezeptoren und infiltrierenden Zellen im Transplantat, was den lokalen Einfluss der Chemokine in der Mikroumgebung der Niere unterstreicht. Dagegen ist die Studienlage, die belegt, dass freie zirkulierende Chemokine prädiktiv für das Auftreten Nierentransplantations-assoziiierter Komplikationen sein könnten, gering.

Die Hypothese der hier vorliegenden Arbeit, dass freie Chemokine mit dem Auftreten einer DGF assoziiert sind, konnte nicht bestätigt werden. Dennoch fällt auf, dass unabhängig vom prädiktiven Nutzen der Chemokine, CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL17 und CCL20 zu beiden Zeitpunkten im Plasma von Nierentransplantatempfängern detektierbar waren. Da freie Chemokine schon vor der Transplantation quantifizierbar waren, könnten diese eventuell als Zeichen der Inflammation durch die renale Grunderkrankung oder Dialysetherapie interpretiert werden. Es wurde in einer Studie dokumentiert, dass Patienten mit chronischem Nierenversagen erhöhte freie Chemokinliganden im Blut im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden aufwiesen (103). Die Wechselwirkung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) mit Dialysegeräten kann ihre Aktivierung mit der Folge einer erhöhten Synthese und Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren bedingen (89). Oxidativer Stress sowie systemische Mikroinflammation können durch Hämodialyse-Therapie auftreten (88). In der Auswertung der vorliegenden Arbeit der zeitlichen Zusammenhänge stellte sich heraus, dass unabhängig des Auftretens einer DGF, eine signifikante Verringerung der Plasmaspiegel von CCL5 und CCL11 drei Tage nach Transplantation im Vergleich zu vor der Transplantation stattfand. Dies könnte eventuell im Rahmen der immunsuppressiven Therapie erklärt werden.

Dennoch bleibt die Frage nach der *in-vivo* Funktion frei messbarer Chemokine bisher unbeantwortet. Im Allgemeinen wird die Migration von Neutrophilen durch CXCL1-8 reguliert und die Migration aktivierter T-Zellen durch CXCL9-11. Die meisten inflammatorischen CC-

Chemokine induzieren eine Chemotaxis von Monozyten, Makrophagen und T-Zellen (67). Während die lokale Wirkung der Chemokine durch Koordination der Migration von Immunzellen in die Niere sicher scheint (96, 97, 99, 101), ist nicht klar, ob freie Chemokine im Plasma eine spezifische Zell-Migration in die Niere fördern können. Es ist nicht evident, inwiefern die unterschiedlichen Konzentrationen der einzelnen Chemokine im Plasma eine Funktion haben. Neben der Rekrutierungsfunktion von Chemokinen im Gewebe könnten freie Chemokine den Gradienten stören, der erforderlich ist, damit Lymphozyten in bestimmte Gewebe eindringen können (68). Tatsächlich können freie Chemokine als Antagonisten für die Leukozytenmigration wirken (104) oder eine Chemorepulsion (Bewegung weg von einem Chemokin) induzieren (105, 106).

Eine weitere offene Frage im Zusammenhang mit Plasma-Chemokinen betrifft den Ort der Chemokinproduktion und -freisetzung. Hier sind verschiedene Überlegungen anzustellen. Zum einen könnten die Plasma-Chemokine durch zirkulierende Immunzellen freigesetzt werden. Alternativ könnte die hohe lokale Produktion im Gewebe einen lokalen Chemokin-, 'Überschuss' mit konsekutiver Sättigung des Entzündungsortes bedingen und zur Ausschwemmung ins Blut führen. Sowohl Zellen des Immunsystems, als auch lokale Nierenzellen sind in der Lage Chemokine zu sezernieren (67, 68). Andererseits könnten die Blutkonzentrationen den Zustand des Gewebes nicht genau wiedergeben; dabei sind Faktoren zu bedenken, die die Löslichkeit von Chemokinen beeinflussen können. Um Signale zu entfernten Zielzellen zu transportieren, müssen Chemokine von ihrer Quelle weg diffundieren und somit löslich bleiben. In-vivo-Chemokine interagieren jedoch mit Glykosaminoglykanen (GAGs), was ihre systemische Verbreitung einschränken könnte. GAGs sind z.B. auf der Oberfläche von Endothelzellen zu finden (68). Weiterhin ist denkbar, dass bei verminderter Nierenfunktion eine verminderte Clearance dieser Moleküle stattfindet, was die Ergebnisse beeinflussen könnte. Darüber hinaus sind Köder- bzw. Fangrezeptoren (Decoy/Scavenger Receptors) in der Literatur beschrieben. Der Duffy-Antigen-Rezeptor (DARC) wird nicht nur auf Erythrozyten exprimiert, sondern auch auf Endothel, wo er Chemokine binden und neutralisieren kann. Im Kontext der Nierentransplantation wurde berichtet, dass Patienten mit Duffy-negativer Blutgruppe in Gegenwart von DGF ein geringeres Transplantat-Überleben zeigten. Daher könnte DARC die entzündlichen Auswirkungen der DGF abschwächen, indem es als 'Chemokinsenke' wirkt (107).

6.2 *In-vitro*-Studie: Sekretion von Chemokinen durch primäre uTEC

TEC nehmen eine aktive Rolle während renaler Inflammation ein, indem sie Chemokine sezernieren und sich somit an der Rekrutierung von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems beteiligen (108–110). Daher ist es wichtig einen Einblick in die Produktion und Regulation von Chemokinen auf Zellebene zu gewinnen und herauszufinden, welche Signale für die Verbindung zwischen spezifischen Immunreaktionen und unspezifischen Entzündungsreaktionen verantwortlich sind. Erkenntnisse aus *in-vitro*-Studien sind notwendig, um die relative Bedeutung einzelner Chemokine zu bestätigen oder zu widerlegen. *In-vitro* Experimente werden in der Regel mit humanen Zellreihen aus Biopsien durchgeführt und bringen durch die Invasivität der Methode Risiken für den Probanden mit sich und sind dadurch limitiert verfügbar. Im Gegensatz dazu stellt das Urinsediment eine einfache, nichtinvasive und ethisch weniger bedenkliche Methode dar, TEC für die Kultur zu gewinnen (72–84). Hinsichtlich der Charakterisierung wurde der renale epitheliale Phänotyp der der uringewonnenen Zellen dokumentiert (75, 77, 78, 80–83, 85). Ferner hat sich gezeigt, dass uTEC hauptsächlich aus distalen und proximalen TEC bestehen (82, 83) und ähnliche genetische und funktionelle Eigenschaften aufweisen, wie Zellen, die aus Nierengewebe für die Kultur gewonnen werden (84). Sie stellen *in-vitro* voll funktionsfähige Zellen dar (80, 81). Gleichwohl uringewonnene Zellen bereits gut charakterisiert sind, liegen bisher keine Daten bezüglich einer sekretorischen Funktion dieser Zellen vor. Die Fähigkeit von TEC Chemokine zu sezernieren stellt eine wesentliche Funktion ihrer Immunantwort im Rahmen renaler Pathologien dar (86).

Im Rahmen eines explorativen Settings konnte diese Arbeit erstmals den sekretorischen Phänotyp von uTEC charakterisieren. Unter Einfluss von Zytokinen und mikrobiellen Substanzen konnte eine Produktion von Chemokinen durch uTEC beobachtet werden.

6.2.1 Zytokin-vermittelte Sekretion von Chemokinen durch uTEC

In dieser Arbeit wurde der Effekt von Zytokinen auf die Produktion von Chemokinen durch uTEC untersucht. Inflammatorische Zytokine werden *in-vivo* z.B. im Rahmen der Nierentransplantation durch das chirurgische Gewebstrauma, den Ischämie-Reperfusionsschaden und oxidativen Stress induziert (111).

Zusammenfassend konnte eine IFN γ -vermittelte Sekretion von CXCL10 und CXCL11, eine TNF α -vermittelte Sekretion von CXCL1 sowie eine IL-17A-vermittelte Sekretion von CXCL1, CXCL5 und CCL2 beobachtet werden. Die Produktion von CXCL1, CXCL5, CXCL10, CXCL11 und CCL2 war auch durch kombinierte Zytokin-Stimulation erhöht. Die Sekretion von CXCL9, CCL5, CCL11, CCL17 und CCL20 war nur durch kombinierte Zytokin-Stimulation gesteigert. Ferner zeigte sich keine erhöhte Sekretion von CCL3 und CCL4 durch uTEC nach Zytokin-Stimulation.

In einer Studie von Thorburn et al. wurde anhand einer renalen Tumorzelllinie (*Human renal adenocarcinoma epithelial cell line*) gezeigt, dass die Stimulation mit TNF- α zu einer erhöhten Expression von CXCL1 führte (112). In den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigte sich ebenfalls eine TNF α -vermittelte Sekretion von CXCL1 durch uTEC. Weiterhin konnte eine erhöhte Sekretion von CCL5 und CCL2 durch uTEC nach kombinierter Zytokin-Stimulation beobachtet werden. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen wurde in der Literatur davon berichtet, dass die Stimulation von primären TEC aus humanem Nierengewebe mit IFN- γ oder TNF- α alleine keine erhöhte CCL5-Produktion induzierte, jedoch führte die kombinierte Stimulation mit IFN- γ und TNF- α zu einer erhöhten Produktion von CCL5 (113). Eine weitere Studie berichtet von synergistischer Induktion der CCL5- und CCL2-Produktion durch IFN- γ und TNF- α in primären TEC (108).

Ferner wurde in uTEC eine IFN γ -vermittelte Sekretion von CXCL10 und CXCL11 ausgelöst. Auch diese Beobachtung ist mit der Studienlage zu vereinen. Anhand einer Tumorzelllinie (*renal adenocarcinoma epithelial cell line*) wurde gezeigt, dass die Stimulation mit IFN- γ , zu einer erhöhten Produktion von CXCL10 und CXCL11 führte (112). In einer weiteren Veröffentlichung wurde festgestellt, dass IFN- γ zu einer hochregulierten Expression von CXCL9, CXCL10 und CXCL11 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in HK-2-Zellen (immortalisierte humane proximale Tubulusepithel-Zelllinie) führte (114). Darüber hinaus wurde in einer Studie mit primären TEC, eine erhöhte Konzentration von CXCL10 und CXCL11 im Zellkulturüberstand nach Stimulation mit IFN- γ dokumentiert (102). Eine weitere Studie dokumentiert in primären TEC die synergistische Induktion von CXCL10 durch IFN- γ und TNF- α . IFN- γ allein stimulierte die CXCL10-Produktion, dagegen zeigten sich unter Stimulation mit TNF- α nur geringe Mengen an CXCL10 (108). In einer Studie mit murinen TEC zeigte sich eine hochregulierte CXCL10-Transkription nach Stimulation mit IFN- γ , was durch die Anwesenheit von TNF- α verstärkt wurde. Hingegen führte die alleinige Stimulation mit TNF- α nicht zu einer erhöhten Transkription (115). In einer weiteren Publikation führte die kombinierte Stimulation von humanen primären TEC mit IFN- γ und TNF- α zu einer Induktion von CXCL9, CXCL10 und CCL5. IFN- γ allein konnte die Produktion von CCL2 nicht hochregulieren, während die kombinierte Stimulation mit IFN- γ /TNF- α die Produktion von CCL2 hochregulierte. TECs waren nicht in der Lage, das Th17-assoziierte Chemokin CCL20 zu produzieren, weder unstimuliert noch nach Stimulation mit IFN- γ und TNF- α (107).

Darüber hinaus wurde die Wechselwirkung von uTEC mit IL-17A untersucht. Dabei handelt es sich um ein proinflammatorisches Zytokin, das spezifisch von aktivierten T-Zellen produziert wird. Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit zeigten zwei Publikationen, dass die *in-vitro*-Stimulation von primären humanen TEC aus Nierengewebe/Biopsien mit IL-17 zur Sekretion höherer Mengen CCL2 führte, aber keine Induktion von CCL5 zu beobachten war (116, 117). Die

Chemokinproduktion durch TEC als Reaktion auf IL-17A unterstreicht die wichtige Rolle, die diese T-Zell-Produkte für die weitere Anziehung von Entzündungszellen und damit für die Verstärkung der anfänglichen antigenspezifischen Reaktion spielen.

Weiterhin zeigten die Ergebnisse, dass im Zellkulturüberstand von uTEC auch ohne Hinzugabe von Stimulantien basale Chemokinlevel detektierbar waren (insbesondere CXCL1, CXCL5 und CCL2). Dies könnte zum einen Medium-bedingt (FCS Zusatz) sein. Zum anderen wurde in der Literatur beschrieben, dass unstimulierte renale epitheliale Zellen (serumfreies Medium) spontan basale mRNA-Spiegel für CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL8 sezernierten (112). Dies lässt vermuten, dass Nierenepithelzellen in der Lage sind, auch ohne inflammatorischen Reiz konstitutiv Chemokine zu sezernieren. Ferner war CXCL8 in sehr hohen Konzentrationen im Zellkulturüberstand von uTEC detektierbar. Dabei lag die Konzentration bei der Mehrheit der Proben über den höchsten Assay-Standardwert, sodass in dieser Arbeit nicht auf eine mögliche Induzierbarkeit von CXCL8 durch die getesteten Stimulationen geschlossen werden konnte. Es wurde in Publikationen dokumentiert, dass renale epitheliale Zellen CXCL8 sezernieren können (112, 118).

6.2.2 TLR-Liganden-vermittelte Sekretion von Chemokinen durch uTEC

In den Ergebnissen dieser Arbeit zeigte sich eine starke Induktion von CXCL10, CXCL11 und CCL5 nach dsRNA-Stimulation. Doppelsträngige RNA (dsRNA) ist ein molekulares Muster, das mit einer viralen Infektion assoziiert ist. Poly (I:C) (synthetisches Analogon von dsRNA) wird vom endosomalen Toll-like-Rezeptor 3 (TLR3) erkannt (119). Es gibt derzeit keine Studien, welche die Chemokinproduktion durch humane TEC als Antwort auf die Stimulation mit dsRNA untersuchten. Es wurde aber gezeigt, dass primäre TECs die dsRNA-Rezeptoren TLR3, MDA5 und RIG-I exprimieren. Ferner zeigte sich die Expression der drei Rezeptoren durch Stimulation mit dsRNA erhöht (63). Auch die renale epitheliale Tumorzellreihe A983 exprimiert TLR3 (83). Bemerkenswert ist, dass TLR3, MDA5 und RIG-I nicht nur durch virale dsRNA, sondern auch durch endogene Liganden aktiviert werden können. Zum Beispiel haben Studien gezeigt, dass RNA, die aus nekrotischen Zellen freigesetzt wird, TLR3 aktivieren kann (120, 121). Daher könnte eine Funktion der dsRNA-Rezeptoren in TECs darin bestehen, Gewebeschäden bei akuter tubulärer Nekrose z.B. durch Ischämie zu erkennen. Hingegen ist die Sekretion der Chemokine CCL5, CXCL10 und CXCL11 in anderen Zellen nach dsRNA-Stimulation beschrieben worden. Eine Studie untersuchte TLR3-induzierte Mechanismen des angeborenen Immunsystems, einschließlich dendritischer Zellen, Makrophagen und Endothelzellen. Das Chemokin CXCL10 wurde von allen Zelltypen produziert (122). Darüber hinaus wurde die mRNA-Expression von Chemokinen wie CCL5, CXCL10 und CXCL11 durch Poly-IC-Stimulation in humanen Keratinozyten beobachtet (123). Poly-IC erhöhte die Expression von CXCL10-mRNA und -

Protein in Bronchialepithelzellen. CXCL10 kann durch die Aktivierung der Th-1-Typ-Immunität zu antiviraler Aktivität beitragen (124).

Darüber hinaus zeigte sich in den Ergebnissen dieser Arbeit eine Lipopeptid-vermittelte Sekretion von CXCL1, CXCL5, CXCL9, CCL5, CCL11, CCL17 und CCL20 in uTEC. *In-vitro* wurde die Produktion von CC-Chemokinen durch murine TEC als Reaktion auf bakterielle Stimuli beschrieben, dabei induzierten TLR2-Liganden die Produktion von CCL2 und CCL5 (125). Ferner wurde berichtet, dass die Stimulation von murinen TEC mit TLR2-Agonisten zur erhöhten Produktion der Chemokine CXCL1 und CXCL2 führte (126, 127). Die *in-vivo* Analyse von isolierten humanen proximalen tubulären Zellen zeigte, dass diese Zellen TLR2 exprimieren (128). Die Expression von TLR2 ist in Nierentransplantaten in proximalen und distalen Tubuli beschrieben (129).

In dieser Arbeit zeigte sich keine erhöhte Sekretion von Chemokinen im Zellkulturüberstand von uTEC nach Stimulation mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS, TLR4-Ligand). LPS aus gramnegativen Bakterien ist als potenter Aktivator des angeborenen Immunsystems bekannt und induziert die Produktion von Chemokinen und Zytokinen in Monozyten und Makrophagen (130). Humane TEC sind, unter Berücksichtigung von Informationen aus der Literatur, nicht durch LPS stimulierbar. Dieses Ergebnis könnte dadurch erklärt werden, dass humane TEC CD14 nicht exprimieren (131). Die *in-vivo* Analyse von isolierten humanen proximalen tubulären Zellen zeigte, dass diese Zellen weder TLR4 noch CD14 exprimieren (128). CD14 fungiert als Co-Rezeptor (zusammen mit TLR4 und MD-2) zum Nachweis von LPS (132, 133). Ferner wurde gezeigt, dass humane Nierenepithelzellen (Nierenkarzinomzelllinie A498) nicht mit der Induktion proinflammatorischer Zytokine auf LPS reagieren. Eine Erklärung der Autoren für die ausbleibende LPS-Reaktion war die fehlende Expression von TLR4 und CD14 der A498-Zellen (128, 134). Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass murine TEC, welche eine TLR4-abhängige Reaktion auf LPS zeigten (126, 127, 135), CD14 exprimierten (125). Interessanterweise wurde in diesem Zusammenhang aufgezeigt, dass humane Blasenepithelzellen – im Gegensatz zu Nierenepithelzellen – auf LPS reagieren und TLR4 sowie CD14 exprimieren (128, 134). Im Zusammenhang mit uringewonnenen Zellen in Kultur sind auch Urothelzellen (78, 83) beschrieben worden. Die Tatsache der ausbleibenden LPS-Reaktion von uTEC in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, unterstützt den renalen epithelialen Phänotyp von uTEC. Eine Charakterisierung von uTEC hinsichtlich der CD14- und TLR4-Expression sollte in zukünftigen Versuchen mituntersucht werden.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Stimulation von uTEC mit Flagellin zur erhöhten Konzentration der Chemokine CXCL1 und CXCL5 im Zellkulturüberstand führt. Flagellin ist der Hauptbestandteil der Flagellen (Geißeln), wie sie in vielen gramnegativen und

grampositiven Bakterien vorhanden sind und wird durch TLR5 erkannt (136). TLR5 ist in der Immunabwehr urogenitaler Infektionen involviert (137). Es wurde berichtet, dass humane TEC TLR5 exprimieren (128). Weiterhin zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Stimulation von uTEC mit CpG-Oligonukleotid zu einer erhöhten Konzentration von CXCL1 und CCL20 führte. Synthetische Oligodenukleotide, welche CpG-DNA-Motive enthalten, imitieren die immunstimulierenden Effekte bakterieller DNA. CpG-Motive sind in bakterieller DNA 20-mal häufiger vorhanden als in Säugetier-DNA (138, 139). Derzeit sind keine Studien in der Literatur beschrieben, die die Immunantwort humaner TEC als Antwort auf die Stimulation mit Flagellin oder CpG-Oligonukleotid untersuchen.

6.3 Limitierung

Limitiert wird die *in-vivo*-Studie durch das Single-Center-Design (Charité Universitätsmedizin-Campus Virchow Klinikum). Die moderate Stichprobengröße des untersuchten Patientenkollektivs (n=42) kann die statistische Trennschärfe und Power beeinflussen und erhöht Wahrscheinlichkeit eines Fehlers 2. Art. Daher sind die negativen Ergebnisse der Studie mit Bedacht zu interpretieren und sollten mit größerem Stichprobenumfang validiert werden. Da jedoch Chemokine zu zwei Zeitpunkten beurteilt wurden, kann die statistische Signifikanz im Rahmen der Konsistenz mit anderen Zeitpunkten innerhalb derselben Person interpretiert werden. Darüber hinaus erfolgte die Quantifizierung der Chemokine in Plasmaproben in Doppel-Bestimmung. Eine Limitation in Bezug auf die Endpunkt-Bestimmung stellt die fehlende Standardisierung der DGF-Definition dar. Weitere Störfaktoren umfassen den Sample-Bias und Performance-Bias. Hinsichtlich der Einordnung der negativen Studienergebnisse mit Ergebnissen in der Literatur wäre ein Publikations-Bias zu bedenken.

Die *in-vitro*-Studie wird durch die geringe Stichprobengröße der Zellkulturversuche (n=7) stark limitiert. Aus diesem Grund wurde eine explorative statistische Auswertung gewählt. Ergebnisse sind vor dem Hintergrund eines Fehlers 1. und 2. Art mit großer Vorsicht zu interpretieren. Positive Ergebnisse mit einem p-Wert<0,05 aus dieser Studie müssen in größerem Stichprobenumfang validiert werden. Angesichts des explorativen Charakters der Zellkulturversuche wurden Proben in Einzelbestimmung analysiert. Künftige Validierungsstudien erfordern u.a. Doppel-/Triple-Replikate, die Etablierung standardisierter Positiv-/Negativkontrollen sowie die Untersuchung der Konzentrations-Zeit-Beziehungen. Der Einfluss der einzelnen Stimulantien muss im Rahmen der eingesetzten Konzentrationen betrachtet werden.

6.4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Hypothese dieser Arbeit, dass freie Chemokine mit dem Auftreten einer DGF assoziiert sind, konnte unter Berücksichtigung der in Abschnitt 6.3 genannten Limitationen nicht bestätigt werden. Unabhängig vom prädiktiven Nutzen der Chemokine waren freie Chemokin-Konzentrationen im Plasma von Nierentransplantatempfängern zu detektieren– sowohl vor als auch nach der Transplantation. Offene Fragen hinsichtlich freier messbarer Chemokine im Plasma von Nierentransplantatempfängern betreffen den Ort der Chemokinproduktion und -freisetzung sowie deren *in-vivo* Funktion. Es ist nicht klar, ob freie Chemokine im Plasma eine spezifische Zell-Migration in die Niere fördern können. Mögliche chemoattraktive, chemoinhibitorische und chemorepulsive Wirkungen von Chemokinen unterstreichen die Komplexität der Koordination und Dynamik der Leukozytenmigration. Insofern ist nicht vollständig verstanden, wie freie Chemokine allein und im Zusammenspiel mit anderen Faktoren homöostatische und entzündliche Prozesse bei Nierentransplantatempfängern beeinflussen können. Weitere Forschung ist daher notwendig, um die Komplexität dieser Signalwege besser zu verstehen.

Trotz vieler Arbeiten, die Chemokine im Kontext der Nierentransplantation untersuchen, ist der Beitrag des Nierenepithels zur Chemokin-induzierten Rekrutierung von Immunzellen in das Nierenparenchym noch nicht vollständig verstanden. In Anbetracht der wichtigen Rolle der TEC bei der Verstärkung der lokalen Immunantwort könnte die Beeinflussung der Interaktion zwischen TEC und infiltrierenden Zellen neue Optionen für therapeutische Interventionen bieten. Grundlage für die Erforschung solcher Interaktionen stellen *in-vitro*-Versuche mit Zelllinien dar. Bisher verfügbare Zellmodelle werden aus humanen Gewebeproben/Biopsien oder anderen Spezies gewonnen. Die Isolierung von TEC aus Urin stellt eine nichtinvasive und einfache Methode dar, die weniger ethische Bedenken mit sich führt und unbegrenzt verfügbar ist. Die Daten dieser Arbeit charakterisieren erstmals, unter Berücksichtigung des explorativen Designs und der in Abschnitt 6.3 genannten Limitationen, den sekretorischen Phänotyp von uTEC. Dies unterstreicht die *in-vitro* erhaltene sekretorische Funktionalität der Zellen. Nach Durchführung entsprechender Validierungsstudien könnten mögliche zukünftige Versuche darauf aufbauen, welche die Interaktion von uTEC mit Zellen des Immunsystems erforschen.

7 Literatur

1. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C-y. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 2004; 351(13):1296–305. doi: 10.1056/NEJMoa041031.
2. Brück K, Stel VS, Gambaro G, Hallan S, Völzke H, Ärnlöv J, Kastarinen M, Guessous I, Vinhas J, Stengel B, Brenner H, Chudek J, Romundstad S, Tomson C, Gonzalez AO, Bello AK, Ferrieres J, Palmieri L, Browne G, Capuano V, van Biesen W, Zoccali C, Gansevoort R, Navis G, Rothenbacher D, Ferraro PM, Nitsch D, Wanner C, Jager KJ. CKD Prevalence Varies across the European General Population. *J Am Soc Nephrol* 2016; 27(7):2135–47. doi: 10.1681/ASN.2015050542.
3. Glasscock RJ, Warnock DG, Delanaye P. The global burden of chronic kidney disease: estimates, variability and pitfalls. *Nat Rev Nephrol* 2017; 13(2):104–14. doi: 10.1038/nrneph.2016.163.
4. Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, Hirst JA, O'Callaghan CA, Lasserson DS, Hobbs FDR. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* 2016; 11(7):e0158765. doi: 10.1371/journal.pone.0158765.
5. Bikbov B, Purcell CA, Levey AS, Smith M, Abdoli A, Abebe M, Adebayo OM, Afarideh M, Agarwal SK, Agudelo-Botero M, Ahmadian E, Al-Aly Z, Alipour V, Almasi-Hashiani A, Al-Raddadi RM, Alvis-Guzman N, Amini S, Andrei T, Andrei CL, Andualet Z, Anjomshoa M, Arabloo J, Ashagre AF, Asmelash D, Ataro Z, Atout MM'dW, Ayanore MA, Badawi A, Bakhtiari A, Ballew SH, Balouchi A, Banach M, Barquera S, Basu S, Bayih MT, Bedi N, Bello AK, Bensenor IM, Bijani A, Bloor A, Borzì AM, Cámara LA, Carrero JJ, Carvalho F, Castro F, Catalá-López F, Chang AR, Chin KL, Chung S-C, Cirillo M, Cousin E, Dandona L, Dandona R, Daryani A, Das Gupta R, Demeke FM, Demoz GT, Desta DM, Do HP, Duncan BB, Eftekhari A, Esteghamati A, Fatima SS, Fernandes JC, Fernandes E, Fischer F, Freitas M, Gad MM, Gebremeskel GG, Gebresillassie BM, Geta B, Ghafourifard M, Ghajar A, Ghith N, Gill PS, Ginawi IA, Gupta R, Hafezi-Nejad N, Haj-Mirzaian A, Haj-Mirzaian A, Hariyani N, Hasan M, Hasankhani M, Hasanzadeh A, Hassen HY, Hay SI, Heidari B, Herteliu C, Hoang CL, Hosseini M, Hostiuc M, Irvani SSN, Islam SMS, Jafari Balalami N, James SL, Jassal SK, Jha V, Jonas JB, Joukar F, Jozwiak JJ, Kabir A, Kahsay A, Kasaeian A, Kassa TD, Kassaye HG, Khader YS, Khalilov R, Khan EA, Khan MS, Khang Y-H, Kisa A, Kovessy CP, Kuate Defo B, Kumar GA, Larsson AO, Lim L-L, Lopez AD, Lotufo PA, Majeed A, Malekzadeh R, März W, Masaka A, Meheretu HAA, Miazgowski T, Mirica A, Mirrakhimov EM, Mithra P, Moazen B, Mohammad DK, Mohammadpourhodki R, Mohammed S, Mokdad AH, Morales L, Moreno Velasquez I, Mousavi SM, Mukhopadhyay S, Nachega JB, Nadkarni GN, Nansseu

- JR, Natarajan G, Nazari J, Neal B, Negoj RI, Nguyen CT, Nikbakhsh R, Noubiap JJ, Nowak C, Olagunju AT, Ortiz A, Owolabi MO, Palladino R, Pathak M, Poustchi H, Prakash S, Prasad N, Rafiei A, Raju SB, Ramezanzadeh K, Rawaf S, Rawaf DL, Rawal L, Reiner RC, Rezapour A, Ribeiro DC, Roeber L, Rothenbacher D, Rwegera GM, Saadatagah S, Safari S, Sahle BW, Salem H, Sanabria J, Santos IS, Sarveazad A, Sawhney M, Schaeffner E, Schmidt MI, Schutte AE, Sepanlou SG, Shaikh MA, Sharafi Z, Sharif M, Sharifi A, Silva DAS, Singh JA, Singh NP, Sisay MMM, Soheili A, Sutradhar I, Teklehaimanot BF, Tesfay Be, Teshome GF, Thakur JS, Tonelli M, Tran KB, Tran BX, Tran Ngoc C, Ullah I, Valdez PR, Varughese S, Vos T, Vu LG, Waheed Y, Werdecker A, Wolde HF, Wondmienen AB, Wulf Hanson S, Yamada T, Yeshaw Y, Yonemoto N, Yusefzadeh H, Zaidi Z, Zaki L, Zaman SB, Zamora N, Zarghi A, Zewdie KA, Ärnlöv J, Coresh J, Perico N, Remuzzi G, Murray CJL. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2020; 395(10225):709–33. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30045-3.
6. Xie Y, Bowe B, Mokdad AH, Xian H, Yan Y, Li T, Maddukuri G, Tsai C-Y, Floyd T, Al-Aly Z. Analysis of the Global Burden of Disease study highlights the global, regional, and national trends of chronic kidney disease epidemiology from 1990 to 2016. *Kidney Int* 2018; 94(3):567–81. doi: 10.1016/j.kint.2018.04.011.
 7. Foreman KJ, Marquez N, Dolgert A, Fukutaki K, Fullman N, McGaughey M, Pletcher MA, Smith AE, Tang K, Yuan C-W, Brown JC, Friedman J, He J, Heuton KR, Holmberg M, Patel DJ, Reidy P, Carter A, Cercy K, Chapin A, Douwes-Schultz D, Frank T, Goettsch F, Liu PY, Nandakumar V, Reitsma MB, Reuter V, Sadat N, Sorensen RJD, Srinivasan V, Updike RL, York H, Lopez AD, Lozano R, Lim SS, Mokdad AH, Vollset SE, Murray CJL. Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016–40 for 195 countries and territories. *Lancet* 2018; 392(10159):2052–90. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31694-5.
 8. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. *Innere Organe. 3., überarbeitete und erweiterte Auflage.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012. (PrometheusLernAtlas der Anatomie / Michael Schünke; Erik Schulte; Udo Schumacher. Ill. von Markus Voll; Karl Wesker).
 9. Silbernagl S. Die Funktion der Nieren. In: Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S, Hrsg. *Physiologie. 9., vollständig überarbeitete Auflage:* Georg Thieme Verlag; 2019 Verfügbar unter: https://eref.thieme.de/ebooks/cs_10278468#/ebook_cs_10278468__E84D94C3_6FF2_459F_BB91_1E99C45116CD.

10. Markó L, Gollasch M. 303 Zell- und Molekularbiologie der Niere. In: Suttorp N, Möckel M, Siegmund B, Dietel M, Hrsg. *Harrisons Innere Medizin*. 20. Auflage: ABW Verlag; 2020
Verfügbar unter: https://eref.thieme.de/ebooks/cs_11262871#/ebook_cs_11262871_H20_K_303.
11. KDIGO CKD Work Group. *Kidney Disease: Improving Global Outcomes 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease*. *Kidney inter., Suppl.* 2013, 3: 1–150; 2013. Verfügbar unter: <https://kdigo.org/guidelines/ckd-evaluation-and-management/>.
12. KDIGO. *Kidney Disease Improving Global Outcomes*; 2020 [Stand: 15.07.2020]. Verfügbar unter: <https://kdigo.org/mission/>.
13. McIntosh JF, Möller E, van Slyke DD. STUDIES OF UREA EXCRETION. III: The Influence of Body Size on Urea Output. *J Clin Invest* 1928; 6(3):467–83. doi: 10.1172/JCI100207.
14. Levey AS, Becker C, Inker LA. Glomerular filtration rate and albuminuria for detection and staging of acute and chronic kidney disease in adults: a systematic review. *JAMA* 2015; 313(8):837–46. doi: 10.1001/jama.2015.0602.
15. Levey AS, Inker LA, Coresh J. GFR estimation: from physiology to public health. *Am J Kidney Dis* 2014; 63(5):820–34. doi: 10.1053/j.ajkd.2013.12.006.
16. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999; 130(6):461–70. doi: 10.7326/0003-4819-130-6-199903160-00002.
17. Levey AS, Coresh J, Greene T, Stevens LA, Zhang YL, Hendriksen S, Kusek JW, van Lente F. Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2006; 145(4):247–54. doi: 10.7326/0003-4819-145-4-200608150-00004.
18. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, Feldman HI, Kusek JW, Eggers P, van Lente F, Greene T, Coresh J. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009; 150(9):604–12. doi: 10.7326/0003-4819-150-9-200905050-00006.
19. Tangri N, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Beck GJ, Greene T, Coresh J, Levey AS. Changes in dietary protein intake has no effect on serum cystatin C levels independent of the glomerular filtration rate. *Kidney Int* 2011; 79(4):471–7. doi: 10.1038/ki.2010.431.
20. Inker LA, Schmid CH, Tighiouart H, Eckfeldt JH, Feldman HI, Greene T, Kusek JW, Manzi J, van Lente F, Zhang YL, Coresh J, Levey AS. Estimating glomerular filtration rate from serum creatinine and cystatin C. *N Engl J Med* 2012; 367(1):20–9. doi: 10.1056/NEJMoa1114248.

21. Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen, Hrsg. Jahresbericht 2018 zur Qualität in der Dialyse: Erstellt im Auftrag des Gemeinsamen Bundesausschusses; 10.7.2019 [Stand: 17.07.2020]. Verfügbar unter: https://www.g-ba.de/downloads/39-261-3977/2019-09-19_QSD-RL_IQTIG-Jahresbericht-2018-Datenanalysten.pdf.
22. Tonelli M, Wiebe N, Knoll G, Bello A, Browne S, Jadhav D, Klarenbach S, Gill J. Systematic review: kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes. *Am J Transplant* 2011; 11(10):2093–109. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03686.x.
23. Axelrod DA, Schnitzler MA, Xiao H, Irish W, Tuttle-Newhall E, Chang S-H, Kasiske BL, Alhamad T, Lentine KL. An economic assessment of contemporary kidney transplant practice. *Am J Transplant* 2018; 18(5):1168–76. doi: 10.1111/ajt.14702.
24. Tamura Y, Urawa A, Watanabe S, Hasegawa T, Ogura T, Nishikawa K, Sugimura Y, Komori T, Okada M. Mood Status and Quality of Life in Kidney Recipients After Transplantation. *Transplant Proc* 2018; 50(8):2521–5. doi: 10.1016/j.transproceed.2018.03.077.
25. Deutsche Stiftung Organtransplantation, Hrsg. DSO-Jahresbericht 2019; 2020 [Stand: 22.06.2020]. Verfügbar unter: <https://www.dso.de/organspende/statistiken-berichte/jahresbericht>.
26. Herold G. Innere Medizin 2020: Kapitel VI. Nephrologie Seiten 599-659; 2020.
27. Transplantationsgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 4. September 2007 (BGBl. I S. 2206), das zuletzt durch Artikel 16 des Gesetzes vom 19. Mai 2020 (BGBl. I S. 1018) geändert worden ist [Stand: 17.07.2020]. Verfügbar unter: <https://www.gesetze-im-internet.de/tpg/TPG.pdf>.
28. Organentnahme nach Herzstillstand ("Non heart-beating donor"); 1997 [Stand: 19.07.2020]. Verfügbar unter: https://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/downloads/Herzstillstand.pdf.
29. Richtlinie: gemäß § 16 Abs. 1 S. 1 Nr. 1 TPG für die Regeln zur Feststellung des Todes nach § 3 Abs. 1 S. 1 Nr. 2 TPG und die Verfahrensregeln zur Feststellung des endgültigen, nicht behebbaren Ausfalls der Gesamtfunktion des Großhirns, des Kleinhirns und des Hirnstamms nach § 3 Abs. 2 Nr. 2 TPG, Vierte Fortschreibung; 2015 [Stand: 20.07.2020]. Verfügbar unter: https://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/downloads/irrev.Hirnfunktionsausfall.pdf.
30. Richtlinien für die Wartelistenführung und die Organvermittlung zur Nierentransplantation; 2013 [Stand: 07.02.2021]. Verfügbar unter: https://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/downloads/Niere_0912013.pdf.

31. Richtlinie gemäß § 16 Abs. 1 S 1 Nr. 4 a) und b) TPG zur medizinischen Beurteilung von Organspendern und zur Konservierung von Spenderorganen; 2015 [Stand: 07.02.2021]. Verfügbar unter: https://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/downloads/pdf-Ordner/RL/RiliOrgaEmpfaengerschutzMedBeurt20150424.pdf.
32. Richtlinie zur Organtransplantation gemäß § 16 Transplantationsgesetz „Anforderungen an die im Zusammenhang mit einer Organentnahme und –übertragung erforderlichen Maßnahmen zur Qualitätssicherung“; 2001 [Stand: 07.02.2021]. Verfügbar unter: https://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/downloads/AnfOrga.pdf.
33. Eurotransplant Manual Version 3.3: Chapter 3 Allocation General; 16.10.2019 [Stand: 20.07.2020]. Verfügbar unter: <http://www.eurotransplant.org/wp-content/uploads/2020/01/H3-Allocation.pdf>.
34. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 2004; 364(9447):1814–27. doi: 10.1016/S0140-6736(04)17406-0.
35. Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schmouder RL. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation* 1997; 63(7):968–74. doi: 10.1097/00007890-199704150-00011.
36. Fonseca I, Teixeira L, Malheiro J, La Martins S, Dias L, Castro Henriques A, Mendonça D. The effect of delayed graft function on graft and patient survival in kidney transplantation: an approach using competing events analysis. *Transpl Int* 2015; 28(6):738–50. doi: 10.1111/tri.12543.
37. Helfer MS, Vicari AR, Spuldaro F, Gonçalves LFS, Manfro RC. Incidence, risk factors, and outcomes of delayed graft function in deceased donor kidney transplantation in a Brazilian center. *Transplant Proc* 2014; 46(6):1727–9. doi: 10.1016/j.transproceed.2014.05.026.
38. Gill J, Dong J, Rose C, Gill JS. The risk of allograft failure and the survival benefit of kidney transplantation are complicated by delayed graft function. *Kidney Int* 2016; 89(6):1331–6. doi: 10.1016/j.kint.2016.01.028.
39. Zens TJ, Danobeitia JS, Levenson G, Chlebeck PJ, Zitur LJ, Redfield RR, D'Alessandro AM, Odorico S, Kaufman DB, Fernandez LA. The impact of kidney donor profile index on delayed graft function and transplant outcomes: A single-center analysis. *Clin Transplant* 2018; 32(3):e13190. doi: 10.1111/ctr.13190.
40. Yarlagadda SG, Coca SG, Formica RN, Poggio ED, Parikh CR. Association between delayed graft function and allograft and patient survival: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24(3):1039–47. doi: 10.1093/ndt/gfn667.

41. Mallon DH, Summers DM, Bradley JA, Pettigrew GJ. Defining delayed graft function after renal transplantation: simplest is best. *Transplantation* 2013; 96(10):885–9. doi: 10.1097/TP.0b013e3182a19348.
42. Yarlagadda SG, Coca SG, Garg AX, Doshi M, Poggio E, Marcus RJ, Parikh CR. Marked variation in the definition and diagnosis of delayed graft function: a systematic review. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23(9):2995–3003. doi: 10.1093/ndt/gfn158.
43. Lebranchu Y, Halimi JM, Bock A, Chapman J, Dussol B, Fritsche L, Kliem V, Oppenheimer F, Pohanka E, Salvadori M, Soergel M, Tufveson G. Delayed graft function: risk factors, consequences and parameters affecting outcome—results from MOST, A Multinational Observational Study. *Transplant Proc* 2005; 37(1):345–7. doi: 10.1016/j.transproceed.2004.12.297.
44. Jeldres C, Cardinal H, Duclos A, Shariat SF, Suardi N, Capitanio U, Hébert M-J, Karakiewicz PI. Prediction of delayed graft function after renal transplantation. *Can Urol Assoc J* 2009; 3(5):377–82. doi: 10.5489/cuaj.1147.
45. Siedlecki A, Irish W, Brennan DC. Delayed graft function in the kidney transplant. *Am J Transplant* 2011; 11(11):2279–96. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03754.x.
46. Huaman MA, Vilchez V, Mei X, Davenport D, Gedaly R. Donor positive blood culture is associated with delayed graft function in kidney transplant recipients: a propensity score analysis of the UNOS database. *Clin Transplant* 2016; 30(4):415–20. doi: 10.1111/ctr.12703.
47. Maier HT, Ashraf MI, Denecke C, Weiss S, Augustin F, Messner F, Vallant N, Böcklein M, Margreiter C, Göbel G, Pratschke J, Öfner-Velano D, Aigner F. Prediction of delayed graft function and long-term graft survival by serum and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin during the early postoperative phase after kidney transplantation. *PLoS ONE* 2018; 13(1):e0189932. doi: 10.1371/journal.pone.0189932.
48. Hart A, Smith JM, Skeans MA, Gustafson SK, Wilk AR, Castro S, Foutz J, Wainright JL, Snyder JJ, Kasiske BL, Israni AK. OPTN/SRTR 2018 Annual Data Report: Kidney. *Am J Transplant* 2020; 20 Suppl s1:20–130. doi: 10.1111/ajt.15672.
49. Schachtner T, Stein M, Reinke P. Increased alloreactivity and adverse outcomes in obese kidney transplant recipients are limited to those with diabetes mellitus. *Transpl Immunol* 2017; 40:8–16. doi: 10.1016/j.trim.2016.11.005.
50. Orandi BJ, James NT, Hall EC, van Arendonk KJ, Garonzik-Wang JM, Gupta N, Montgomery RA, Desai NM, Segev DL. Center-level variation in the development of delayed graft function after deceased donor kidney transplantation. *Transplantation* 2015; 99(5):997–1002. doi: 10.1097/TP.0000000000000450.

51. Tapiawala SN, Tinckam KJ, Cardella CJ, Schiff J, Cattran DC, Cole EH, Kim SJ. Delayed graft function and the risk for death with a functioning graft. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21(1):153–61. doi: 10.1681/ASN.2009040412.
52. Alonso A, Fernández-Rivera C, Villaverde P, Oliver J, Cillero S, Lorenzo D, Valdés F. Renal transplantation from non-heart-beating donors: a single-center 10-year experience. *Transplant Proc* 2005; 37(9):3658–60. doi: 10.1016/j.transproceed.2005.09.104.
53. Stevenson RP, Shapter O, Aitken E, Stevenson K, Shiels PG, Kingsmore DB. Has the Expansion in Extended Criteria Deceased Donors Led to a Different Type of Delayed Graft Function and Poorer Outcomes? *Transplant Proc* 2018; 50(10):3160–4. doi: 10.1016/j.transproceed.2018.07.022.
54. Irish WD, Ilesley JN, Schnitzler MA, Feng S, Brennan DC. A risk prediction model for delayed graft function in the current era of deceased donor renal transplantation. *Am J Transplant* 2010; 10(10):2279–86. doi: 10.1111/j.1600-6143.2010.03179.x.
55. Nashan B, Abbud-Filho M, Citterio F. Prediction, prevention, and management of delayed graft function: where are we now? *Clin Transplant* 2016; 30(10):1198–208. doi: 10.1111/ctr.12832.
56. Greene EL, Paller MS. Xanthine oxidase produces O₂⁻ in posthypoxic injury of renal epithelial cells. *Am J Physiol* 1992; 263(2 Pt 2):F251-5. doi: 10.1152/ajprenal.1992.263.2.F251.
57. Menke J, Sollinger D, Schamberger B, Heemann U, Lutz J. The effect of ischemia/reperfusion on the kidney graft. *Curr Opin Organ Transplant* 2014; 19(4):395–400. doi: 10.1097/MOT.0000000000000090.
58. Zheng L, Gao W, Hu C, Yang C, Rong R. Immune Cells in Ischemic Acute Kidney Injury. *Curr Protein Pept Sci* 2019; 20(8):770–6. doi: 10.2174/1389203720666190507102529.
59. Smith SF, Hosgood SA, Nicholson ML. Ischemia-reperfusion injury in renal transplantation: 3 key signaling pathways in tubular epithelial cells. *Kidney Int* 2019; 95(1):50–6. doi: 10.1016/j.kint.2018.10.009.
60. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11(5):373–84. doi: 10.1038/ni.1863.
61. Kelly KJ, Williams WW, Colvin RB, Meehan SM, Springer TA, Gutierrez-Ramos JC, Bonventre JV. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J Clin Invest* 1996; 97(4):1056–63. doi: 10.1172/JCI118498.

62. Wu H, Chadban SJ. Roles of Toll-like receptors in transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2014; 19(1):1–7. doi: 10.1097/MOT.0000000000000038.
63. Heutinck KM, Kassies J, Florquin S, Berge IJM ten, Hamann J, Rowshani AT. SerpinB9 expression in human renal tubular epithelial cells is induced by triggering of the viral dsRNA sensors TLR3, MDA5 and RIG-I. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27(7):2746–54. doi: 10.1093/ndt/gfr690.
64. Leventhal JS, Schröppel B. Toll-like receptors in transplantation: sensing and reacting to injury. *Kidney Int* 2012; 81(9):826–32. doi: 10.1038/ki.2011.498.
65. Jang HR, Rabb H. Immune cells in experimental acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol* 2015; 11(2):88–101. doi: 10.1038/nrneph.2014.180.
66. Hughes CE, Nibbs RJB. A guide to chemokines and their receptors. *FEBS J* 2018; 285(16):2944–71. doi: 10.1111/febs.14466.
67. Chen K, Bao Z, Tang P, Gong W, Yoshimura T, Wang JM. Chemokines in homeostasis and diseases. *Cell Mol Immunol* 2018; 15(4):324–34. doi: 10.1038/cmi.2017.134.
68. Rot A, Andrian UH von. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:891–928. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104543.
69. Balkwill FR. The chemokine system and cancer. *The Journal of pathology* 2012; 226(2):148–57. doi: 10.1002/path.3029.
70. Ingelfinger JR. Nephrogenic adenomas as renal tubular outposts. *N Engl J Med* 2002; 347(9):684–6. doi: 10.1056/NEJMe020084.
71. Prescott LF. The normal urinary excretion rates of renal tubular cells, leucocytes and red blood cells. *Clin Sci* 1966; 31(3):425–35.
72. Linder D. Culture of cells from the urine and bladder washings of adults. *Somatic Cell Genet* 1976; 2(3):281–3. doi: 10.1007/BF01538966.
73. Herz F, Schermer A, Koss LG. Short-term culture of epithelial cells from urine of adults. *Proc Soc Exp Biol Med* 1979; 161(2):153–7. doi: 10.3181/00379727-161-40509.
74. Sutherland GR, Bain AD. Culture of cells from the urine of newborn children. *Nature* 1972; 239(5369):231. doi: 10.1038/239231a0.
75. Felix JS, Littlefield JW. Human newborn urine as a source of epithelial cells. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1980; 16(2):231–7.

76. Felix JS, Sun TT, Littlefield JW. Human epithelial cells cultured from urine: growth properties and keratin staining. *In Vitro* 1980; 16(10):866–74. doi: 10.1007/BF02619424.
77. Racusen LC, Fivush BA, Andersson H, Gahl WA. Culture of renal tubular cells from the urine of patients with nephropathic cystinosis. *J Am Soc Nephrol* 1991; 1(8):1028–33.
78. Dörrenhaus A, Müller JI, Golka K, Jedrusik P, Schulze H, Föllmann W. Cultures of exfoliated epithelial cells from different locations of the human urinary tract and the renal tubular system. *Arch Toxicol* 2000; 74(10):618–26. doi: 10.1007/s002040000173.
79. Detrisac CJ, Mayfield RK, Colwell JA, Garvin AJ, Sens DA. In vitro culture of cells exfoliated in the urine by patients with diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1983; 71(1):170–3. doi: 10.1172/jci110747.
80. Inoue CN, Kondo Y, Ohnuma S, Morimoto T, Nishio T, Iinuma K. Use of cultured tubular cells isolated from human urine for investigation of renal transporter. *Clin Nephrol* 2000; 53(2):90–8.
81. INOUE CN, SUNAGAWA N, MORIMOTO T, OHNUMA S, KATSUSHIMA F, NISHIO T, KONDO Y, IINUMA K. RECONSTRUCTION OF TUBULAR STRUCTURES IN THREE-DIMENSIONAL COLLAGEN GEL CULTURE USING PROXIMAL TUBULAR EPITHELIAL CELLS VOIDED IN HUMAN URINE. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2003; 39(8):364. doi: 10.1290/1543-706X(2003)039<0364:ROTSIT>2.0.CO;2.
82. Thieme CJ, Weist BJD, Mueskes A, Roch T, Stervbo U, Rosiewicz K, Wehler P, Stein M, Nickel P, Kurtz A, Lachmann N, Choi M, Schmueck-Henneresse M, Westhoff TH, Reinke P, Babel N. The TreaT-Assay: A Novel Urine-Derived Donor Kidney Cell-Based Assay for Prediction of Kidney Transplantation Outcome. *Sci Rep* 2019; 9(1):19037. doi: 10.1038/s41598-019-55442-x.
83. Rahmoune H, Thompson PW, Ward JM, Smith CD, Hong G, Brown J. Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 2005; 54(12):3427–34. doi: 10.2337/diabetes.54.12.3427.
84. Jansen J, Schophuizen CMS, Wilmer MJ, Lahham SHM, Mutsaers HAM, Wetzels JFM, Bank RA, van den Heuvel LP, Hoenderop JG, Masereeuw R. A morphological and functional comparison of proximal tubule cell lines established from human urine and kidney tissue. *Exp Cell Res* 2014; 323(1):87–99. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.02.011.
85. Zhou T, Benda C, Dunzinger S, Huang Y, Ho JC, Yang J, Wang Y, Zhang Y, Zhuang Q, Li Y, Bao X, Tse H-F, Grillari J, Grillari-Voglauer R, Pei D, Esteban MA. Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. *Nat Protoc* 2012; 7(12):2080–9. doi: 10.1038/nprot.2012.115.

86. Segerer S, Alpers CE. Chemokines and chemokine receptors in renal pathology. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003; 12(3):243–9. doi: 10.1097/00041552-200305000-00004.
87. Rotondi M, Rosati A, Buonamano A, Lasagni L, Lazzeri E, Pradella F, Fossombroni V, Cirami C, Liotta F, La Villa G, Serio M, Bertoni E, Salvadori M, Romagnani P. High pretransplant serum levels of CXCL10/IP-10 are related to increased risk of renal allograft failure. *Am J Transplant* 2004; 4(9):1466–74. doi: 10.1111/j.1600-6143.2004.00525.x.
88. Zaza G, Pontrelli P, Pertosa G, Granata S, Rossini M, Porreca S, Staal FJT, Gesualdo L, Grandaliano G, Schena FP. Dialysis-related systemic microinflammation is associated with specific genomic patterns. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23(5):1673–81. doi: 10.1093/ndt/gfm804.
89. Akahoshi T, Kobayashi N, Hosaka S, Sekiyama N, Wada C, Kondo H. In-vivo induction of monocyte chemoattractant protein 1 and activator protein 1 in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10(12):2244–9. doi: 10.1093/ndt/10.12.2244.
90. Lehmann JS, Rughwani P, Kolenovic M, Ji S, Sun B. LEGENDplex™: Bead-assisted multiplex cytokine profiling by flow cytometry. *Methods Enzymol* 2019; 629:151–76. doi: 10.1016/bs.mie.2019.06.001.
91. Salazar Meira F, Zemiacki J, Figueiredo AE, Viliano Kroth L, Saute Kochhann D, d'Avila DO, Traesel M, Saitovitch D, Poli-de-Figueiredo CE. Factors Associated With Delayed Graft Function and Their Influence on Outcomes of Kidney Transplantation. *Transplant Proc* 2016; 48(7):2267–71. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041134516302974>.
92. Ditonno P, Impedovo SV, Palazzo S, Bettocchi C, Gesualdo L, Grandaliano G, Selvaggi FP, Battaglia M. Effects of ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: risk factors and early and long-term outcomes in a single center. *Transplant Proc* 2013; 45(7):2641–4. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041134513006222>.
93. Huang H, Xu X, Yao C, Cai M, Qian Y, Wang X, Shi B. Serum levels of CXCR3 ligands predict T cell-mediated acute rejection after kidney transplantation. *Molecular medicine reports* 2014; 9(1):45–50. doi: 10.3892/mmr.2013.1753.
94. Mao Y, Wang M, Zhou Q, Jin J, Wang Y, Peng W, Wu J, Shou Z, Chen J. CXCL10 and CXCL13 Expression were highly up-regulated in peripheral blood mononuclear cells in acute rejection and poor response to anti-rejection therapy. *Journal of clinical immunology* 2011; 31(3):414–8. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21191639/>.
95. Lazzeri E, Rotondi M, Mazzinghi B, Lasagni L, Buonamano A, Rosati A, Pradella F, Fossombroni V, La Villa G, Gacci M, Bertoni E, Serio M, Salvadori M, Romagnani P. High

- CXCL10 expression in rejected kidneys and predictive role of pretransplant serum CXCL10 for acute rejection and chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 2005; 79(9):1215–20. doi: 10.1097/01.tp.0000160759.85080.2e.
96. Dikow R, Becker LE, Schaier M, Waldherr R, Gross M-L, Zeier M. In renal transplants with delayed graft function chemokines and chemokine receptor expression predict long-term allograft function. *Transplantation* 2010; 90(7):771–6. doi: 10.1097/TP.0b013e3181f009ef.
97. Fiorina P, Ansari MJ, Jurewicz M, Barry M, Ricchiuti V, Smith RN, Shea S, Means TK, Auchincloss H, Luster AD, Sayegh MH, Abdi R. Role of CXC chemokine receptor 3 pathway in renal ischemic injury. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(3):716–23. doi: 10.1681/ASN.2005090954.
98. Furuichi K, Wada T, Iwata Y, Kitagawa K, Kobayashi K-I, Hashimoto H, Ishiwata Y, Asano M, Wang H, Matsushima K, Takeya M, Kuziel WA, Mukaida N, Yokoyama H. CCR2 signaling contributes to ischemia-reperfusion injury in kidney. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(10):2503–15. doi: 10.1097/01.asn.0000089563.63641.a8.
99. Segerer S, Cui Y, Eitner F, Goodpaster T, Hudkins KL, Mack M, Cartron J-P, Colin Y, Schlondorff D, Alpers CE. Expression of chemokines and chemokine receptors during human renal transplant rejection [*American Journal of Kidney Diseases*, 37(3), 518-531]. *American Journal of Kidney Diseases* 2001; 37(3):518–31. doi: 10.1053/AJKD.2001.22076.
100. Robertson H, Morley AR, Talbot D, Callanan K, Kirby JA. Renal allograft rejection: beta-chemokine involvement in the development of tubulitis. *Transplantation* 2000; 69(4):684–7. doi: 10.1097/00007890-200002270-00039.
101. Ruster M, Sperschneider H, Fünfstück R, Stein G, Gröne HJ. Differential expression of beta-chemokines MCP-1 and RANTES and their receptors CCR1, CCR2, CCR5 in acute rejection and chronic allograft nephropathy of human renal allografts. *Clin Nephrol* 2004; 61(1):30–9. doi: 10.5414/cnp61030.
102. Wang X, Wang D, Wang X, Wang X, Gao Q. Mechanisms underlying the production of chemokine CXCL11 in the reaction of renal tubular epithelial cells with CD4+ and CD8+ T cells. *Transpl Immunol* 2020:101337. doi: 10.1016/j.trim.2020.101337.
103. Elmoselhi H, Mansell H, Soliman M, Shoker A. Circulating chemokine ligand levels before and after successful kidney transplantation. *J Inflamm (Lond)* 2016; 13:32. doi: 10.1186/s12950-016-0141-4.
104. Hechtman DH, Cybulsky MI, Fuchs HJ, Baker JB, Gimbrone MA. Intravascular IL-8. Inhibitor of polymorphonuclear leukocyte accumulation at sites of acute inflammation. *J Immunol* 1991; 147(3):883–92. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1650387/>.

105. Tharp WG, Yadav R, Irimia D, Upadhyaya A, Samadani A, Hurtado O, Liu S-Y, Munisamy S, Brainard DM, Mahon MJ, Nourshargh S, van Oudenaarden A, Toner MG, Poznansky MC. Neutrophil chemorepulsion in defined interleukin-8 gradients in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol* 2006; 79(3):539–54. doi: 10.1189/jlb.0905516.
106. Amatschek S, Lucas R, Eger A, Pflueger M, Hundsberger H, Knoll C, Grosse-Kracht S, Schuett W, Koszik F, Maurer D, Wiesner C. CXCL9 induces chemotaxis, chemorepulsion and endothelial barrier disruption through CXCR3-mediated activation of melanoma cells. *Br J Cancer* 2011; 104(3):469–79. doi: 10.1038/sj.bjc.6606056.
107. Akalin E, Neylan JF. The influence of Duffy blood group on renal allograft outcome in African Americans. *Transplantation* 2003; 75(9):1496–500. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12792503/>.
108. Cockwell P, Calderwood JW, Brooks CJ, Chakravorty SJ, Savage COS. Chemoattraction of T cells expressing CCR5, CXCR3 and CX3CR1 by proximal tubular epithelial cell chemokines. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17(5):734–44. doi: 10.1093/ndt/17.5.734.
109. Kuroiwa T, Schlimgen R, Illei GG, McInnes IB, Boumpas DT. Distinct T cell/renal tubular epithelial cell interactions define differential chemokine production: implications for tubulointerstitial injury in chronic glomerulonephritides. *J Immunol* 2000; 164(6):3323–9. doi: 10.4049/jimmunol.164.6.3323.
110. Vielhauer V, Anders HJ, Mack M, Cihak J, Strutz F, Stangassinger M, Luckow B, Gröne HJ, Schlöndorff D. Obstructive nephropathy in the mouse: progressive fibrosis correlates with tubulointerstitial chemokine expression and accumulation of CC chemokine receptor 2- and 5-positive leukocytes. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12(6):1173–87.
111. Dong X, Swaminathan S, Bachman LA, Croatt AJ, Nath KA, Griffin MD. Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* 2007; 71(7):619–28. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17311071/>.
112. Thorburn E, Kolesar L, Brabcova E, Petrickova K, Petricek M, Jaresova M, Slavcev A, Striz I. CXC and CC chemokines induced in human renal epithelial cells by inflammatory cytokines. *APMIS* 2009; 117(7):477–87. doi: 10.1111/j.1600-0463.2009.02446.x.
113. Deckers JG, van der Woude FJ, van der Kooij SW, Daha MR. Synergistic effect of IL-1alpha, IFN-gamma, and TNF-alpha on RANTES production by human renal tubular epithelial cells in vitro. *Journal of the American Society of Nephrology* 1998; 9(2):194.
114. Lin Q, Song Y, Zhu X, Yang S, Zheng J. Expressions of CXCL9, CXCL10 and CXCL11 in renal tubular epithelial cells induced by IFN- γ . *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2013; 29(2):137–40.

115. Nakaya I, Wada T, Furuichi K, Sakai N, Kitagawa K, Yokoyama H, Ishida Y, Kondo T, Sugaya T, Kawachi H, Shimizu F, Narumi S, Haino M, Gerard C, Matsushima K, Kaneko S. Blockade of IP-10/CXCR3 promotes progressive renal fibrosis. *Nephron Exp Nephrol* 2007; 107(1):e12-21. doi: 10.1159/000106505.
116. van Kooten C, Boonstra JG, Paape ME, Fossiez F, Banchereau J, Lebecque S, Bruijn JA, Fijter JW de, van Es LA, Daha MR. Interleukin-17 activates human renal epithelial cells in vitro and is expressed during renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9(8):1526–34.
117. Woltman AM, Haij S de, Boonstra JG, Gobin SJ, Daha MR, van Kooten C. Interleukin-17 and CD40-ligand synergistically enhance cytokine and chemokine production by renal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11(11):2044–55.
118. Gerritsma JS, Hiemstra PS, Gerritsen AF, Prodjosudjadi W, Verweij CL, van Es LA, Daha MR. Regulation and production of IL-8 by human proximal tubular epithelial cells in vitro. *Clin Exp Immunol* 1996; 103(2):289–94. doi: 10.1046/j.1365-2249.1996.d01-617.x.
119. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413(6857):732–8. doi: 10.1038/35099560.
120. Karikó K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem* 2004; 279(13):12542–50. doi: 10.1074/jbc.M310175200.
121. Lai Y, Di Nardo A, Nakatsuji T, Leichtle A, Yang Y, Cogen AL, Wu Z-R, Hooper LV, Schmidt RR, Aulock S von, Radek KA, Huang C-M, Ryan AF, Gallo RL. Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3-dependent inflammation after skin injury. *Nat Med* 2009; 15(12):1377–82. doi: 10.1038/nm.2062.
122. Lundberg AM, Drexler SK, Monaco C, Williams LM, Sacre SM, Feldmann M, Foxwell BM. Key differences in TLR3/poly I:C signaling and cytokine induction by human primary cells: a phenomenon absent from murine cell systems. *Blood* 2007; 110(9):3245–52. doi: 10.1182/blood-2007-02-072934.
123. Prens EP, Kant M, van Dijk G, van der Wel LI, Mourits S, van der Fits L. IFN-alpha enhances poly-IC responses in human keratinocytes by inducing expression of cytosolic innate RNA receptors: relevance for psoriasis. *J Invest Dermatol* 2008; 128(4):932–8. doi: 10.1038/sj.jid.5701087.
124. Taima K, Imaizumi T, Yamashita K, Ishikawa A, Fujita T, Yoshida H, Takanashi S, Okumura K, Satoh K. Expression of IP-10/CXCL10 is upregulated by double-stranded RNA in BEAS-2B bronchial epithelial cells. *Respiration* 2006; 73(3):360–4. doi: 10.1159/000091646.

125. Tsuboi N, Yoshikai Y, Matsuo S, Kikuchi T, Iwami K-I, Nagai Y, Takeuchi O, Akira S, Matsuguchi T. Roles of toll-like receptors in C-C chemokine production by renal tubular epithelial cells. *J Immunol* 2002; 169(4):2026–33. doi: 10.4049/jimmunol.169.4.2026.
126. Amura CR, Renner B, Lyubchenko T, Faubel S, Simonian PL, Thurman JM. Complement activation and toll-like receptor-2 signaling contribute to cytokine production after renal ischemia/reperfusion. *Mol Immunol* 2012; 52(3-4):249–57. doi: 10.1016/j.molimm.2012.05.020.
127. Chowdhury P, Sacks SH, Sheerin NS. Toll-like receptors TLR2 and TLR4 initiate the innate immune response of the renal tubular epithelium to bacterial products. *Clin Exp Immunol* 2006; 145(2):346–56. doi: 10.1111/j.1365-2249.2006.03116.x.
128. Bäckhed F, Söderhäll M, Ekman P, Normark S, Richter-Dahlfors A. Induction of innate immune responses by *Escherichia coli* and purified lipopolysaccharide correlate with organ- and cell-specific expression of Toll-like receptors within the human urinary tract. *Cell Microbiol* 2001; 3(3):153–8. doi: 10.1046/j.1462-5822.2001.00101.x.
129. Groot K de, Kuklik K, Bröcker V, Schwarz A, Gwinner W, Kreipe H, Haller H, Fliser D, Mengel M. Toll-like receptor 2 and renal allograft function. *Am J Nephrol* 2008; 28(4):583–8. doi: 10.1159/000115974.
130. Rossol M, Heine H, Meusch U, Quandt D, Klein C, Sweet MJ, Hauschildt S. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit Rev Immunol* 2011; 31(5):379–446. doi: 10.1615/critrevimmunol.v31.i5.20.
131. Krüger S, Brandt E, Klinger M, Kreft B. Interleukin-8 secretion of cortical tubular epithelial cells is directed to the basolateral environment and is not enhanced by apical exposure to *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2000; 68(1):328–34. doi: 10.1128/iai.68.1.328-334.2000.
132. Ulevitch RJ, Tobias PS. Recognition of Gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Current Opinion in Immunology* 1999; 11(1):19–22. doi: 10.1016/S0952-7915(99)80004-1.
133. Kim SJ, Kim HM. Dynamic lipopolysaccharide transfer cascade to TLR4/MD2 complex via LBP and CD14. *BMB Rep* 2017; 50(2):55–7. doi: 10.5483/BMBRep.2017.50.2.011.
134. Schilling JD, Martin SM, Hunstad DA, Patel KP, Mulvey MA, Justice SS, Lorenz RG, Hultgren SJ. CD14- and Toll-like receptor-dependent activation of bladder epithelial cells by lipopolysaccharide and type 1 piliated *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2003; 71(3):1470–80. doi: 10.1128/iai.71.3.1470-1480.2003.
135. Patole PS, Schubert S, Hildinger K, Khandoga S, Khandoga A, Segerer S, Henger A, Kretzler M, Werner M, Krombach F, Schlöndorff D, Anders H-J. Toll-like receptor-4: renal

- cells and bone marrow cells signal for neutrophil recruitment during pyelonephritis. *Kidney Int* 2005; 68(6):2582–7. doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.00729.x.
136. Smith KD, Andersen-Nissen E, Hayashi F, Strobe K, Bergman MA, Barrett SLR, Cookson BT, Aderem A. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol* 2003; 4(12):1247–53. doi: 10.1038/ni1011.
137. Andersen-Nissen E, Hawn TR, Smith KD, Nachman A, Lampano AE, Uematsu S, Akira S, Aderem A. Cutting edge: Tlr5^{-/-} mice are more susceptible to Escherichia coli urinary tract infection. *J Immunol* 2007; 178(8):4717–20. doi: 10.4049/jimmunol.178.8.4717.
138. Bauer S, Kirschning CJ, Häcker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(16):9237–42. doi: 10.1073/pnas.161293498.
139. Wagner H. Bacterial CpG DNA Activates Immune Cells to Signal Infectious Danger. In: Dixon FJ, Hrsg. *Advances in Immunology*. 1. Aufl. s.l.: Elsevier textbooks; 1999. S. 329–68 (Advances in Immunology; v.73).

8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Annemarie Müskes, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Chemokine im Kontext der verzögerten Nierentransplantatfunktion und deren Sekretion durch primäre renale tubuläre epitheliale Zellen/ Chemokines in delayed graft function and their secretion by primary renal tubular epithelial cells“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

[Für den Fall, dass Sie die Forschung für Ihre Promotion ganz oder teilweise in Gruppenarbeit durchgeführt haben:] Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

9 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10 Publikationen

- 1) Thieme, C.J., Weist, B.J.D., Mueskes, A., Roch, T., Stervbo, U., Rosiewicz, K., Wehler, P., Stein, M., Nickel, P., Kurtz, A., Lachmann, N., Choi, M., Smueck-Heneresse, M., Westhoff T.H., Reinke, P., Babel, N.: The TreaT-Assay: A Novel Urine-Derived Donor Kidney Cell-Based Assay for Prediction of Kidney Transplantation Outcome. *Sci Rep* **9**, 19037 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55442-x>

- 2) Schoppe, O., Pan, C., Coronel, J., Mai, H., Rong, Z., Todorov, M.I., Müskes, A., Navarro, F., Li, H., Ertürk, A., Menze, B.H.: Deep learning-enabled multi-organ segmentation in whole-body mouse scans. *Nat Commun* **11**, 5626 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19449-7>

11 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Nina Babel für die hervorragende fachliche Betreuung meiner Doktorarbeit und für die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Toralf Roch für seine hilfreiche Kritik sowie seine Geduld zahlreiche Fragen zu beantworten. Seine ausgezeichnete Betreuung der Arbeit hat maßgeblich zur Fertigstellung dieser Monografie beigetragen.

Frau Patrizia Wehler und Herrn Constantin Thieme danke ich herzlich für die wertvolle Unterstützung und Organisation im Labor. Ferner möchte ich mich bei Herrn Dr. Arturo Blázquez Navarro für die engagierte Unterstützung und Beantwortung vieler Fragen zum Thema Statistik bedanken. Bei Frau Anett Seffrin möchte ich mich für die Hilfe bei der Organisation der PatientInnen-Studie bedanken.

Ich bedanke mich herzlich bei allen Kolleginnen und Kollegen des Berliner Instituts für Gesundheitsforschung für die gute Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für Ihre lieben Worte, Geduld und Zusprüche während der Erarbeitung meiner Dissertation.