

Klinik für Innere Medizin IV – Nieren- und Hochdruckkrankheiten
Universität des Saarlandes
Homburg
Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Danilo Fliser

Die Rolle von Interleukin-1alpha bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes
2016

Tobias Herter

geboren am 24. Mai 1992 in Heidelberg

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
ZUSAMMENFASSUNG	V
ABSTRACT	VI
1. EINLEITUNG.....	1
1.1. DEFINITION UND EPIDEMIOLOGIE DER CHRONISCHEN NIERENERKRANKUNG	1
1.1.1. Ursachen der chronischen Nierenerkrankung	1
1.1.2. Glomeruläre Filtrationsrate	1
1.1.3. Die Albumin-Kreatinin-Ratio	3
1.1.4. Die Epidemiologie der chronischen Nierenerkrankung	3
1.2. RISIKOFAKTOREN DER CHRONISCHEN NIERENERKRANKUNG	4
1.3. ADAPTIVES UND ANGEBORENES IMMUNSYSTEM	5
1.3.1. Adaptives Immunsystem.....	5
1.3.2. Angeborenes Immunsystem.....	5
1.4. INTERLEUKIN-1 SUPER-FAMILIE	10
1.5. INTERLEUKIN-1 α	11
2. MATERIAL UND METHODIK	12
2.1. MATERIALIEN	12
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	12
2.1.2 Geräte/Materialien	14
2.1.4. Puffer und Medien	15
2.2. METHODIK	17
2.2.2. Votum der Ethikkommission	17
2.2.3. Patientenkollektiv	17
2.2.4. Probengewinnung	18
2.2.1. Studiendesign.....	18
2.2.5. Isolation von PBMC	18
2.2.6. Zellkultur.....	20
2.2.7. Gewinnung von Monozyten und Stimulation	21
2.2.8. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	22
2.2.9. Durchflusszytometrie	24

4.2.10 Statistik	28
3. ERGEBNISSE	29
3.1. CHARAKTERISIERUNG DER STUDIENGRUPPE	29
3.1.1. Rekrutierungsschema	29
3.1.2. Grunderkrankungen, Begleiterkrankungen und Risikofaktoren	30
3.1.3. Anthropometrische Charakteristika	33
3.1.4. Nierenfunktion	35
3.1.5. Laborparameter	37
2.2. OBERFLÄCHENEXPRESSION VON IL-1 α	39
3.3. SEKRETION VON IL-1 α	43
3.3.1. Stimulation mit LPS.....	43
3.3.2. Stimulation mit LPS und ATP	44
3.3.3. Stimulation mit LPS und Nigericin.....	45
3.3.4. Stimulation mit LPS und Aluminium	46
5. DISKUSSION.....	47
5.1. EXPRESSION VON IL-1 α	47
5.2. SEKRETION VON IL-1 α	49
5.3. BIOLOGISCHE WIRKUNG VON IL-1 α	55
5.4. THERAPEUTISCHE KONSEQUENZEN.....	57
5.5. LIMITATIONEN DER STUDIE.....	60
5.6. AUSBLICK	60
6. LITERATURVERZEICHNIS	61
7. EIGENE PUBLIKATIONEN.....	74
8. DANKSAGUNG	75

Abkürzungsverzeichnis

ACB-OP	Aortokoronare-Bypass-Operation
ACR	Albumin-Kreatinin-Ratio
AGE	Advanced glycation endproducts
ANCA	Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper
AOPP	Advanced oxidation protein product
AP-1	Activator-protein-1
APC	Allophycocyanin
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a carboxy-terminal CARD (caspase activation and recruitment domain)
ATP	Adenosintriphosphat
BMDM	Bone marrow derived macrophages
BMI	Body-Mass Index
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
CKD	Chronic Kidney Disease
CLR	C-type-lectin Rezeptor
COX	Cyclooxygenase
CRP	C-reaktives Protein
CVD	Cardiovascular disease
CXCL	Chemokine ligand
DAMP	Damage-associated molecular Pattern

DC	Dendritic cell
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetales Bovines Serum
FITC	Fluorescein isothiocyanat
FMD_{BA}	brachial artery flow mediated dilation
FSC	Forward Scatter
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GN	Glomerulonephritis
HAX-1	HCLS1-(Hematopoietic lineage cell-specific protein)-assoziiertes Protein X-1
HD	Hämodialyse
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HMG-1	High-Mobility-Group-Protein 1
HRP	Meerrettichperoxidase
IL	Interleukin
IL-1Ra	Interleukin-1-receptor antagonist
IL-1RAcP	Interleukin-1-receptor accesory protein
IL-1R1	Interleukin-1-receptor 1
IRAK	Interleukin-1-Rezeptor assoziierte Kinase
KHK	Koronare Herzkrankheit

LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP	Monocyte chemoattractant Protein
MFI	Mean fluorescence intensity
MHC	Major-histocompatibility complex
mTOR	Mammalian-target of Rapamycin
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NALP3	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLR	NOD (Nucleotide-binding oligomerization domain)-like Rezeptor
NLS	Nuclear-localization sequence (Kernlokalisierungssequenz)
NTP	N-terminal piece
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PE	Phycoerythrin
PRR	Pattern-recognition Rezeptor
RAGE	Receptor for advanced glycation endproducts
RLR	Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like Rezeptor
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies

SASP	Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp
SDMA	Symmetrisches Dimethylarginin
sICAM	soluble Intercellular Adhesion Molecule
SSC	Side Scatter
sVCAM	soluble Vascular cell adhesion molecule
TAB	TAK-binding protein
TAK	Transforming growth factor beta-activated kinase
TLR	Toll-like Rezeptor
TMAO	Trimethylamin N-oxid
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
TRAF	TNF-receptor associated factor
TRMP2	Transient-receptor-potential-cation-channel M2

Zusammenfassung

Die chronische Nierenerkrankung (CKD) ist eine häufige Erkrankung, welche mit einer hohen Morbidität und Mortalität einhergeht und hohe Therapiekosten verursacht. Zu den wichtigsten Komorbiditäten gehören unter anderem die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen. In der Pathophysiologie der CKD sowie dieser Komorbiditäten spielt eine sterile Inflammation vermittelt durch das angeborene Immunsystem eine zentrale Rolle. Es ist bekannt, dass hierbei insbesondere Interleukine der IL-1 Super-Familie entscheidend bei der Entstehung und Aufrechterhaltung dieser Inflammationsreaktion sind. IL-1 β wurde als ein zentrales Zytokin identifiziert, während allerdings neuere Studien zeigen, dass auch IL-1 α eine zentrale Rolle bei der Entstehung einer sterilen Inflammation spielt. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die Monozyten chronisch Nierenkranker und gesunder Probanden isoliert und mittels Durchflusszytometrie auf deren Oberflächenexpression von IL-1 α untersucht. Zudem wurde in Zellkulturexperimenten mittels ELISA die Sekretion von IL-1 α quantifiziert. Die Ergebnisse zeigten eine mit zunehmendem Stadium der CKD erhöhte Expression von IL-1 α auf der Zellmembran der Monozyten im Vergleich zu gesunden Probanden. Außerdem sezernierten Monozyten chronisch Nierenkranker mit zunehmendem Stadium der CKD vermehrt IL-1 α im Vergleich zu Monozyten gesunder Probanden. Diese Ergebnisse sprechen für eine Rolle von IL-1 α in der Pathophysiologie der CKD sowie ihrer Begleiterkrankungen und bieten Möglichkeiten für potentielle zukünftige therapeutische Interventionen.

Abstract

Chronic kidney disease (CKD) is a frequent disease associated with high morbidity and mortality causing high health care expenditures. CKD is associated with a variety of comorbidities such as cardiovascular disease. Sterile inflammation caused by activation of the innate immune system plays a central role in the pathophysiology of CKD itself and its comorbidities.

It is known that cytokines of the IL-1 superfamily play important roles in the initiation and perpetuation of sterile inflammation. IL-1 β has been thought to represent a key cytokine in this process but recent publications also suggest a crucial role for IL-1 α . We isolated monocytes from patients with CKD and healthy subjects and quantified cell surface-bound IL-1 α expression by using flow-cytometry. Moreover, IL-1 α secretion upon stimulation with known stimuli of IL-1 α secretion was determined by using ELISA. IL-1 α expression on the cell surface of monocytes significantly increased with progression of CKD. Furthermore, monocytes of CKD patients showed greater secretion of IL-1 α in response to several ligands as compared to healthy subjects. These findings highlight on a role of IL-1 α in the pathophysiology of CKD and its comorbidities. Moreover, targeting IL-1 α could provide a potential therapeutic approach.

1. Einleitung

1.1. Definition und Epidemiologie der chronischen Nierenerkrankung

Die chronische Nierenerkrankung (CKD) ist definiert als eine Abweichung von der normalen Nierenstruktur oder Funktion über einen Zeitraum von mehr als 3 Monaten (1). Zur weiteren Einteilung der CKD werden ihre Ursachen, die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und die Albumin-Kreatinin-Ratio (ACR) herangezogen.

1.1.1. Ursachen der chronischen Nierenerkrankung

Die chronische Nierenerkrankung wird zwar als eigene Krankheit definiert, ist aber die Folge von verschiedensten systemischen Erkrankungen und Erkrankungen der Niere, welche zu einem progredienten Verlust der Nierenfunktion führen. Dieser Aspekt ist entscheidend zur Einschätzung der Prognose und für die Therapie und geht deshalb in die Klassifikation der chronischen Nierenerkrankung ein. Vor allem in den westlichen Ländern sind systemische Erkrankungen wie Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie die vorherrschenden Ursachen, während in Südostasien vermehrt auch glomeruläre Erkrankungen oder interstitielle Nephropathien zur Entstehung der CKD beitragen (2,3).

1.1.2. Glomeruläre Filtrationsrate

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) ist ein Maß für die allgemeine Filterfunktion der Niere. Sie kann anhand der renalen Clearance eines bestimmten Stoffes bestimmt werden. Die Clearance gibt an, wie viele Milliliter Blut, welches die Niere durchfließt, innerhalb einer Minute von einem bestimmten Stoff befreit werden. Obwohl exogene Marker zur Bestimmung der GFR genauer sind, werden im klinischen Alltag die endogenen Marker Kreatinin und Cystatin C zur Abschätzung der eGFR (eGFR, estimated GFR) angewendet, da deren Bestimmung wesentlich einfacher und günstiger ist. Anhand der Serumwerte dieser Marker kann dann, mithilfe von in großen epidemiologischen Studien validierten Formeln, die eGFR abgeschätzt werden. Die CKD-EPI Kreatininformel aus dem Jahr 2012 gilt hierbei als Standard zur Bestimmung der eGFR (1).

$$141 \times \min\left(\frac{SCr}{k}, 1\right)^\alpha \times \max\left(\frac{SCr}{k}, 1\right)^{-1,209} \times 0,993^{Alter} \times (1,018 \text{ wenn weiblich}) \\ \times (1,159 \text{ wenn dunkelhäutig})$$

2009 CKD-EPI Kreatininformel SCr, Serum-Kreatinin (in mg/dl); k und α , geschlechtsabhängige Variablen; min, Minimum von SCr/k oder 1; max, Maximum von SCr/k oder 1. (KDIGO 2012)

Problematisch ist die Bestimmung der GFR mittels Serum-Kreatinin bei Patienten mit geringer Filterfunktionseinschränkung und mit geringer Muskelmasse, da das Serumkreatinin abhängig von der Muskelmasse ist und in geringer Menge auch tubulär sezerniert wird (4). Dies kann zu normalen Werten der GFR bei bereits vorhandener Einschränkung der glomerulären Filtration führen. Ein endogener Marker, welcher weniger abhängig von diesen Faktoren ist, stellt Cystatin C dar. Daher kann die Bestimmung der GFR anhand der 2012 CKD-EPI Cystatin C-Formel in solchen Fällen zu einer sensitiveren Diagnostik beitragen (1,5).

$$133 \times \min\left(\frac{SCysC}{0,8}, 1\right)^{-0,499} \times \max\left(\frac{SCysC}{0,8}, 1\right)^{-1,328} \times 0,966^{Alter} \times (0,932 \text{ wenn weiblich})$$

2012 CKD-EPI Cystatin C-Formel SCysC, Serumcystatin C (in mg/l); min, Minimum von SCysC/0,8 oder 1; max, Maximum von SCysC/0,8 oder 1. (KDIGO 2012)

Goldstandard stellt gemäß der aktuellen KDIGO Leitlinie die Schätzung der eGFR mittels Kreatinin und Cystatin C dar. Hierzu existiert folgende Formel:

$$135 \times \min\left(\frac{SCr}{k}, 1\right)^\alpha \times \max\left(\frac{SCr}{k}, 1\right)^{-0,601} \times \min\left(\frac{SCysC}{0,8}, 1\right)^{-0,375} \times \max\left(\frac{SCysC}{0,8}, 1\right)^{-0,771} \times 0,995^{Alter} \times (0,969 \text{ weiblich}) \times (1,08 \text{ wenn dunkelhäutig})$$

2012 CKD-EPI Kreatinin-Cystatin C-Formel SCr, Serumkreatinin (in mg/dl); SCysC, Serumcystatin C (in mg/l); k und α , geschlechtsabhängige Variablen; min(SCr/k, 1), Minimum von SCr/k oder 1; max(SCr/k, 1), Maximum von SCr/k oder 1; min(SCysC/0,8, 1), Minimum von SCysC/0,8 oder 1; max(SCysC/0,8, 1), Maximum von SCysC/0,8 oder 1. (KDIGO 2012)

Die Stadieneinteilung der Nierenfunktion nach KDIGO Leitlinie ist in Tabelle 2 dargestellt.

Stadium	eGFR	Nierenfunktion
G1	≥90 mg/dl	normal bis hoch
G2	60-90 mg/dl	leicht vermindert
G3a	45-60 mg/dl	leicht bis mittelgradig vermindert
G3b	30-45 mg/dl	mittelgradig bis schwer vermindert
G4	15-30 mg/dl	schwer vermindert
G5	<15 mg/dl	Nierenversagen

Tabelle 2 Stadien der CKD anhand der eGFR (KDIGO 2012)

1.1.3. Die Albumin-Kreatinin-Ratio

Ein weiterer Parameter, der zur Einteilung der chronischen Nierenerkrankung herangezogen wird, ist die Albumin-Kreatinin-Ratio (ACR). Aufgrund seiner negativen Ladung und Größe kann Albumin den glomerulären Filter nicht passieren und wird außerdem tubulär rückresorbiert, wodurch es nicht im Urin nachweisbar ist. Ist der glomeruläre Filter beschädigt, beziehungsweise die tubuläre Rückresorption gestört, kommt es zu einer Ausscheidung von Albumin mit dem Urin. Der Bestimmung der ACR kommt vor allem bei der Abschätzung der Prognose sowie der Mortalität eine wichtige Rolle zu (1,6). So konnten mehrere Studien zeigen, dass Patienten mit Proteinurie zehnmal häufiger eine Niereninsuffizienz entwickeln und ein 50% höheres Risiko haben zu versterben (7). Die Stadieneinteilung der Albuminurie erfolgt wie in Tabelle 3 gezeigt.

Stadium	Normal bis leicht erhöht	Mittelgradig erhöht	Stark erhöht
	A1	A2	A3
ACR	< 30 mg/g	30-300 mg/g	>300 mg/g
Urinstix	Negativ bis minimal	Minimal bis +	+ oder größer

Tabelle 3 Einteilung der CKD nach der Albumin-Kreatinin-Ratio (KDIGO 2012)

1.1.4. Die Epidemiologie der chronischen Nierenerkrankung

In der westlichen Welt erkranken 200 Patienten pro einer Millionen pro Jahr an einer Niereninsuffizienz oder müssen nierentransplantiert werden (8). In der *Global Burden of Diseases* Studie ist die CKD von 1990 bis 2010 von Rang 27 auf 18 der weltweiten Todesursachen gestiegen und wird für 1,4% der erfassten Todesfälle verantwortlich gemacht (9). Die Prävalenz der CKD stieg in der NHANES Studiengruppe in den USA zwischen 1994 bis 2004 von 12% auf 14% und ist seither konstant geblieben (10). In Europa ist die Häufigkeit der CKD je nach Region sehr unterschiedlich und liegt zwischen 3,3% in Norwegen und 17,3% im Nordosten Deutschlands (12).

Die chronische Nierenerkrankung stellt somit weltweit eine sehr häufige Erkrankung mit einer hohen Morbidität und Mortalität dar. So ist das Risiko eines kardiovaskulären Ereignisses bei CKD-Patienten deutlich erhöht und auch das Risiko zu sterben ist für chronisch Nierenkranke deutlich höher. Schon im Stadium G3a haben die Patienten ein 1,2-fach erhöhtes Risiko zu versterben und im Stadium G5 sogar ein 6-fach erhöhtes Risiko (13) im Vergleich zu Nierengesunden.

1.2. Risikofaktoren der chronischen Nierenerkrankung

Bei der Entstehung der chronischen Nierenerkrankung spielen multiple Faktoren eine Rolle. Sowohl die klassischen Risikofaktoren kardiovaskulärer Erkrankungen als auch CKD-spezifische Risikofaktoren sind in der Pathophysiologie von Bedeutung (Tabelle 4).

Klassische Risikofaktoren	CKD-spezifische Risikofaktoren
Diabetes mellitus	Alter
Arterielle Hypertonie	Nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR)
Übergewicht	Männliches Geschlecht
Hyperlipidämie	Proteinurie
Nikotinabusus	Verminderte eGFR

Tabelle 4 Risikofaktoren der CKD

In der Pathophysiologie der chronischen Nierenerkrankung spielt hierbei häufig eine chronische, sterile Entzündung eine Rolle, welche durch das angeborene Immunsystem ausgelöst und aufrechterhalten wird. Mehrere Studien zeigen, dass es mit abnehmender GFR zu einer Erhöhung von Biomarkern für oxidativen Stress kommt (14,15). Bei Hämodialysepatienten ist bekannt, dass eine Erhöhung der inflammatorischen Biomarker wie CRP, IL-6 und TNF- α mit einer erhöhten Mortalität einhergeht und auch bei chronisch Nierenkranken in früheren Stadien ist eine Erhöhung der Inflammationsmarker mit einer erhöhten Mortalität assoziiert (16,17). Aus diesem Grund ist die Rolle des angeborenen Immunsystems bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der chronischen Nierenerkrankung ein zentrales Thema aktueller Forschung.

1.3. Adaptives und angeborenes Immunsystem

Das Immunsystem besteht aus dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem, welche durch verschiedene Mechanismen miteinander verknüpft sind.

1.3.1. Adaptives Immunsystem

Das adaptive Immunsystem ist darauf spezialisiert, eine zielgerichtete Immunreaktion gegen Erreger auszulösen. Pathogene werden hierbei von Phagozyten (z.B. dendritischen Zellen, Makrophagen) erkannt und phagozytiert. Anschließend migrieren diese Zellen aus dem Gewebe über das Blut in die Lymphknoten, wo sie die von ihnen prozessierten Antigene über MHC-I und MHC-II präsentieren und somit eine spezifische Immunreaktion gegen das Antigen über die Aktivierung von B-Lymphozyten oder T-Lymphozyten auslösen (18).

1.3.2. Angeborenes Immunsystem

Bei der Entstehung der chronischen Nierenerkrankung und deren Komplikationen ist das angeborene Immunsystem von besonderer Bedeutung. Auch das angeborene Immunsystem ist in der Lage, Pathogene zu erkennen und eine Immunreaktion auszulösen. Allerdings ist diese Immunreaktion im Unterschied zum adaptiven Immunsystem eine unspezifische Inflamationsreaktion und keine spezifische Reaktion gegen das auslösende Pathogen. Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind Immunzellen, spezielle Rezeptoren und deren Liganden sowie Zytokine. Tabelle 5 gibt einen Überblick über ausgewählte Zelltypen, welche im angeborenen Immunsystem eine Rolle spielen.

Zellart	Funktion im Immunsystem
Monozyt	<p>Monozyten entstehen aus mononukleären Vorläuferzellen des Knochenmarks und zirkulieren im Blut (19,20). Sie haben im Blut eine Lebensdauer von 1-2 Tagen und gehen, wenn sie in dieser Zeit nicht rekrutiert werden, in Apoptose (21). Im Blut sind sie an der angeborenen Immunabwehr gegen diverse Erreger beteiligt und aktivieren durch Zytokinsekretion weitere Zellen des Immunsystems (22). Auf der anderen Seite können sie auch in Gewebe einwandern und dort zu Makrophagen differenzieren (21). Monozyten werden anhand der Oberflächenmoleküle CD14 und CD16 in klassische ($CD14^{++}CD16^{-}$), intermediäre ($CD14^{++}CD16^{+}$) und nicht-klassische Monozyten ($CD14^{+}CD16^{++}$) unterteilt (23). Den klassischen Monozyten wird eine proinflammatorische Funktion zugeschrieben, während vermutet wird, dass den nicht-klassischen Monozyten Funktionen der Virusimmunität und Kontroll- und Regulatorfunktionen zukommen (24).</p>
Makrophagen	<p>Makrophagen sind gewebständige mononukleare Zellen, welche durch Migration und Differenzierung von Monozyten entstehen (25). Es gibt allerdings auch gewebständige Makrophagen welche von Dottersackzellen abstammen und somit nicht der klassischen Differenzierung aus Monozyten folgen (26). Makrophagen werden in die zwei Typen M1 und M2 unterteilt, wobei ersteren eine proinflammatorische Funktion zugeschrieben wird und letztere zur Beendigung einer Entzündungsreaktion beitragen (27). Sie besitzen eine Vielzahl an Rezeptoren zur Erkennung von Pathogenen und sind in der Lage, Erreger oder apoptotische Zellen zu phagozytieren und über die Sekretion von Zytokinen weitere Effektorzellen des Immunsystems zu rekrutieren, um eine Entzündungsreaktion auszulösen (28). Außerdem können sie phagozytierte Antigene über MHC-II auf ihrer Zelloberfläche präsentieren und somit T-Helferzellen des adaptiven Immunsystems aktivieren (29).</p>

Zellart	Funktion im Immunsystem
Dendritische Zellen (DC)	DCs stellen eine Verbindung zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem dar. Sie kommen in den peripheren Geweben vor und besitzen diverse Oberflächenrezeptoren zur Erkennung von Pathogenen. Erkennen DCs einen Erreger, so phagozytieren sie diesen und wandern anschließend über das Blut in die Lymphknoten, wo sie das prozessierte Antigen über MHC-I oder MHC-II präsentieren und die Lymphozyten des adaptiven Immunsystems aktivieren (18). Neben dieser Funktion sind DCs aber auch in der Lage eine Vielzahl von Zytokinen zu produzieren und darüber natürliche Killerzellen oder weitere Effektoren des angeborenen Immunsystems zu aktivieren (30).
Granulozyten	Die Gruppe der Granulozyten besteht aus den neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten. Sie werden auch als die Effektorzellen des Immunsystems bezeichnet. Stimuliert durch Zytokine und Mediatoren gelangen sie durch Endotheldiapedese an den Ort der Entzündung, an welchem sie Pathogene phagozytieren und durch Enzyme und reaktive Sauerstoffspezies aus ihren Granula eliminieren können (31). Über Zell-Zell-Kontakt zu Monozyten, dendritischen Zellen oder Lymphozyten können sie die Immunantwort modulieren (32).
Natürliche Killer(NK)-Zellen	Die NK-Zellen gehören zur Gruppe der Lymphozyten. Sie sind allerdings Effektoren des angeborenen Immunsystems, während Lymphozyten klassischerweise als Zellen des adaptiven Immunsystems betrachtet werden (33). NK-Zellen sind in der Lage, infizierte Zellen oder Tumorzellen zu erkennen und zu lysieren (34). Weiterhin können sie Zytokine wie $\text{INF-}\gamma$ und $\text{TNF-}\alpha$ sezernieren und sind an der Differenzierung von DCs beteiligt, womit sie Einfluss auf die Regulation von T-Lymphozyten nehmen (35).

Tabelle 5 Zellen des angeborenen Immunsystems

Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems findet über Pattern-Recognition Receptors (PRRs, Mustererkennungsrezeptoren) auf der Zellmembran beispielsweise von Monozyten und Makrophagen statt, welche sowohl exogene 'Pathogen-Associated Molecular Patterns' (PAMPs) als auch endogene 'Damage-Associated Molecular Patterns' (DAMPs) erkennen und über intrazelluläre Signalkaskaden eine Inflammationsreaktion auslösen. Als PAMPs werden hierbei exogene Liganden bezeichnet, welche zum Beispiel Bestandteile von Mikroorganismen sind, wohingegen als DAMPs, endogene Liganden bezeichnet werden, welche von körpereigenen Zellen als Reaktion auf eine Verletzung, Ischämie oder Zellschädigung freigesetzt werden (36). Tabelle 6 gibt einen Überblick über die bekannten PRRs und ihre Funktionen im angeborenen Immunsystem.

Pattern-Recognition-Rezeptoren	Eigenschaften
Toll-like Rezeptoren (TLRs)	Es sind bisher zehn verschiedene TLRs im Menschen entdeckt worden. Sie kommen sowohl auf der Zellmembran als auch auf intrazellulären Vesikeln vor. Erkennen sie zum Beispiel Lipopolysaccharide oder virale RNA, aber auch endogene Liganden wie abnormales HDL von chronisch Nierenkranken, so führen sie über einen Signalweg via myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) zu einer Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren und zur Freisetzung von Zytokinen, Rezeptoren und weiteren Mediatoren (37).
C-type lectin Rezeptoren (CLRs)	Diese Rezeptoren sind durch eine C-typ Lektin-Domäne gekennzeichnet und vorwiegend für die Immunantwort gegen Pilze von Bedeutung. Neuere Erkenntnisse zeigen aber auch dass CLRs ebenfalls über Transkriptionsfaktoren zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β führen (38).

Pattern-Recognition-Rezeptoren	Eigenschaften
Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like Rezeptoren (RLRs)	RLRs kommen ubiquitär im Zytoplasma vor und werden durch virale RNA aktiviert. Dadurch wird eine Signalkaskade ausgelöst, welche zur Freisetzung von Interferon-gamma führt. Ebenfalls sind Signalwege beschrieben, über welche es zur Aktivierung des Inflammasoms und zur Freisetzung von IL-1 β kommt (39).
Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like Rezeptoren (NLRs)	Die Bestandteile der NLRs kommen im Zytoplasma von Zellen vor. Über ihre Aktivierung kommt es zur Bildung des Inflammasoms. Bislang wurden einige Inflammasome beschrieben, wobei das NLRP3-Inflammasom am besten charakterisiert wurde. Durch ein erstes Signal kommt es über TLRs und NF- κ B zur Expression von pro-IL-1 β und den Bestandteilen des Inflammasoms. Durch ein zweites Signal kommt es dann zur Aktivierung des Inflammasoms durch das Zusammenlagern von Caspase-1, ASC und NALP3. Dieser Komplex spaltet anschließend die Vorläufer der Zytokine IL-1 β , IL-33 und IL-18 in deren aktive Form, welche daraufhin sezerniert werden (37).

Tabelle 6 Pattern-recognition Rezeptoren und ihre Funktion

Es sind eine Vielzahl exogener als auch endogener Liganden dieser PRRs bekannt. In der Pathogenese der CKD sind dabei vor allem endogene Stoffe von Bedeutung, welche über eine Aktivierung des Immunsystems zu einer chronischen Entzündung führen. Zu dieser Gruppe von Liganden gehören zum Beispiel Fibrinogen, ATP (40), Cholesterinkristalle (41) oder auch modifiziertes HDL von chronisch Nierenkranken (42). Als Konsequenz der Aktivierung über PRRs kommt es zu einer Freisetzung von Zytokinen, welche zu einer chronischen sterilen Entzündung führen. Hierbei spielen Zytokine der Interleukin-1 Super-Familie eine wichtige pathophysiologische Rolle.

1.4. Interleukin-1 Super-Familie

Erstmals beschrieben wurden die Interleukine 1974 von Dinarello et al. als Pyrogene, das heißt fieberauslösende Stoffe (43) und 1985 wurden die Aminosäuresequenzen von IL-1 α und IL-1 β entschlüsselt und benannt (44). Diese Gruppe von Zytokinen und ihre Rezeptoren bilden ein Netzwerk zur Kommunikation und Regulation des angeborenen Immunsystems. In den folgenden Jahren wurden weitere Zytokine der IL-1 Super-Familie entdeckt. Tabelle 7 zeigt hierzu eine Übersicht der heute bekannten Zytokine der Interleukin-1 Super-Familie und ihrer Funktionen.

Zytokin	Rezeptoren	Funktion
IL-1 α	IL-1R1 IL-1R2	Kontrolle von Apoptose vs. Nekrose (45), Tumorkontrolle (46), Alarmin
IL-1 β	IL-1R1, IL-1R2	Proinflammatorisch, Tumorangiogenese und Metastasierung (47), antimikrobielle Wirkung
IL-18	IL-18R α	Aktivierung von Th1-Lymphozyten und NK-Zellen, ähnlich zu IL-1 β Caspase-1 abhängig
IL-33	ST2	Aktivierung von Th2-Lymphozyten und M2-Makrophagen (48), Geweberegeneration
IL-36 α	IL-36R	Th1-Lymphozytenpolarisierung (49)
IL-36 β		
IL-36 γ		
IL-36Ra	IL-36R	Antiinflammatorisch, Schutz vor überschießender Immunreaktion
IL-1Ra	IL-1R1	Antiinflammatorisch, Schutz vor überschießender Immunreaktion
IL-38	IL-36R	Ähnliche Struktur zu IL-36Ra und IL-1Ra
IL-37	IL-18R α	Inhibitor des Immunsystems, Verringerung der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (50)

Tabelle 7 Zytokine der Interleukin-1 Super-Familie und ihre Funktionen

1.5. Interleukin-1 α

IL-1 α wird konstitutiv in Epithelzellen, Zellen des Gastrointestinaltraktes und Keratinozyten verschiedener Gewebe im Zytosol exprimiert (51,52). Die Funktion von IL-1 α ist in diesem Falle die eines Alarmins, das heißt, es wird bei Zellschädigung freigesetzt und dient als Warnsignal für Zellen des Immunsystems. Im Unterschied zu IL-1 β ist IL-1 α schon in seiner Vorläuferform aktiv und nicht von der, über das Inflammasom getriggerten, Spaltung durch Caspase-1 abhängig (53,54). IL-1 α besitzt außerdem eine Kernlokalisierungssequenz (NLS) und kann deshalb in den Zellkern translozieren, wo es an Chromatin bindet. Diesem Mechanismus kommt eine entscheidende Bedeutung beim Zelluntergang durch Apoptose oder Nekrose zu. In apoptotischen Zellen wird intrazelluläres IL-1 α in den Kern transloziert. Somit kommt es bei Untergang der Zelle nicht zur Freisetzung von IL-1 α (45). In nekrotischen Zellen hingegen wird durch Verlust der Membranstabilität IL-1 α aus dem Zytosol freigesetzt, welches über Stimulation des Immunsystems zu einer Entzündungsreaktion führt (55). IL-1 α wird außerdem auch membrangebunden auf der Oberfläche von Monozyten exprimiert (56). Nach Stimulation von Monozyten mit LPS oder hitzeinaktivierten Bakterien sezernieren diese IL-1 α und exprimieren es zusätzlich auf ihrer Membran (57,58). Evidenz für eine Rolle von IL-1 α in diversen pathophysiologischen Vorgängen findet sich durch Experimente im Mausmodell. So hatten Mäuse mit einem knock-out für IL-1 α in einem Modell für Colitis deutlich geringere Epithelschäden und überlebten länger als korrespondierende Wildtyp-Mäuse (59). Freigang et al. zeigten in einem Mausmodell, in welchem LDL-Rezeptor Knock-out Mäuse unter cholesterolreicher Diät gesetzt wurden, dass Mäuse mit einem zusätzlichen knock-out für IL-1 α , signifikant weniger Atherosklerose entwickeln (60). Diese Erkenntnisse zeigen, dass IL-1 α eine wesentliche Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung der sterilen Entzündung spielt, welche auch in der Pathophysiologie der chronischen Nierenerkrankung von Bedeutung ist.

Zur Untersuchung der Fragestellung, welche Rolle IL-1 α bei Patienten mit CKD spielt, wurden in dieser Arbeit Monozyten von chronisch Nierenkranken und gesunden Probanden auf ihre Expression von IL-1 α auf der Zellmembran untersucht und verglichen. Weiterhin wurde die Stimulierbarkeit dieser Monozyten zur Sekretion von IL-1 α untersucht.

2. Material und Methodik

2.1. Materialien

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Material	Hersteller
Aluminium (Alum crystals)	InvivoGen, San Diego, USA
Ammoniumchlorid 4N	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Antikörper CD14 PE (50µg/ml)	BD (Becton, Dickinson Company) , Franklin Lakes, NJ, USA
Antikörper CD16 APC (150µg/ml)	BioLegend, San Diego, USA
Antikörper Anti-human-IL-1α FITC (0,5 mg/ml)	eBioscience, Frankfurt, D
Antikörper Mouse IgG1 kappa Isotype Control, FITC	eBioscience, Frankfurt, D
Adenosintriphosphat (ATP)	InvivoGen, San Diego, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories, Cölbe, D
ELISA-Kit: Mouse IL-1α ELISA Max™ Deluxe	BioLegend, San Diego, USA
Endotoxinfreies Wasser HyClone™ Water	GE Healthcare Life Sciences, Utah, USA
Fetales Bovines Serum (FBS)	Gibco /Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Formaldehyd	Alfa Aesar GmbH, Karlsruhe, D

Material	Hersteller
LPS-EB Ultrapure	InvivoGen, San Diego, USA
Ficoll Separationsmedium (LymphocytSeparation Medium 1077)	PromoCell bioscience alive GmbH, Heidelberg, D
Kaliumhydrogenkarbonat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Natriumazid (NaN ₃)	Merck Millipore GmbH, Schwalbach, D
Nigericin	InvivoGen, San Diego, USA
Opti-MEM Reduced Serum Medium	Gibco /Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco /Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Pen/Strep (10.000 U/l)	Gibco /Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Salzsäure 6N	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Schwefelsäure 1M	Fisher Scientific, Loughborough, UK
Trypanblau 0,4%	Sigma life science, St. Luis, USA
Tween-20	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Medium (RPMI-1640 GlutaMAX™)	Gibco /Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

2.1.2 Geräte/Materialien

Gerätename	Hersteller
Durchflusszytometer FACSCantoII	BD (Becton, Dickinson Company) , Franklin Lakes, NJ, USA
ELISA 96-Well Platten	Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen, D
Inkubator	Binder GmbH, Tuttlingen, D
Mikrotitrierplatten-Photometer Sunrise	Tecan Trading AG, Männedorf, CH
Schüttler PMR-30 Platform Rocker	Grant Bio, Oregon,USA
Sicherheitswerkbank Airstream Esco class II BSC	Biomedis Vertriebsgesellschaft GmbH, Gießen, D
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf AG, Hamburg, D

2.1.4. Puffer und Medien

Puffer / Medium	Rezept
Ammoniumchlorid Lysepuffer (0,155M)	500 ml H ₂ O 4,15 g NH ₄ Cl 0,5006 g KHCO ₃ 0,1 ml EDTA-Lösung pH 7,4 mit Salzsäure titrieren
EDTA-Lösung (0,5M)	186,1 g EDTA 800 ml H ₂ O pH 8,0 mit NaOH einstellen auf 1000 ml auffüllen und autoklavieren
ELISA Coating-Puffer	200 µl 5X Coating-Buffer (Carbonatpuffer) 800 µl H ₂ O
ELISA Waschpuffer	500 ml PBS 0,25 ml Tween 20
ELISA Assay Diluent	10 ml Assay Diluent Stock 40 ml PBS
ELISA Fixationsantikörperlösung	5 µl Fixationsantikörperansatz 995 µl Coating-Puffer
ELISA Detektionsantikörperlösung	5 µl Detektionsantikörperansatz 995 µl Assay Diluent
ELISA Avidin-horseradish-peroxidase (HRP)-Lösung	1 µl Avidin HRP 999 µl Assay Diluent

Puffer/Medium	Rezept
FACS-Puffer	500 ml PBS 5% (v/v) FBS 0,5% (w/v) BSA 0,007 (v/v) NaN ₃
FACS-Färbepuffer	200 µl FACS-Puffer 1 µl CD16 APC Antikörper (0,75 µg/ml) 4 µl CD14 PE Antikörper (1 µg/ml) 4 µl IL-1α FITC Antikörper (10 µg/ml)
Aluminium (40 mM)	1 ml endotoxinfreies Wasser 20 mg Aluminium 5 min durch Ultraschall homogenisieren
ATP (200 mM)	1 ml endotoxinfreies Wasser 110 mg ATP
Nigericin (2,68 mM)	2ml Ethanol 10mg Nigericin 3 ml steriles PBS
Zellkulturmedium (Vollmedium)	500ml RPMI 10% FBS 1% Pen/Strep

2.2. Methodik

Die Versuche wurden - soweit nicht anders angegeben - bei Raumtemperatur (20 °C) und mit deionisiertem Wasser durchgeführt. Die Versuchsdurchführung fand unter sterilen Bedingungen statt.

2.2.2. Votum der Ethikkommission

Diese Arbeit fand im Rahmen der Studie „Untersuchungen zur Rolle des Inflammasoms bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen“ statt, welche am 20.08.2013 unter der Kennnummer 155/13 von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt wurde.

2.2.3. Patientenkollektiv

In der Zeit von September 2013 bis zum März 2016 wurden an der Klinik für Innere Medizin IV des Universitätsklinikums des Saarlandes Patienten mit chronischer Nierenerkrankung rekrutiert. Das Stadium der chronischen Nierenerkrankung wurde anhand der CKD-EPI Kreatinin Cystatin C-Formel in die Stadien G1 bis G5 nach KDIGO 2012 festgelegt (1). Die Stadien G1 und G2, sowie die Stadien G4 und G5 wurden jeweils zu einer Gruppe zusammengefasst. Als weitere Studiengruppen wurden Patienten nach Nierentransplantation ('Transplant') und Hämodialyse-Patienten rekrutiert. Eine Gruppe mit gesunden Probanden wurde als Referenzgruppe in die Studie eingeschlossen. Für alle Gruppen galten das Vorliegen eines Malignoms, einer Schwangerschaft oder einer akuten Entzündung definiert durch eine Leukozytose >10.000 Zellen/ μl als Ausschlusskriterien. Für die Gruppe der Gesunden galten weiterhin eine regelmäßige Einnahme von Medikamenten, eine manifeste KHK, eine pAVK, eine zerebrovaskuläre Erkrankung und ein Diabetes mellitus als Ausschlusskriterien. Neben der Entnahme venösen Blutes zur Isolierung von PBMC wurde bei der Rekrutierung eine Anamnese, körperliche Untersuchung und eine allgemeine klinisch-chemische Laboruntersuchung durchgeführt. Hierbei wurden Kreatinin, Cystatin C, Albumin, Harnstoff, Harnsäure, Kalium, CRP, Leukozyten, Hämoglobin und HbA1C erfasst. Anhand von Kreatinin und Cystatin C im Blut wurde die eGFR nach der zuvor beschriebenen beschriebenen Formel (siehe Seite 2, Einleitung), sowie anhand von Albumin und Kreatinin im Urin die ACR bestimmt und die Patienten den Studiengruppen zugeordnet.

2.2.4. Probengewinnung

Die Probengewinnung erfolgte durch venöse Blutentnahme in der Ellenbeuge in der nephrologischen Ambulanz oder der Dialyseabteilung der Klinik für Innere Medizin IV. Gesunde Probanden wurden aus Mitarbeitern des Universitätsklinikums rekrutiert. Nach Aufklärung und Einwilligung der Probanden zur Teilnahme an der Studie wurden insgesamt 99 ml venösen Blutes in 9 ml EDTA-Monovetten und Serum-Monovetten entnommen. Weiterhin wurden 50 ml Urin des Patienten in Monovetten asserviert.

2.2.1. Studiendesign

Zunächst wurden Peripheral Blood Mononuclear cells (PBMC) aus dem Vollbut der Probanden isoliert. Anschließend wurde durchflusszytometrisch die Expression von IL-1 α auf der Zelloberfläche der verschiedenen Monozytenpopulationen gemessen. In einem weiteren Schritt wurden die PBMCs kultiviert, durch Adhärenzkultur Monozyten gewonnen und diese mit bekannten Aktivatoren der IL-1 α Freisetzung stimuliert. Anschließend wurde die Konzentration von IL-1 α im Zellkultur-Überstand mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) quantifiziert.

2.2.5. Isolation von PBMC

Ein Standardverfahren zur Isolation von PBMCs stellt die Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation dar. Hierbei nutzt man die geringere Dichte der Monozyten gegenüber weiteren Bestandteilen des Blutes (z.B. Erythrozyten, Granulozyten), um sie von diesen zu trennen. Das Trennmedium wird durch das Lösen von Ficoll 400 und Natriumdiatrizoat auf eine Dichte von 1,077 g/ml angesetzt. Ficoll 400 besteht aus einem gelösten Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer, welches durch seine hohe Molekülmasse von 400 kDa kaum osmotisch wirksam ist und somit optimale Eigenschaften für die Dichtegradientenzentrifugation bietet. In der Phase der PBMCs verbleiben neben den Monozyten allerdings auch Thrombozyten und einzelne Erythrozyten. Die Thrombozyten können im Anschluss durch Waschschrte entfernt werden und die Erythrozyten werden durch eine osmotische Hämolyse mittels Ammoniumchlorid entfernt. Ausgangsmaterial waren 18 ml Blut der Probanden, welches mit EDTA zur Gerinnungshemmung versetzt wurde. Dieses wurde mit 18 ml PBS (0,5 M EDTA) gemischt und in ein 50 ml Falcon überführt. Anschließend wurden zwei weitere 50 ml Falcons mit jeweils 15 ml des Ficoll-Mediums bereitgestellt. Auf diese wurde nun vorsichtig das Blut-PBS-Gemisch geschichtet. Wichtig war hier, dass sich eine möglichst klare Trennschicht zwischen dem Ficoll-Medium und dem Blut-PBS-Gemisch bildete und es nicht zur Vermischung der beiden Phasen kommt.

Im nächsten Schritt wurden die beiden Falcons bei 400 G für 30 min bei 20 °C zentrifugiert. Hierbei war darauf zu achten, dass ohne Bremse zentrifugiert wurde, da sich ansonsten die getrennten Schichten beim Abbremsen vermischen. Alle weiteren Zentrifugationsschritte konnten mit Bremse durchgeführt werden. Die Schichtung der Zellen zeigt Abbildung 1.

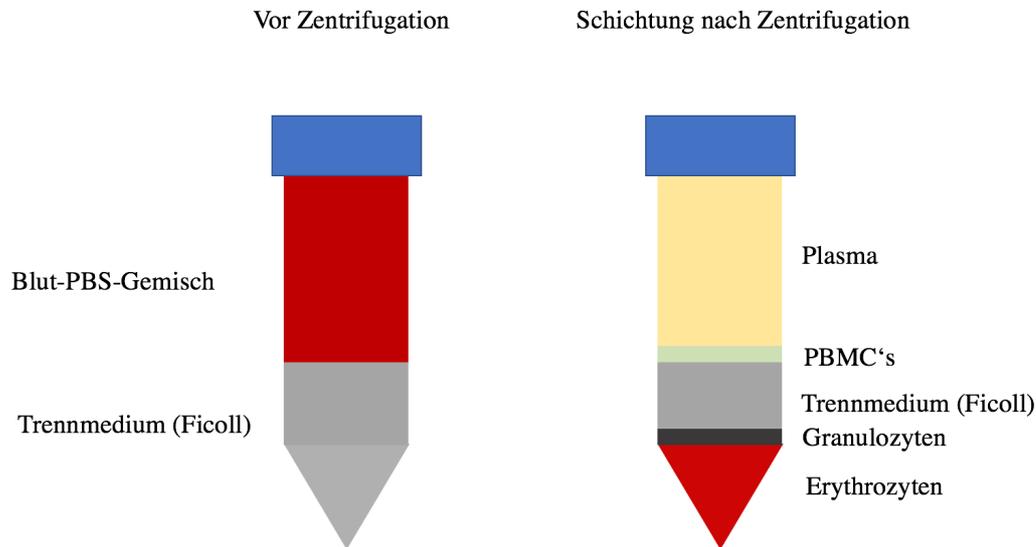


Abbildung 1 Die Schichtung der Zellen vor und nach Zentrifugation

Nun wurde die Schicht der PBMCs mit einer 10 ml Spritze und einer 20 G Kanüle vorsichtig abgenommen und in ein 50 ml Falcon überführt. Wichtig war dabei, die Schicht sehr genau zu entnehmen und möglichst kein Ficoll mit abzunehmen, da dieses zytotoxisch ist. Das Falcon wurde mit PBS/EDTA aufgefüllt und bei 400 G für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Es bildete sich ein Zellpellet am Boden des Falcon. Der Überstand über dem Zellpellet wurde abgesaugt, das Zellpellet in 2,5 ml PBS/EDTA resuspendiert und in ein 15 ml Falcon überführt, welches mit PBS/EDTA aufgefüllt wurde. Dieses Falcon wurde mit 300 G für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 2 ml PBS resuspendiert. Hierzu wurden 6 ml Ammoniumchloridlösung gegeben und es wurde für 10 min bei 4 °C zur Lyse der Erythrozyten inkubiert. Im Anschluss wurde das Falcon bei 400 G für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Mithilfe einer Neubauerzählkammer (Abb. 2) wurde die Anzahl der PBMCs im Zellkulturmedium bestimmt. Hierzu wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau (4%) vermischt. Das Trypanblau hat die Eigenschaft tote Zellen anzufärben, da bei diesen die Integrität der Zellmembran defekt ist. Vitale Zellen werden hingegen nicht angefärbt und erscheinen hell unter dem Lichtmikroskop.

Von dieser Zellsuspension-Trypanblaugemisch wurden nun 10 μl in die Zählkammer gegeben und unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

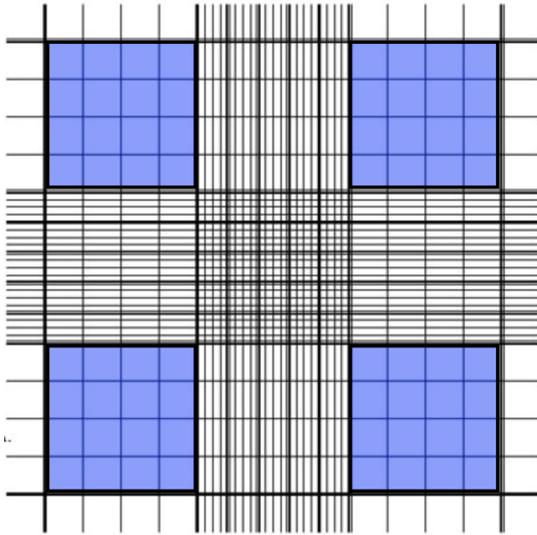


Abbildung 2 Der Aufbau einer Neubauer-Zählkammer: Zur Zählung der PBMCs werden die 1x1 mm breiten und 0,1 mm tiefen blauen Quadrate ausgezählt.

Das Prinzip der Neubauerzählkammer besteht darin, dass die grauen Quadranten genau 1 mm lang und breit und 0,1 mm tief sind. Somit ergibt sich ein Volumen von 0,1 μl pro Quadrant. Es werden alle vier blauen Quadranten ausgezählt und der Mittelwert ermittelt. Durch die vorherige Verdünnung erhält man anschließend durch Multiplikation mit dem Faktor 10^4 die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension. Von diesen Zellen wurden je 200.000 Zellen auf 12 Wells einer 96 Well-Platte ausgesät. Hierfür wurden 3,2 Millionen Zellen aus der Zellsuspension entnommen und mit Zellkulturmedium auf 3,2 ml aufgefüllt, sodass die Zellen pro Well in 0,2 ml Nährmedium inkubierten. Anschließend wurden 2 Millionen Zellen der Zellsuspension zur durchflusszytometrischen Analyse in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

2.2.6. Zellkultur

Die in den 96 Well Platten ausgesäten Zellen wurden für eine Stunde bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. In dieser Zeit adhärten die Monozyten am Boden der Platte. Anschließend wurde das Medium über der Platte vorsichtig entnommen und durch neues RPMI-Vollmedium ersetzt. Die Reinheit der so gewonnenen Monozyten beträgt ca. 97 %. Durch diesen Mediumwechsel wurden tote Monozyten, welche nicht adhärten, sowie andere Zellen, welche zuvor in der Isolation nicht vollständig entfernt wurden, beseitigt.

Im nächsten Schritt wurden die Monozyten über Nacht im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ im Zellkulturmedium inkubiert. Das Vollmedium besteht hierbei aus RPMI-1640 GlutaMAX™, einem etablierten Kulturmedium welches aus einem Hydrogencarbonat-Puffer sowie einer Kombination von Glukose, Salzen, Aminosäuren und Vitaminen besteht. Zusätzlich wurden diesem 10% fetales bovines Serumalbumin (FBS) zugesetzt, welches diverse Wachstumsfaktoren bereitstellt sowie 1% einer Antibiotikakombination aus Penicillin und Streptomycin, um das Wachstum von Pilzen und Bakterien zu verhindern.

2.2.7. Gewinnung von Monozyten und Stimulation

Nach Inkubation der Zellen in Vollmedium über Nacht, wurde am folgenden Tag das Vollmedium durch Opti-MEM Medium ersetzt. Über diesen Schritt wurden die Monozyten in ihrem Wachstum arretiert. Außerdem wurde das FBS entfernt, welches bei der späteren Analyse mittels ELISA zu einem starken unspezifischen Signal und einer ungenauen Messung führen würde. Die Anordnung der Proben ist in Abbildung 3 dargestellt.

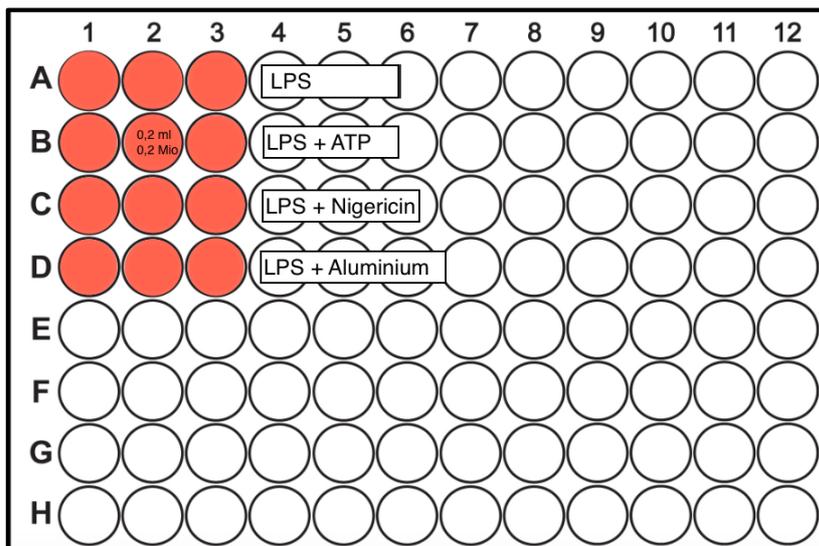


Abbildung 3 Aufbau der Zellkultur: Pro Well befinden sich 2 Millionen Zellen in 0,2 ml Zellkulturmedium. In jeder Zeile sind die jeweiligen Stimulantien aufgeführt.

Nach dem Mediumwechsel erfolgte zunächst eine Stimulation der Zellen mit dem TLR4-Liganden LPS (10 ng/ml, 4 hr) und im Anschluss eine Stimulation der Zellen mit ATP (5 mM, 1hr), Nigericin (1 μM, 1hr) sowie Aluminium-Kristallen (200 μg/ml, 3 hr). Nach Ende der Stimulationszeit wurde die 96 Well Platte bei 400 G für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde vorsichtig der Überstand abgenommen, in 1,5 ml Eppendorf-Tubes überführt und bei -80°C bis zur IL-1α Messung mittels ELISA asserviert.

2.2.8. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist in seinen verschiedenen Varianten die derzeit am häufigsten verwendete Methode zur quantitativen Analyse von Proteinen. Das Prinzip des Sandwich-ELISA besteht darin, einen Antikörper, welcher an einen gesuchten Stoff bindet, mit seinem Fc-Teil auf eine Platte zu binden und anschließend mit einem zweiten gegen das Antigen gerichteten Antikörper, welcher an ein Enzym gebunden ist, eine Farbreaktion auszulösen. Diese kann dann photometrisch detektiert und mittels einer Standardreihe mit bekannten Konzentrationen des gesuchten Stoffes quantitativ ausgewertet werden. Abbildung 4 zeigt diesen Ablauf.

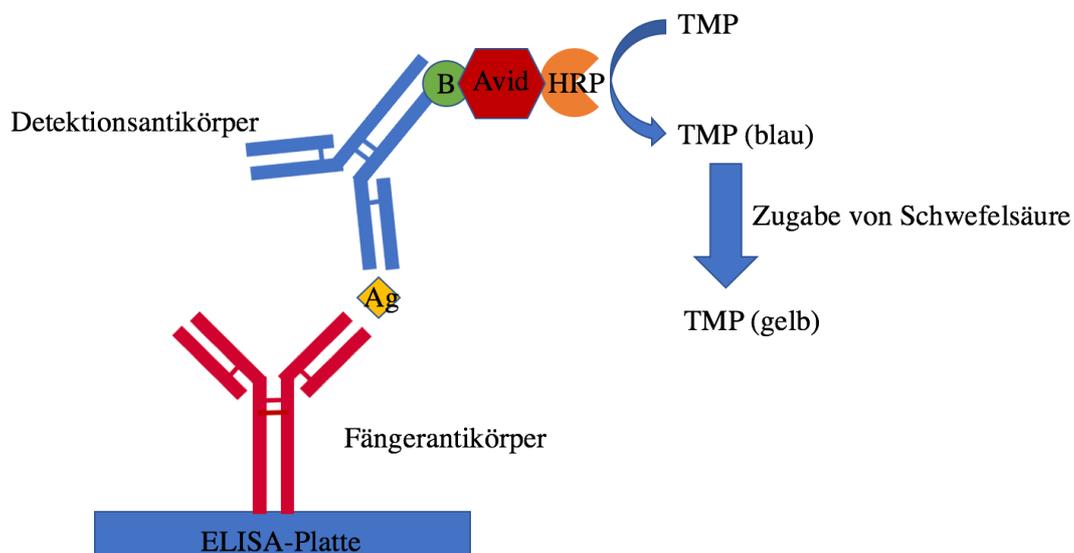


Abbildung 4 Versuchsablauf des Sandwich-ELISA: Die Platte ist mit einem Fängerantikörper beschichtet, welcher das gesuchte Antigen bindet. An diesen bindet ein biotinylierter Detektionsantikörper, welcher über Biotin an Avidin-HRP bindet. Die Meerrettichperoxidase (HRP) führt durch Zugabe eines Substrates zu einer Farbreaktion, welche photometrisch quantifiziert wird.

Zum Nachweis des von den Monozyten sezernierten $IL-1\alpha$ wurde das Human-IL-1 α ELISA MAXTM Deluxe Set verwendet. Zunächst wurde eine ELISA 96 Well Platte mit 50 μ l/Well der Fixationsantikörperlösung beschichtet, mit Parafolien versiegelt und über Nacht bei 4° C im Kühlschrank inkubiert. Die Antikörper binden bei diesem Vorgang, welcher auch als Coating bezeichnet wird, mit ihrem Fc-Teil an die Polystyrolmoleküle des Plattenbodens. Am nächsten Tag wurde die Platte viermal mit Waschlösung gewaschen, um nicht-gebundene Antikörper zu entfernen. Bei allen Waschschrritten war darauf zu achten ausreichend Waschlösung zu verwenden (mindestens 300 μ l/Well) und diesen vor dem nächsten Waschschrtritt komplett zu entfernen.

Anschließend wurden auf jedes Well 100 µl des Assay Diluent gegeben, die Platte mit Parafilm versiegelt und eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Durch BSA, welches im Assay Diluent enthalten ist, werden freie unspezifische Proteinbindungsstellen geblockt und somit verhindert, dass an diese im Verlauf Detektionsantikörper binden und ein unspezifisches Hintergrundsignal verursachen. Während dieser Inkubationszeit konnten die Standards und die Proben vorbereitet werden. Es wurde eine Standardreihe mit der höchsten Konzentration von 250 pg/ml durch Zugabe von 5,88 µl Standardlösung (42,5 ng/ml) zu 994,12 µl Assay Diluent angesetzt und anschließend immer auf die Hälfte verdünnt. So ergab sich eine Konzentrationsreihe von 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml, 15,6 pg/ml, 7,8 pg/ml, 3,9 pg/ml und 0 pg/ml IL-1 α . Die Konzentration von 0 pg/ml enthält Assay Diluent ohne Standardlösung. Nach dem Blocking erfolgten vier weitere Waschschrte der ELISA-Platte mit dem angesetzten Waschpuffer. Die Proben wurden vor Auftragen auf die Platte nochmals auf einem Vortexgerät gemischt. Pro Well wurden nun 50 µl der Verdünnungsreihe des Standards und der Proben aufgetragen, die Platte mit Parafilm versiegelt und zwei Stunden auf dem Schüttler inkubiert. Es folgten erneut vier Waschschrte, um ungebundenes Protein zu entfernen. Anschließend wurden auf jedes Well 50 µl der Detektionsantikörperlösung gegeben und die versiegelte Platte für eine weitere Stunde auf einem Schüttler inkubiert. Wieder folgten vier Waschschrte, bevor 50 µl der Avidin-HRP-Lösung auf jedes Well gegeben und die Platte für 30 min auf dem Schüttler inkubiert wurde. Avidin hat eine hohe Affinität zu Biotin und wird darüber an den biotinylierten Fc-Teil des Detektionsantikörpers gebunden. Es wird in einem Komplex mit der Meerrettichperoxidase (HRP) hinzugegeben, welche als Enzym die spätere Farbreaktion katalysiert. Nach Inkubation mit Avidin-HRP wurden die Wells fünfmal mit Waschpuffer gewaschen. Nun wurden pro Well 50 µl der Substratlösung F hinzugegeben und die Platte für 20 Minuten im Dunkeln auf einem Schüttler inkubiert. Die Substratlösung enthält Tetramethylbenzidin (TMB), welches durch Reaktion mit der Meerrettichperoxidase oxidiert wird und eine blaue Farbreaktion eingeht. Im letzten Schritt wurden 25 µl Schwefelsäure pro Well hinzugegeben, um die Reaktion zu stoppen, wobei sich TMB gelb färbt. Nun kann photometrisch die Adsorption bei 450 nm und 570 nm gemessen und so im Vergleich zur Standardreihe quantitativ die IL-1 α Konzentration im Zellkulturüberstand bestimmt werden.

2.2.9. Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie ist eine weit verbreitete Methode zur Untersuchung und Charakterisierung von Zellen. Das Prinzip ist dabei, dass die Zellen in einer Trägerflüssigkeit in einem laminaren Strom durch eine Küvette fließen, wobei diese so dünn ist, dass sich die Zellen hintereinander aufreihen. Der Aufbau eines Durchflusszytometers ist in Abbildung 5 schematisch gezeigt.

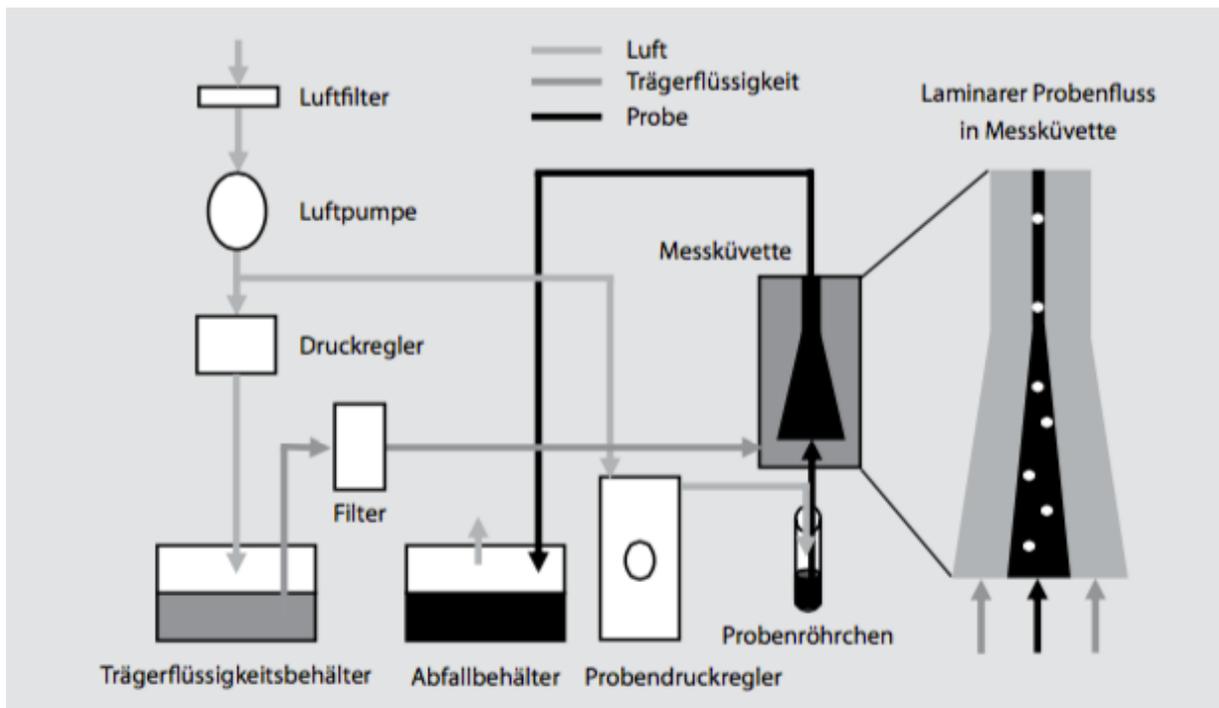


Abbildung 5 Aufbau eines Durchflusszytometers. Über den Probendruckregler wird Trägerflüssigkeit unter Druck durch die Messküvette getrieben und durch Luftdruck im Probenröhrchen wird die Probe ebenfalls in die Messküvette gedrückt, wo sie von der Trägerflüssigkeit aufgenommen wird und sich die Zellen in einem laminaren Strom aufreihen. (aus: Der Experimentator – Immunologie)

Beim Durchlaufen der Küvette passieren die Zellen einen Laser. Hinter dem Laser befinden sich zwei Detektoren, die das Streulicht und das reflektierte Licht auffangen.

Der Forward Scatter (FSC) misst dabei das Seitwärtsstreulicht, welches an der Zelle vorbeistrahlt und gibt Informationen über die Größe der Zelle. Im Winkel von 90° zum FSC befindet sich der Side Scatter (SSC) für das Seitwärtsstreulicht. Dieses lässt Schlüsse über die Granularität der Zelle zu. Diese beiden Zellcharakteristika bilden die Basis der Analyse durch die Durchflusszytometrie. Zusätzlich können bestimmte Proteine der Zelle mit Antikörpern markiert werden, welche ein bestimmtes Fluorochrom tragen.

Das Fluorochrom wird beim Durchlaufen des Lasers angeregt und emittiert Strahlung einer gewissen Wellenlänge, welche detektiert wird. Daraus kann auf die Expression des markierten Proteins auf der Zelloberfläche geschlossen werden. Da es verschiedene Fluorochrome gibt, welche Licht mit unterschiedlichen Wellenlängen emittieren, ist es möglich, in einer Analyse verschiedene Antigene auf der Oberfläche der Zellen zu markieren und zu quantifizieren. Hierzu werden teildurchlässige Spiegel und verschiedenen Filter eingebaut, um das Licht der gewünschten Wellenlänge vor dem Detektor zu isolieren. Außerdem ist es zusätzlich möglich, durch Verwendung verschiedener Laser die Bandbreite an Fluorochromen, welche angeregt werden können, zu erhöhen und damit weitere Marker in einer Messung verwenden zu können. Einen schematischen Aufbau der Optik zeigt Abbildung 6.

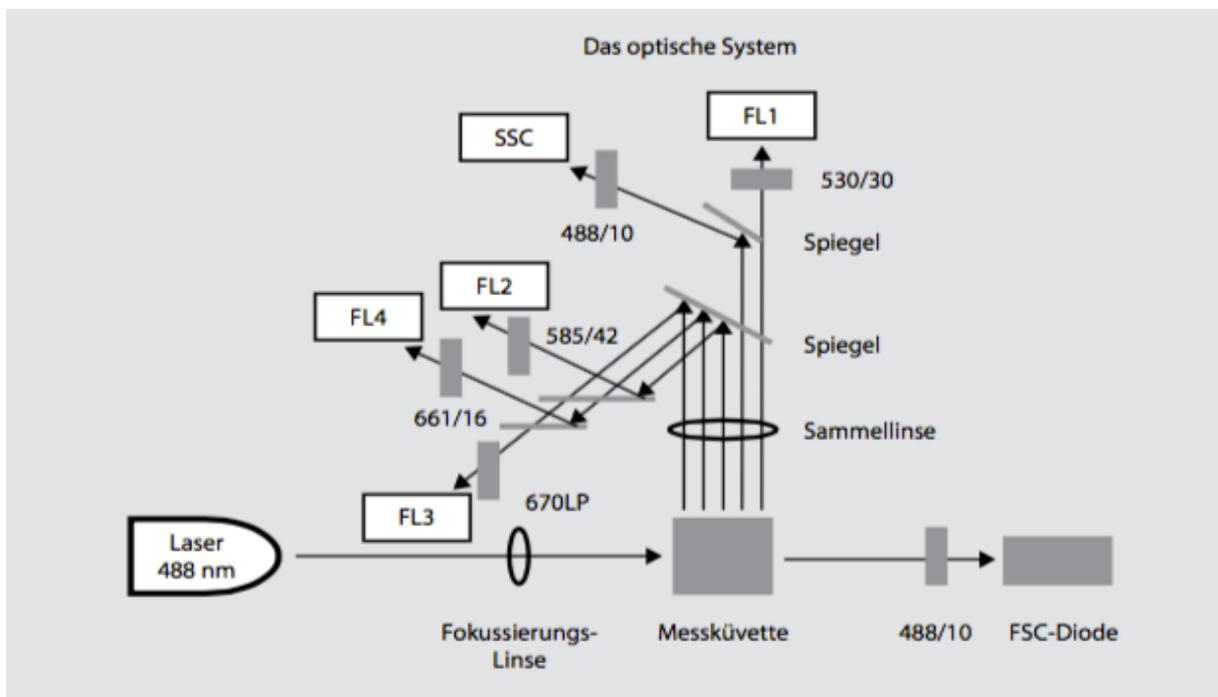


Abbildung 6 Schematischer Aufbau der Optik: Die Zellen werden beim Passieren der Messküvette durch den Laser bestrahlt. Über den FSC und SSC können Zellgröße und Granularität bestimmt werden. Durch Markierung der Zelle mit Fluorochromen lassen sich verschiedene Oberflächenproteine der Zelle markieren und durch teildurchlässige Spiegel und Filter die Signale isoliert detektieren (FL1-4). (aus: Der Experimentator – Immunologie)

Ausgangsmaterial für die Messung von IL-1 α waren zwei Millionen PBMCs, welche aus dem Blut der Probanden isoliert wurden. Von diesen wurden je eine Million in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend für 45 min bei 4°C mit den Antikörpern für CD14 (0,75 μ g/ml), CD16 (1 μ g/ml) und IL-1 α (10 μ g/ml) bzw. Mouse IgG1 kappa Isotyp Kontrolle (10 μ g/ml) inkubiert. Hierzu gab man 50 μ l des FACS-Färbepuffers zu einer Probe.

Die zweite Probe wurde als Kontrolle nicht gefärbt und währenddessen bei 4°C in FACS-Puffer gelagert. Anschließend wurden die Zellen erneut für 5 min mit FACS-Puffer gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wurden 300 µl Formaldehyd pro Röhrchen hinzugegeben und für 20 min bei 4°C inkubiert. Hierbei sollten die Proben regelmäßig gemischt werden. Im Anschluss folgte ein weiterer Waschschritt mit FACS-Puffer für 5 min und die Zellen wurden in 300 µl FACS-Puffer bei 4°C bis zur Messung aufbewahrt. Die Messung erfolgte hierbei jeweils innerhalb von maximal zwei Tagen nach der Färbung. Die Messung wurde mit dem Durchflusszytometer FACS CantoII durchgeführt. Hierbei wurde die Mean fluorescence intensity (MFI) der gefärbten Probe im Vergleich zur ungefärbten Kontrolle gemessen.

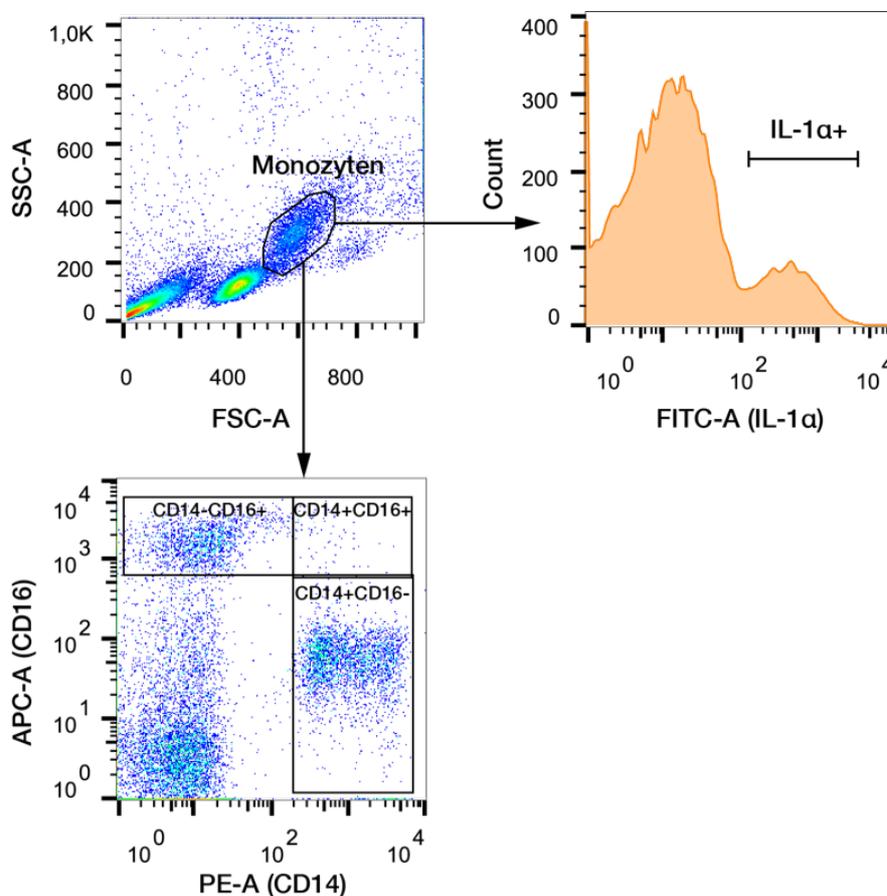


Abbildung 7 Analyse der FACS-Messung.

Man erhält - wie in Abbildung 7 oben links gezeigt - eine Darstellung der gemessenen Events. Jeder Punkt entspricht einem Event, also einem Partikel, welcher den Laser passiert hat. Sie sind nach Größe (FSC) und Granularität (SSC) aufgeteilt. Das Gate wurde nun so gelegt, dass möglichst nur Events, welche den Charakteristika von Monozyten entsprechen, ausgewählt sind.

Anschließend wurden die ausgewählten Zellen anhand der gemessenen Fluoreszenz für die Oberflächenmarker CD14 und CD16 charakterisiert und anhand dieser Merkmale in die Subpopulationen eingeteilt (Abbildung 7 unten). Weiterhin wurden die Events des Gates entsprechend ihrer Oberflächenmarkierung mit IL-1 α -FITC charakterisiert (Abbildung 7 oben rechts).

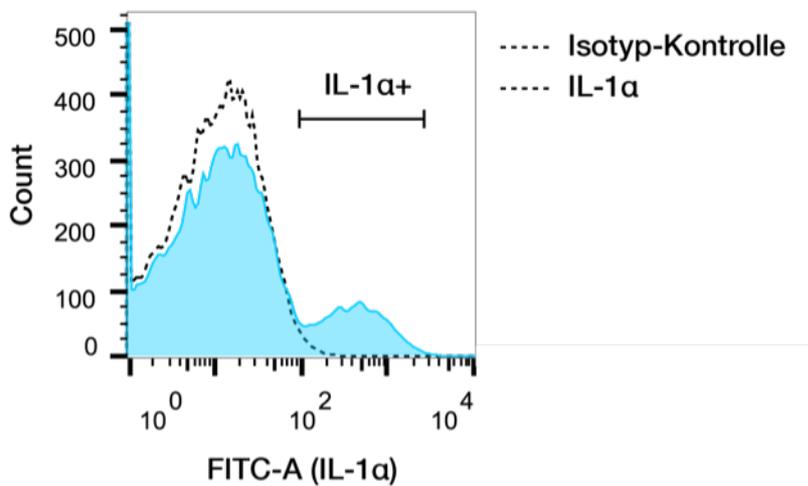


Abbildung 8 Isotypenkontrolle zur Bestimmung der unspezifischen Bindungen

Da die Fluoreszenz-markierten Antikörper neben der spezifischen Bindung mit ihrem Fab-Teil an IL-1 α auch mit ihrem Fc-Teil unspezifisch an die Zelloberfläche binden können, wurde zudem eine Isotyp-Kontrolle durchgeführt. Um unspezifische Bindungen zu detektieren, wurde die Probe mit einem Antikörper desselben Isotyps gefärbt, welcher jedoch nicht an IL-1 α bindet. Hierbei konnte - wie in Abbildung 8 dargestellt - eine unspezifische Antikörper-Bindung an die Monozyten ausgeschlossen werden.

4.2.10 Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm IBM SPSS Statistics 24 durchgeführt. Zur graphischen Darstellung wurden GraphPad Prism und Microsoft Excel 2016 verwendet. Kontinuierliche Variablen der Patientencharakteristika wurden als Mittelwerte mit einer Standardabweichung und kategoriale Variablen als prozentuale Verteilung angegeben. Patientencharakteristika wurden mittels Fisher-Exact Test für kategoriale Variablen oder One-Way ANOVA Test für kontinuierliche Variablen verglichen. Messwerte der Durchfluscytometrie sowie ELISA wurden als Dot Plots dargestellt. Der horizontale Strich gibt den Mittelwert, die Whiskers den Standard Error of the Mean (SEM) an. Statistische Unterschiede wurden mittels One-Way ANOVA sowie Dunnet's Post-hoc Test untersucht. Ein Signifikanzniveau von $P < 0.05$ wurde als statistisch signifikant angenommen. Weiterhin wurden folgende Symbole definiert: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Studiengruppe

3.1.1. Rekrutierungsschema

In die Studie wurden im Zeitraum vom 01.09.2013 bis zum 01.03.2016 insgesamt 267 Probanden eingeschlossen. Diese wurden nach den im Abschnitt Methodik beschriebenen Kriterien in die Studiengruppen eingeteilt. Abbildung 9 zeigt das Rekrutierungsschema.

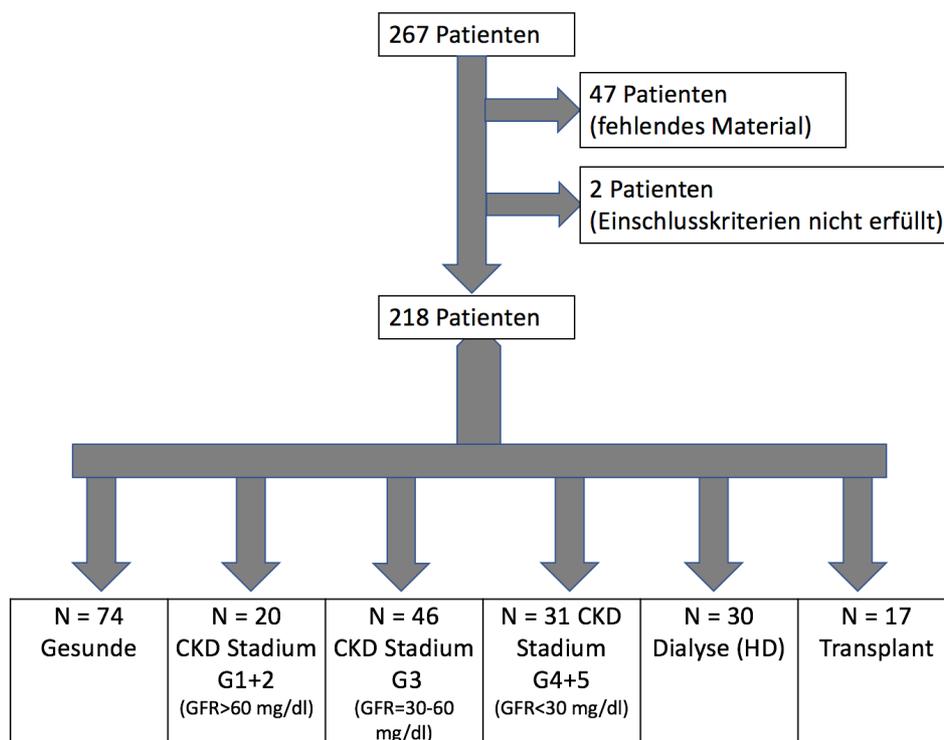


Abbildung 9 Rekrutierungsschema.

Von den rekrutierten Patienten wurden 47 ausgeschlossen, da an dem Tag der Rekrutierung keine Isolation von Monozyten durchgeführt werden konnte. Hier wurden lediglich Serumproben für künftige Analysen asserviert. Weitere zwei Patienten wurden nachträglich ausgeschlossen, da sie Einschlusskriterien der Gruppe der gesunden Probanden nicht erfüllten. In beiden Fällen lag ein Diabetes mellitus vor.

3.1.2. Grunderkrankungen, Begleiterkrankungen und Risikofaktoren

Von Bedeutung zur Charakterisierung der Studiengruppen sind die Grund- und Begleiterkrankungen der Niereninsuffizienz sowie die Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen, welche bei den Patienten der jeweiligen Gruppe vorlagen. Die Grunderkrankungen wurden in die vier Kategorien diabetische Nephropathie, vaskuläre Nephropathie, Glomerulonephritis, und Sonstige eingeteilt, wobei teilweise bei einem Patienten auch gleichzeitig mehr als eine Grunderkrankung vorhanden sein konnte. In die Kategorie ‚Sonstige‘ wurden alle Grunderkrankungen eingeteilt, welche nicht einer der anderen Kategorien zuzuordnen waren. Beispiele für sonstige Grunderkrankungen sind Nephrolithiasis, Schrumpfnieren, Autosomale Polyzystische Nierenerkrankungen oder die Schädigung nach akutem Nierenversagen. Die Verteilung der Grunderkrankungen in den einzelnen Patientengruppen ist in Abbildung 10 dargestellt.

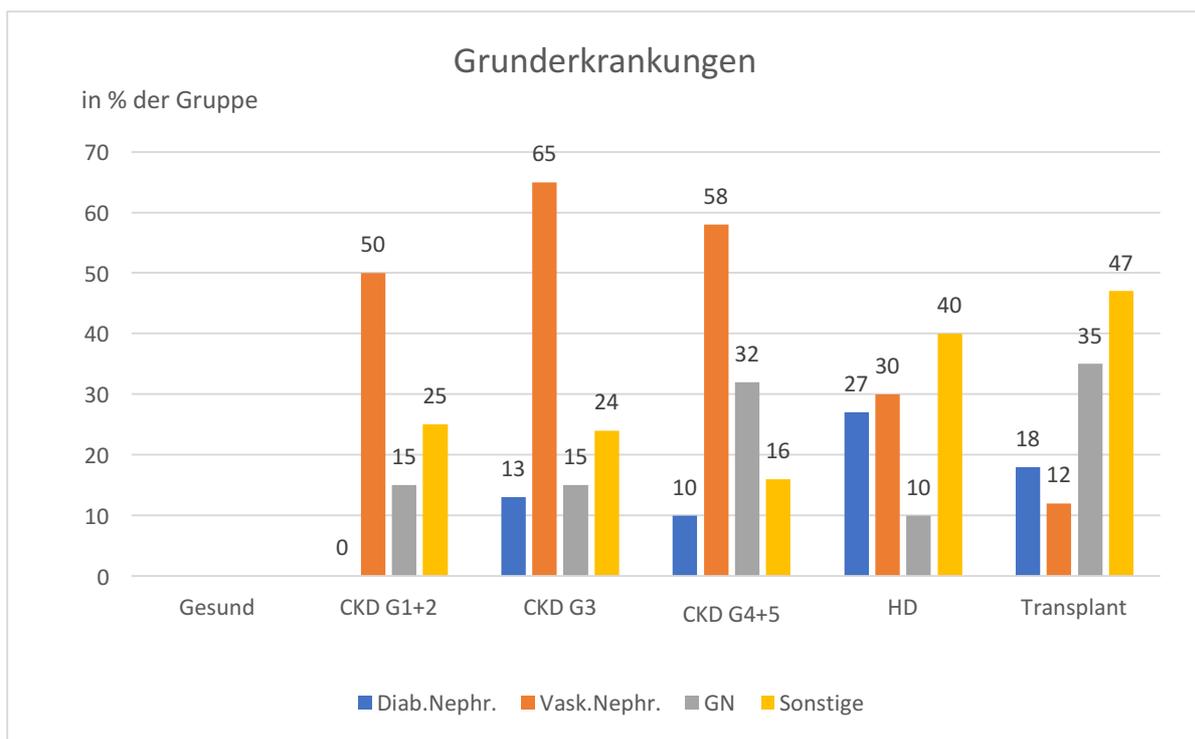


Abbildung 10 Grunderkrankungen in den Studiengruppen

Es zeigte sich ein typisches Verteilungsbild von Grunderkrankungen, welche in der westlichen Welt zur chronischen Niereninsuffizienz führen. Die häufigste Grunderkrankung in den Gruppen der Nierenkranken war die vaskuläre Nephropathie, welche bei bis zu 65% der Patienten vorkam.

Die diabetische Nephropathie war hingegen nur bei 13% der Patienten im Stadium G3 ursächlich und in den weiteren Gruppen noch seltener. In den Gruppen 'HD' und 'Transplant' bildeten die sonstigen Erkrankungen mit 40% und 47% den größten. Glomerulonephritiden kamen vor allem in den Gruppen 'CKD G4+5' und 'Transplant' vor.

Weiterhin wurde neben den Grunderkrankungen auch das Vorliegen typischer Begleiterkrankungen der chronischen Nierenerkrankung erfasst. Diese sind in Abbildung 11 dargestellt.

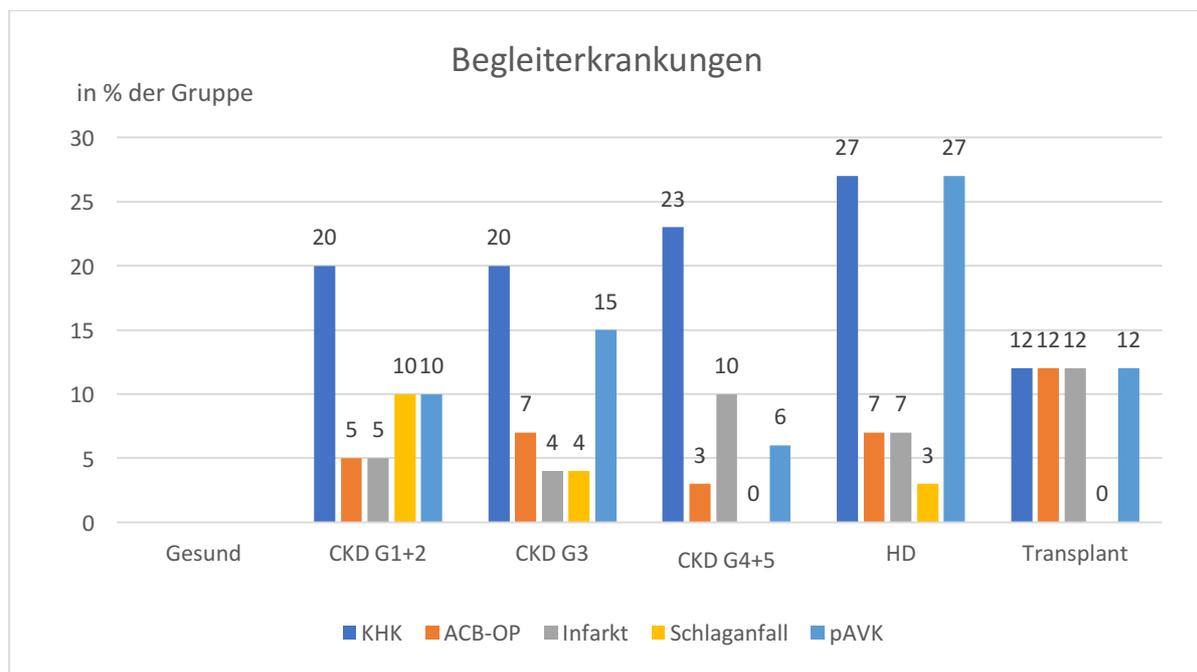


Abbildung 11 Begleiterkrankungen in den Studiengruppen

Die bei den Patienten am häufigsten vorkommende Erkrankung war die koronare Herzerkrankung (KHK). In der Gruppe 'HD' litten 27% der Patienten an einer KHK, wohingegen in der Gruppe 'Transplant' nur 12% diese Begleiterkrankung aufwiesen. Eine weitere Begleiterkrankung, welche häufig bei chronisch Nierenkranken vorkommt, ist die peripher arterielle Verschlusskrankheit (pAVK). In der Gruppe der Dialysepatienten waren 27% der Patienten an einer pAVK erkrankt. In den anderen Gruppen kam diese Erkrankung hingegen seltener vor. Ein geringer Anteil der Patienten hatte sich bereits einer Aortokoronaren Bypass-OP unterzogen oder einen Herzinfarkt erlitten. Auch der Schlaganfall war eine im Vergleich zur pAVK und der KHK deutlich seltenere Begleiterkrankung.

Weiterhin wurden auch die wichtigsten Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen erfasst. Deren Vorkommen in den Studiengruppen ist in Abbildung 12 gezeigt.

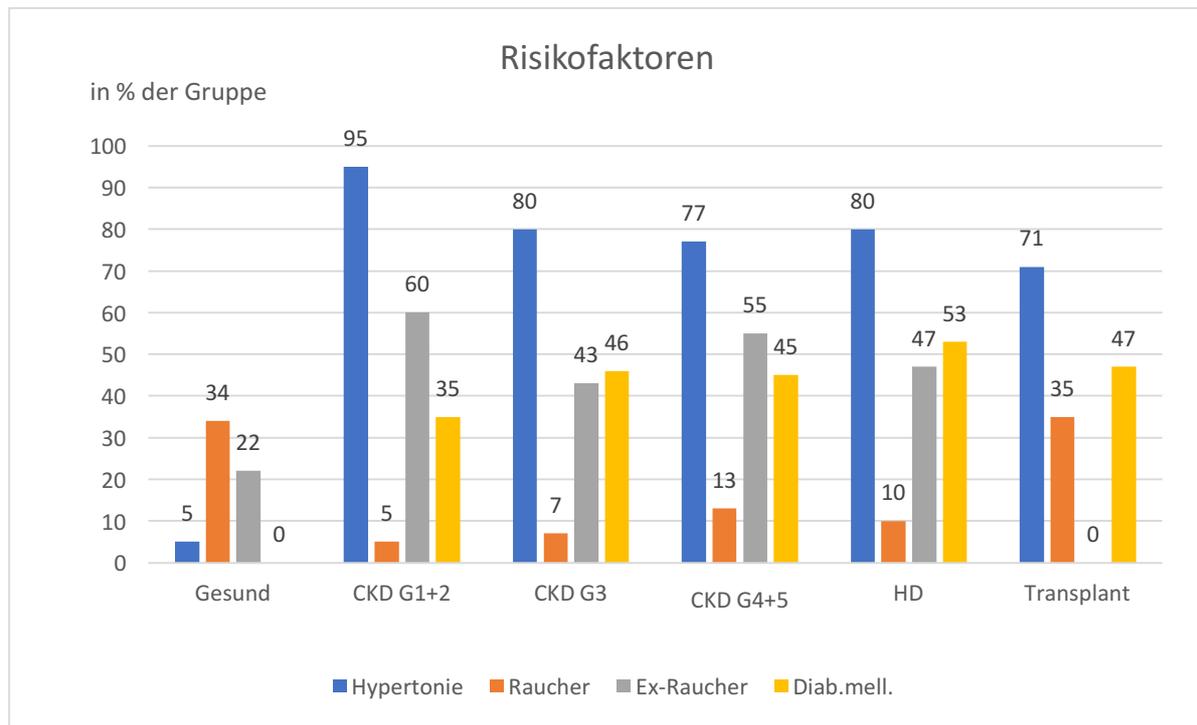


Abbildung 12 Risikofaktoren in den Studiengruppen

Der am Häufigsten vorkommende Risikofaktor war die arterielle Hypertonie. Bei 95% der Patienten in der Gruppe 'CKD G1+2' lag dieser Risikofaktor vor und auch in den anderen Gruppen wiesen zwischen 71% und 80% der Patienten einen arteriellen Hypertonus auf. Ebenfalls ein häufiger Risikofaktor war der Nikotinkonsum. 34% der Gesunden waren Raucher und weitere 22% ehemalige Raucher. In den Gruppen der Nierenkranken überwog der Anteil der ehemaligen Raucher welcher zwischen 43% in der Gruppe 'CKD G3' und 60% in der Gruppe 'CKD G1+2' lag. Auch der Diabetes mellitus als Begleiterkrankung stellt einen Risikofaktor für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen und einer chronischen Nierenerkrankung dar. In der Gruppe der Gesunden waren nach der Definition keine an Diabetes mellitus Erkrankten eingeschlossen. In den weiteren Gruppen lag der Anteil zwischen 35% in der Gruppe CKD G1+G2 und 53% in der Gruppe 'HD'.

3.1.3. Anthropometrische Charakteristika

Zum Vergleich der Gruppen untereinander wurden anthropometrische Messwerte zum Zeitpunkt der Probenentnahme erfasst. Die Patienten hatten ein Durchschnittsalter von 65.8 ± 12.1 Jahren. Insgesamt waren 77 % der Probanden männlich. In der Gruppe der Gesunden überwog der Anteil der Frauen mit 70 %. In den anderen Gruppen hingegen war der Anteil der Männer zwischen 63 % in der Gruppe 'HD' und 80 % im Stadium CKD G1+G2 durchgehend höher als der weibliche Anteil.

Der BMI der Patienten mit chronischer Nierenerkrankung lag über dem der gesunden Probanden während die Gruppen 'HD' und 'Transplant' einen niedrigeren BMI aufwiesen.

Die durchschnittliche Herzfrequenz lag bei 71 ± 12 Schlägen/min und es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Beim Blutdruck wiederum zeigten sich deutliche Gruppenunterschiede. Die Werte für den systolischen Blutdruck lagen im Mittel bei 142 ± 22 mmHg und für den diastolischen Blutdruck bei 81 ± 13 mmHg. Vor allem in der Gruppe 'HD' lagen sowohl systolischer als auch diastolischer Blutdruck niedriger als in den anderen Gruppen und auch bei den gesunden Probanden war der systolische Blutdruck mit im Mittel 131 ± 19 mmHg deutlich niedriger als in den Gruppen der Stadien G1 bis G5 und 'Transplant'. Tabelle 8 zeigt gibt einen Überblick über die erfassten anthropometrischen Daten der jeweiligen Gruppe als Mittelwert mit Standardabweichung.

	Gesund (N=74)	CKD G1+G2 (N=20)	CKD G3 (N=46)	CKD G4+G5 (N=31)	HD (N=30)	Transplant (N=17)	P
Alter (Jahre)	59,4±12,5	60,2±13,5	64,0±9,7	68,9±7,5	67,3±14,0	54,5±13,6	<0.001
Geschlecht (% Männlich)	30	80	65	71	63	76	0.001
Größe (cm)	170 ± 10	172 ± 8	168 ± 9	168 ± 8	169 ± 9	168 ± 10	0.319
Gewicht (kg)	76 ± 18	93 ± 22	91 ± 21	84 ± 16	79 ± 19	77 ± 20	<0.001
BMI (kg/m²)	26 ± 5	31 ± 6	32 ± 7	30 ± 5	26 ± 7	27 ± 6	<0.001
RR systolisch (mmHg)	131 ± 19	150 ± 22	145 ± 20	154 ± 25	134 ± 22	145 ± 25	<0.001
RR diastolisch (mmHg)	84 ± 13	87 ± 14	82 ± 10	82 ± 13	67 ± 13	86 ± 16	<0.001
Herzfrequenz (1/min)	74 ± 11	70 ± 13	67 ± 11	74 ± 13	71 ± 11	68 ± 11	0.118

Tabelle 8 Anthropometrische Charakteristika der Studiengruppen. Dargestellt sind Mittelwert +/- SD oder % der Gruppe

3.1.4. Nierenfunktion

Zur Bestimmung der eGFR in den Gruppen wurden die Parameter Kreatinin und Cystatin C bestimmt und die eGFR anhand der CKD-EPI Formeln nach KDIGO 2012 abgeschätzt (1). In der Gruppe 'HD' erfolgte keine Bestimmung der eGFR. Bei den Gesunden lag die durchschnittliche eGFR mit 95 ± 17 ml/min/1,73m² KÖF im Normbereich. Mit zunehmendem Stadium der CKD von G1 bis G5 nahm die eGFR immer weiter ab und lag in der Gruppe 'CKD G4+5' im Durchschnitt bei 20 ± 5 ml/min/1,73m² KÖF. Bei den Nierentransplantierten lag die eGFR der Spenderniere im Mittel bei 46 ± 16 ml/min/1,73m² KÖF und somit im Bereich eines Stadiums G3a nach KDIGO. Zur weiteren Charakterisierung der Nierenfunktion und als Prognosemarker für das Fortschreiten der CKD wurde Albumin im Urin bestimmt und die ACR berechnet. In der Gruppe der Dialysepatienten (HD) ist die Bestimmung der ACR nicht sinnvoll, da bei den meisten Patienten keine Restdiurese mehr vorhanden ist, und wurde deshalb nicht durchgeführt. In der Gruppe der gesunden Probanden lag keine Albuminurie vor und alle Probanden waren in Stadium A1 zu verordnen. Schon in Gruppe 'CKD G1+2' lag bei 55% der Patienten ein Stadium A2 (30-300 mg Albumin/g Kreatinin) vor und mit weiterer Zunahme des Stadiums der Nierenerkrankung zeigte sich eine Zunahme der Albuminurie und des Anteils der Patienten in Stadium A3 (>300 mg Albumin/g Kreatinin). In der Gruppe 'CKD G4+5' war der Anteil der Patienten im Stadium A3 mit 45% am höchsten.

Die erfassten Parameter der Nierenfunktion sind in Tabelle 9 dargestellt.

	Gesund (N=74)	CKD G1+2 (N=20)	CKD G3 (N=46)	CKD G4+5 (N=31)	Transplant (N=17)	P
Kreatinin (mg/dl)	0,8 ± 0,2	1,1 ± 0,3	2,7 ± 8,2	2,8 ± 1,1	1,6 ± 0,6	<0.001
Cystatin C	0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,7 ± 0,3	3,3 ± 2,1	1,8 ± 0,7	<0.001
eGFR CKD-EPI Kreatinin (ml/min/1.73m² KÖF)	96 ± 17	74 ± 18	45 ± 10	24 ± 11	52 ± 23	<0.001
eGFR CKD-EPI Cystatin C (ml/min/1.73m² KÖF)	94 ± 19	72 ± 21	38 ± 10	18 ± 4	44 ± 16	<0.001
eGFR CKD-EPI Kreatinin/Cystatin C (ml/min/1.73m² KÖF)	95 ± 17	71 ± 10	41 ± 9	20 ± 5	46 ± 16	<0.001
ACR <30 mg Albumin/g Kreatin (%)	100	45	41	29	28	<0.001
ACR 30-300 mg Albumin/g Kreatinin (%)	0	55	37	26	54	
ACR <300 mg Albumin/g Kreatinin (%)	0	0	22	45	18	

Tabelle 9 Nierenfunktionsparameter in den Studiengruppen. Dargestellt sind Mittelwert +/- SD oder % der Gruppe

3.1.5. Laborparameter

Neben den Parametern zur Nierenfunktion wurden weitere Laborwerte zur Charakterisierung der Studiengruppen bestimmt. Als weitere Laborparameter, welche direkt durch die Nierenfunktion beeinflusst werden, wurden Harnsäure und Harnstoff bestimmt. Bei der Harnsäure zeigten sich typischerweise in allen Gruppen im Vergleich zu den Gesunden erhöhte Harnsäurewerte. Die Gruppe 'CKD G4+5' hatte mit $7,9 \pm 2,8$ mg/dl die höchsten Werte. Demgegenüber lag die Harnsäure bei den gesunden Probanden mit $5,6 \pm 3,5$ mg/dl am niedrigsten. Beim Harnstoff zeigten sich ebenfalls klare Unterschiede zwischen den Gruppen. Mit zunehmendem Stadium der CKD kam es zu einem deutlichen Anstieg des Harnstoffes mit dem höchsten Wert in der Gruppe 'HD'.

CRP als Entzündungsparameter lag in der Kontrollgruppe ('Gesund') im Normbereich und stieg mit zunehmendem Stadium der Niereninsuffizienz. Mit $10,5 \pm 12$ mg/dl lag er in der Gruppe der Dialysepatienten am höchsten. In der Gruppe 'Transplant' lag der Wert hingegen wieder im Normbereich wie auch in der Kontrollgruppe ('Gesund'). Beim Hämoglobinwert zeigte sich ein inverses Muster. Mit zunehmendem Stadium der Niereninsuffizienz nahm hier der mittlere Hämoglobinwert ab und lag in der Gruppe 'HD' mit $11,2 \pm 1,8$ mg/dl am niedrigsten. In der Gruppe der gesunden Probanden ('Gesund') und 'CKD G1+2' war er mit $14,5 \pm 1,2$ mg/dl am höchsten.

Eine häufige Komorbidität und Risikofaktor der CKD ist der Diabetes mellitus. Vergleicht man HbA1C, einen Parameter für die langfristige Einstellung des Blutzuckers in den Studiengruppen, so zeigte sich in allen Gruppen ein signifikant erhöhter Wert gegenüber der Kontrollgruppe ('Gesund'). In der Gruppe 'Transplant' war der Wert mit $6,4 \pm 1$ % am höchsten und in der Gruppe der gesunden Probanden ('Gesund') mit $5,4 \pm 0,4$ % am niedrigsten. Weiterhin wurde die Zahl der Leukozyten im Blut bei den jeweiligen Patientengruppen bestimmt. Diese lag im Durchschnitt bei $7,6 \pm 2,5 \times 10^9$ Zellen/l im und war in der Gruppe der gesunden Probanden ('Gesund') mit $7,0 \pm 2,0 \times 10^9$ Zellen/l am niedrigsten und in der Gruppe 'Transplant' mit $8,8 \pm 4,2 \times 10^9$ Zellen/l am höchsten. Tabelle 10 zeigt einen Überblick über die erfassten Laborparameter in den jeweiligen Studiengruppen

	Gesund (N=74)	CKD G1+2 (N=20)	CKD G3 (N=46)	CKD G4+5 (N=31)	HD (N=30)	Transplant (N=17)	P
Harnstoff (mg/dl)	27,2 ± 8,5	37,0 ± 13,3	60,0 ± 19,6	117,6 ± 34,5	124,9 ± 36,0	60,8 ± 22,4	<0.001
Harnsäure (mg/dl)	5,6 ± 3,5	6,6 ± 1,6	7,2 ± 1,9	7,9 ± 2,8	6,9 ± 1,5	7,5 ± 1,8	<0.001
Kalium (mmol/l)	4,3 ± 0,4	4,4 ± 0,4	4,6 ± 0,6	4,7 ± 0,6	4,8 ± 0,8	4,4 ± 0,6	0.810
CRP (mg/dl)	2,5 ± 2,4	2,8 ± 2,2	4,9 ± 5,4	6,2 ± 6,7	10,5 ± 12	2,5 ± 2,2	0.001
Leukozyten (10 ³ /μl)	7,0 ± 2,0	7,2 ± 1,4	7,7 ± 2,2	7,5 ± 2,1	7,4 ± 3,1	8,8 ± 4,2	0.096
Hämoglobin (mg/dl)	14,5 ± 1,2	14,5 ± 1,4	13,5 ± 1,4	12,3 ± 2,1	11,2 ± 1,8	12,2 ± 3,5	<0.001
HbA1c (%)	5,4 ± 0,4	5,9 ± 0,7	6,3 ± 0,9	6,2 ± 0,8	6,1 ± 1,3	6,4 ± 1,0	<0.001

Tabelle 10 Laborparameter der Studiengruppen. Dargestellt sind Mittelwert +/- SD

2.2. Oberflächenexpression von IL-1 α

Mithilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern wurde durchflusszytometrisch die Oberflächenexpression von IL-1 α auf den isolierten Monozyten gemessen. Da in der Gruppe ‘Transplant’ nicht ausreichend Monozyten zur durchflusszytometrischen Analyse gewonnen werden konnten, ist diese nicht aufgeführt.

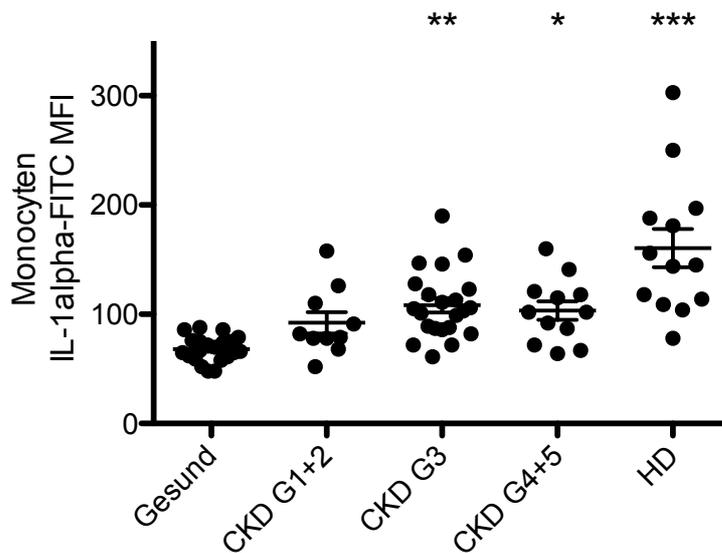


Abbildung 13 Mean fluorescence intensity (MFI) für IL-1 α -FITC der Monozyten: Es sind Mittelwert und Standardfehler dargestellt. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ für den Vergleich mit den gesunden Probanden.

In der Untersuchung der Gesamtpopulation der Monozyten zeigten sich die in Abbildung 13 dargestellten Unterschiede zwischen den Studiengruppen. Mit zunehmendem Stadium der Nierenerkrankung zeigten die Monozyten eine gesteigerte Expression von IL-1 α auf ihrer Oberfläche. Bis auf die Gruppe ‘CKD G1+2’ war diese Erhöhung signifikant im Vergleich zu den gesunden Probanden. Die höchste Expression von IL-1 α zeigte die Gruppe ‘HD’.

Anhand der Oberflächenmarker CD14 und CD16 wurden die Monozyten in ihre Subpopulationen eingeteilt und isoliert auf die Oberflächenexpression von IL-1 α untersucht. Abbildung 14 zeigt die Expression von IL-1 α auf der Oberfläche der klassischen Monozyten (CD14 $^{++}$ CD16 $^{-}$) in den Studiengruppen.

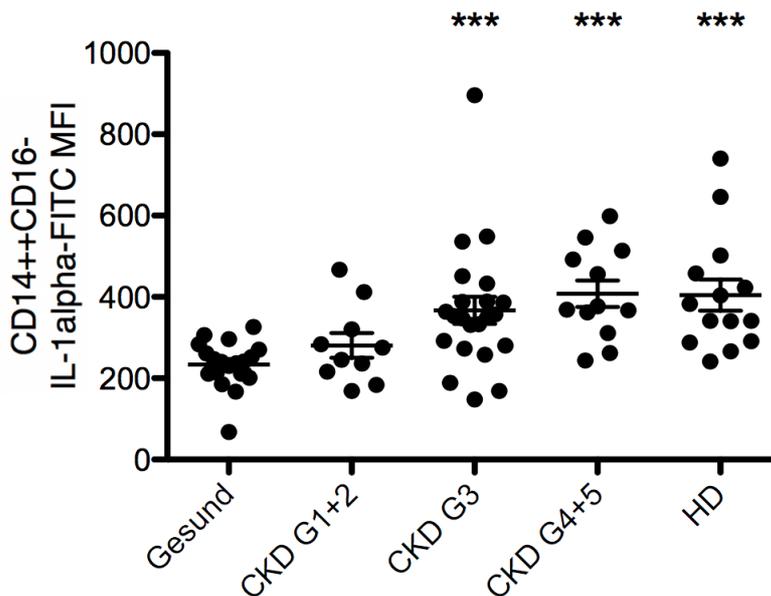


Abbildung 14 MFI für IL-1 α -FITC der klassischen Monozyten (CD14 $^{++}$ CD16 $^{-}$). Es sind Mittelwert und Standardfehler dargestellt. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ für den Vergleich mit den gesunden Probanden.

Bei den klassischen Monozyten (CM) zeigte sich in allen Gruppen eine erhöhte MFI von IL-1 α -FITC im Vergleich zur Kontrollgruppe ('Gesund'). In der Gruppe 'CKD G1+2' war dieser Unterschied nicht signifikant unterschiedlich verglichen mit der Kontrollgruppe ('Gesund'). In den weiteren Gruppen hingegen war die erhöhte Oberflächenexpression von IL-1 α im Vergleich zur Kontrollgruppe ('Gesund') signifikant. Mit zunehmendem Stadium der Nierenerkrankung zeigte sich eine Erhöhung der Oberflächenexpression von IL-1 α .

Als weitere Subpopulation wurde die Gruppe der intermediären Monozyten (CD14⁺⁺CD16⁺) auf ihre Oberflächenexpression von IL-1 α untersucht. Die MFI für IL-1 α -FITC der intermediären Monozyten in den Studiengruppen ist in Abbildung 15 dargestellt.

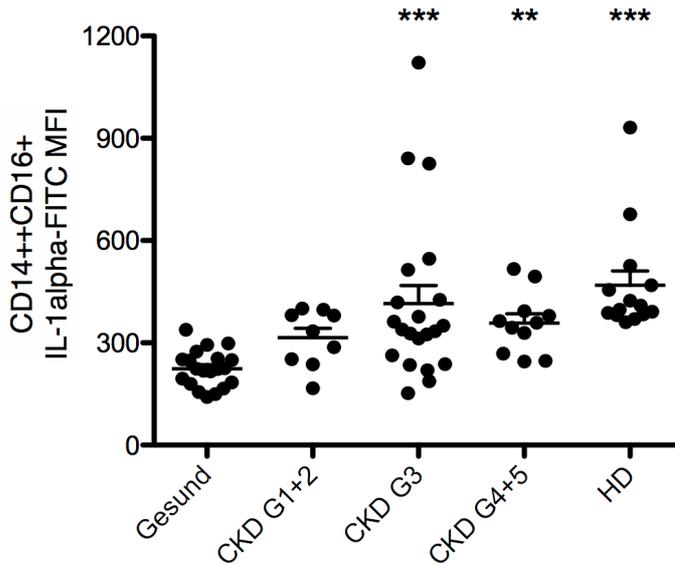


Abbildung 15 MFI von IL-1 α -FITC der intermediären Monozyten (CD14⁺⁺CD16⁺): Es sind Mittelwert und Standardfehler dargestellt. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ für den Vergleich mit den gesunden Probanden.

Bei den intermediären Monozyten zeigte sich ebenfalls in allen Gruppen eine Erhöhung der Oberflächenexpression von IL-1 α im Vergleich zur Kontrollgruppe ('Gesund'). In der Gruppe 'CKD G1+2' war der Unterschied erneut nicht signifikant während sich in den anderen Gruppen signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ('Gesund') zeigte. Mit zunehmendem Stadium der Nierenerkrankung zeigte sich eine Zunahme der Oberflächenexpression von IL-1 α . Die höchste Expression von IL-1 α zeigte sich auf der Oberfläche der Monozyten der Gruppe 'HD'.

Als dritte Subpopulation wurden die nicht-klassischen Monozyten (CD14+CD16++) charakterisiert. Hier zeigte sich ebenfalls in allen Gruppen eine höhere MFI im Vergleich zur Kontrollgruppe ('Gesund'). Allerdings waren die Unterschiede nur in den Gruppen 'CKD G3' und 'HD' verglichen zur Kontrollgruppe signifikant. Wie bei den intermediären Monozyten war die MFI von IL-1 α -FITC in der Gruppe 'CKD G4+5' niedriger als in der Gruppe 'CKD G3'. Sonst zeigte sich mit zunehmendem Stadium der Nierenerkrankung ein Anstieg der Oberflächenexpression von IL-1 α . Die MFI von IL-1 α -FITC der nicht-klassischen Monozyten in den Studiengruppen ist in Abbildung 16 dargestellt.

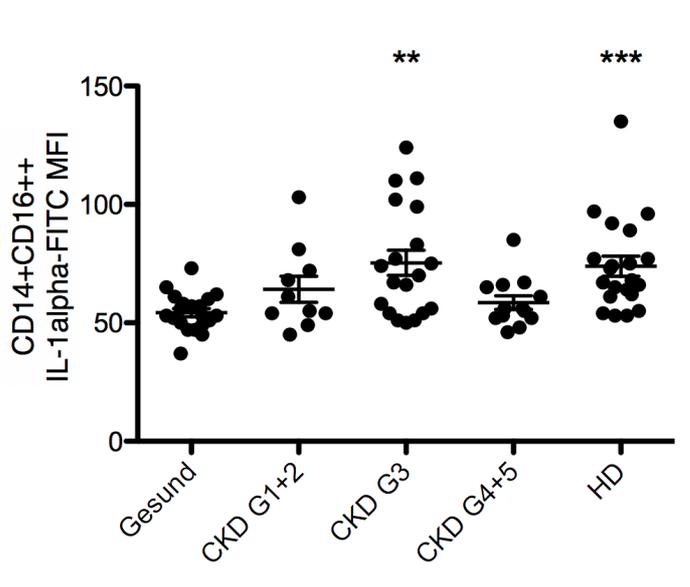


Abbildung 16 MFI von IL-1 α -FITC der nicht-klassischen Monozyten (CD14+CD16++): Es sind Mittelwert und Standardfehler in den Gruppen dargestellt. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ für den Vergleich mit den gesunden Probanden..

Insgesamt zeigte sich bei der Expression von IL-1 α auf der Oberfläche der Monozyten in allen Gruppen eine Erhöhung der Expression mit zunehmendem Stadium der chronischen Nierenerkrankung mit den höchsten Werten in der Gruppe der Dialysepatienten. In dieser Gruppe und der Gruppe 'CKD G3' war die Expression von IL-1 α im Vergleich zur Kontrollgruppe ('Gesund') in allen Subpopulationen der Monozyten signifikant erhöht. In der Gruppe 'CKD G1+2' zeigte sich zwar eine Erhöhung der MFI im Vergleich zu den gesunden Probanden, erreichte aber keine statistische Signifikanz.

3.3. Sekretion von IL-1 α

3.3.1. Stimulation mit LPS

Im ersten Versuchsansatz wurden die Monozyten nur mit LPS inkubiert. Dieser Ansatz diente zur Untersuchung der basalen Sekretion von IL-1 α ohne weiteren Sekretionsstimulus. Abbildung 17 zeigt die Konzentration von IL-1 α im Medium in den Studiengruppen nach Inkubation mit LPS.

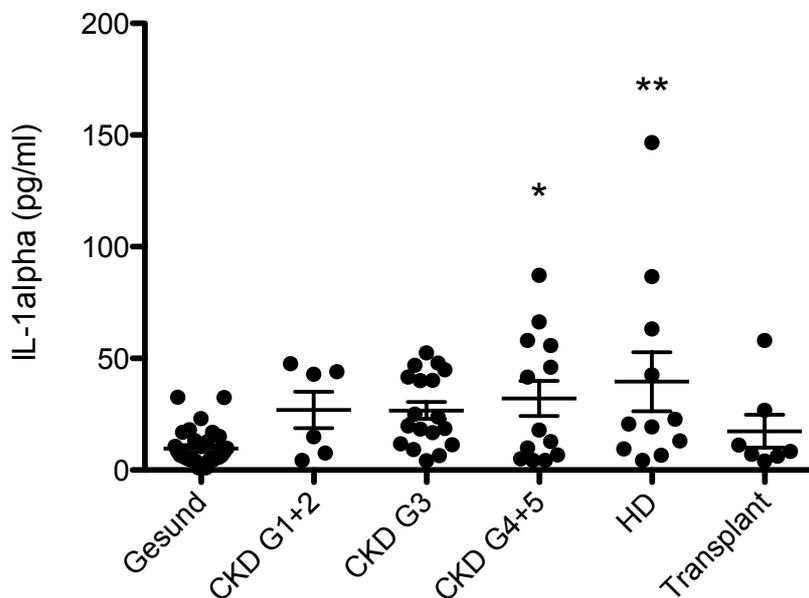


Abbildung 17 Sekretion von IL-1 α nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml, 4 hr): Es sind jeweils Mittelwert und Standardfehler in den Gruppen dargestellt. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ für den Vergleich mit den gesunden Probanden.

Am höchsten war die IL-1 α Konzentration im Überstand von Monozyten der Gruppe 'HD' mit $32 \pm 7,9$ pg/ml und am niedrigsten in der Gruppe der gesunden Probanden ('Gesund') mit $9 \pm 1,5$ pg/ml. In den Gruppen 'CKD G4+5' und 'HD' zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Sekretion im Vergleich zu Monozyten der Kontrollgruppe ('Gesund'). In den weiteren Gruppen hingegen war dieser Unterschied nicht signifikant.

3.3.2. Stimulation mit LPS und ATP

Bei der Stimulation der Monozyten mit ATP zeigte sich eine deutlich erhöhte Sekretion von IL-1 α im Vergleich zur Inkubation nur mit LPS. Schon in der Gruppe der Gesunden lag die Konzentration nach Stimulation im Mittel bei $51,9 \pm 7,2$ pg/ml. Abbildung 18 zeigt die Konzentration von IL-1 α im Medium nach Stimulation mit LPS und ATP.

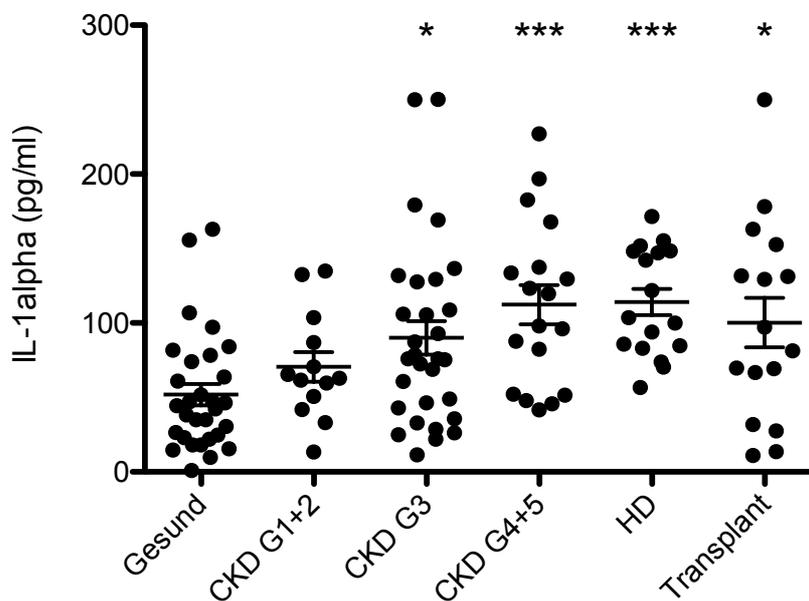


Abbildung 18 Sekretion von IL-1 α nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml, 4 hr) und ATP (1,1 mg/ml, 1hr). Es sind jeweils Mittelwert und Standardfehler in den Gruppen dargestellt. In allen Gruppen zeigte sich eine erhöhte Sekretion im Vergleich zur Kontrollgruppe ('Gesund'). * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

In allen Gruppen zeigte sich eine erhöhte Sekretion von IL-1 α im Vergleich zur Kontrollgruppe ('Gesund'). In den Gruppen 'CKD G3' und 'Transplant' sowie in den Gruppen 'CKD G4+5' und 'HD' signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe ('Gesund'). Mit zunehmendem Stadium der Nierenerkrankung zeigte sich eine stärkere Sekretion von IL-1 α mit der höchsten Konzentration im Medium von $114 \pm 8,7$ pg/ml in der Gruppe 'HD'.

3.3.3. Stimulation mit LPS und Nigericin

Bei der Stimulation der Monozyten mit LPS und Nigericin war die Sekretion von IL-1 α im Vergleich zur Inkubation mit LPS ebenfalls erhöht.

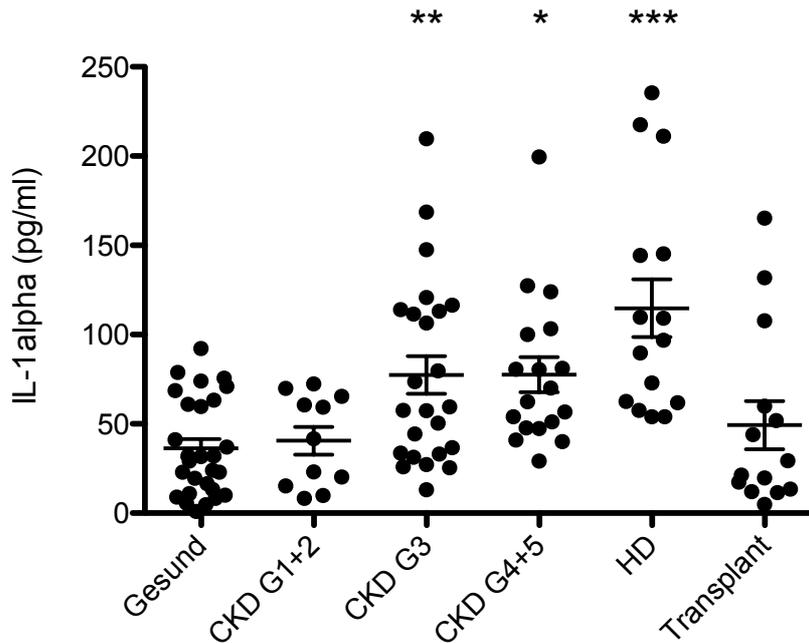


Abbildung 19 Sekretion von IL-1 α nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml, 4 hr) und Nigericin (7,5 μ g/ml, 1hr). Es sind jeweils Mittelwert und Standardfehler in den Gruppen dargestellt. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

In allen Gruppen war die Sekretion von IL-1 α im Vergleich zur Kontrollgruppe ('Gesund') erhöht und mit zunehmendem Stadium der Nierenerkrankung kam es zu einer Zunahme der Sekretion von IL-1 α . In den Gruppen 'CKD G3', 'CKD G4+5' und 'HD' war die Sekretion von IL-1 α signifikant höher im Vergleich zur Kontrollgruppe ('Gesund'). Die stärkste Sekretion lag bei den Monozyten der Gruppe 'HD' mit einer Konzentration von IL-1 α von $114,8 \pm 8,7$ pg/ml im Medium vor. In den Gruppen 'CKD G1+2' und 'Transplant' war die Sekretion hingegen nur leicht erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe ('Gesund') und dieser Unterschied nicht signifikant.

3.3.4. Stimulation mit LPS und Aluminium

Auch bei der Stimulation mit LPS und Aluminium war eine stärkere Sekretion von IL-1 α im Vergleich zur Inkubation mit LPS erkennbar.

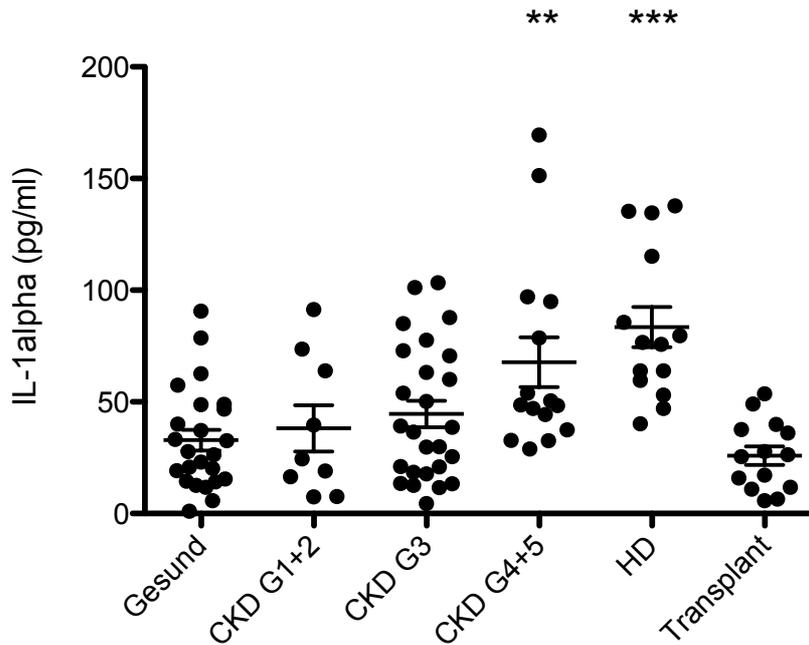


Abbildung 20 Sekretion von IL-1 α nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml, 4 hr) und Aluminium (200 μ g/ml, 3 hr). Es sind jeweils Mittelwert und Standardfehler in den Gruppen dargestellt. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

In den Gruppen 'CKD G4+5' und 'HD' zeigte sich eine signifikant erhöhte Sekretion von IL-1 α im Vergleich zur Gruppe der gesunden Probanden ('Gesund'). Die stärkste Sekretion lag wie auch bei den vorigen Stimulantien in der Gruppe 'HD' mit $83,5 \pm 9,0$ pg/ml IL-1 α im Medium vor. Auch in den Gruppen 'CKD G1+2' und 'CKD G3' war die Sekretion im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant. Insgesamt lassen die Ergebnisse erkennen, dass Monozyten von chronisch Nierenkranken nach Stimulation verstärkt IL-1 α sezernieren und im Vergleich zu Monozyten von Nierengesunden stärker auf die Stimulation der Sekretion von IL-1 α reagieren.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die Expression von IL-1 α auf der Oberfläche von Monozyten von Nierenkranken im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöht ist. Diese stieg mit zunehmender Einschränkung der Nierenfunktion an und war bei Dialysepatienten am höchsten. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass Monozyten von Patienten mit chronischer Nierenerkrankung sowohl basal als auch nach Stimulation signifikant mehr IL-1 α sezernieren als Monozyten von Gesunden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass IL-1 α eine wichtige Rolle bei Entstehung einer CKD-assoziierten Inflammation spielt.

5.1. Expression von IL-1 α

IL-1 α ist ein proinflammatorisches Zytokin der IL-1 Super-Familie. Es kommt in einer Vorläuferform (pro-IL-1 α , 31 kDa), als prozessierte Form (mature IL-1 α , 17 kDa) sowie als N-terminales Fragment (IL-1 α -NTP, 16 kDa) in diversen Zellen des Körpers vor (44,63). Wie auch IL-1 β bindet es an den IL-1R1 und aktiviert darüber verschiedene proinflammatorische Signalwege, wobei IL-1 α neben dieser Wirkung als proinflammatorisches Zytokin noch eine Vielzahl weiterer Funktionen zugeschrieben werden. IL-1 α kann sowohl intrazellulär im Zytosol und Nukleus lokalisiert sein, als auch in den Extrazellularraum sezerniert werden (64). Weiterhin kommt es in ‚apoptotic bodies‘ vor, welche aus Zellen im Rahmen der Apoptose freigesetzt werden, und kann in oberflächengebundener Form auf der Zellmembran verschiedener Zellen exprimiert sein (65,66).

IL-1 α wird als membrangebundenes Protein auf der Oberfläche von Monozyten exprimiert (66,67). In dieser Form wurde es auch auf weiteren hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen wie B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Endothelzellen und dermalen Fibroblasten nachgewiesen (66,68,69).

Membrangebundenes IL-1 α entspricht dabei in seiner Proteinstruktur dem pro-IL-1 α und ist über eine Lectinbindung in der Plasmamembran verankert (63,67). Kaplanski et al. konnten zeigen, dass membrangebundenes IL-1 α über die juxtakrine Stimulation von Endothelzellen, diese zur Sekretion von IL-8 anregt (70). IL-8 ist an der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und an deren Migration durch das Endothel beteiligt, einem wichtigen pathogenetischen Schritt in der Entstehung von Atherosklerose (71).

Ebenfalls ist bekannt, dass die chronische Nierenerkrankung mit erhöhten Werten proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, welches von Endothelzellen freigesetzt wird, und IL-8 im Serum einhergeht (72–74). Erhöhte Serumlevel von IL-6 und IL-8 sind als Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen bekannt und mit einer erhöhten Mortalität bei chronisch Nierenkranken im Stadium der Dialysepflicht assoziiert (75,76). In diesem Zusammenhang könnte das erhöhte IL-1 α auf Monozyten chronisch Nierenkranker an den erhöhten Serumwerten von IL-6 und IL-8 beteiligt sein, da IL-1 α über IL-1R1 die Expression der genannten Zytokine induziert. Es stellt sich jedoch weiterhin die Frage nach der Ursache der erhöhten Expression von IL-1 α auf der Oberfläche von Monozyten chronisch Nierenkranker. Die Tatsache, dass Monozyten von Patienten mit Niereninsuffizienz - also basal ohne zusätzliche Stimulation - IL-1 α auf ihrer Oberfläche exprimieren, spricht dafür, dass verschiedene endogene Substanzen, z.B. TLR-Liganden bei Nierenkranken die Expression von IL-1 α stimulieren. Möglicherweise sind hierbei modifizierte Lipoproteine beteiligt, die bei Nierenkranken akkumulieren und beispielsweise mit TLR-2 interagieren (42).

Daneben sind eine Vielzahl weiterer Stimuli bekannt, darunter LPS, verschiedene Bakterien wie *Mycobacterium tuberculosis* oder *Listeria monocytogenes* selbst und TNF α , welche zu einer vermehrten Expression von IL-1 α auf der Zelloberfläche führen (57,77,78). Somit scheint IL-1 α in seiner membrangebundenen Form sowohl eine Funktion in der Abwehr intrazellulärer Erreger als auch externer Stimuli zu haben.

Eine weitere Rolle spielt membrangebundenes IL-1 α bei der Regulation des sogenannten Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps (SASP). Dieser charakterisiert einen Zustand, in welchen Zellen bei Alterung übergehen und welcher sich durch fehlende Proliferation sowie die Sekretion von Metalloproteasen, Wachstumsfaktoren und proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IL-8 auszeichnet. IL-1 α auf der Oberfläche von seneszenten Fibroblasten führte zu einer juxtakrinen Stimulation benachbarter Fibroblasten und zur Sekretion von IL-6 und IL-8 (79). Dabei ist der Transkriptionsfaktor ‚mammalian-target of rapamycin‘ (mTOR) an einer erhöhten Membranexposition von IL-1 α beteiligt, und seine Suppression dessen führt zu einer verminderten Membranexposition von IL-1 α sowie einer verminderten Sekretion von IL-6 und IL-8. Der Mechanismus des SASP verhindert die Teilung geschädigter Zellen und somit die Entstehung von Entartungen, führt auf der anderen Seite jedoch zu einer chronischen sterilen Inflammation, welche langfristig zu einer Gewebeschädigung führt.

Die chronisch erhöhte Exposition von IL-1 α auf der Oberfläche von Monozyten chronisch Nierenkranker könnte somit zu einer schnelleren Zellalterung von Geweben sowie dem Endothel führen und darüber an dem beschleunigten Alterungsprozess beteiligt sein, welcher sich bei chronisch Nierenkranken beobachten lässt (80). Neben der juxtakrinen Aktivität des membrangebundenen proIL-1 α , kann es auch durch Proteasen wie Granzym B, Elastase oder Mastzellchymase, welche es extrazellulär zu maturem IL-1 α prozessieren von der Zellmembran freigesetzt und somit systemisch wirksam werden (81).

Zusammen mit IL-33 und HMG-1 gehört IL-1 α zu einer Gruppe von Zytokinen, welche konstitutiv in ihrer Vorläuferform im Zytosol exprimiert werden (82–84). Die konstitutive Expression von proIL-1 α im Zytosol ist in verschiedenen Zelltypen wie Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes, Leberparenchymzellen, Nierenparenchymzellen, Lungeneithelien, Endothelzellen, Astrozyten oder Keratinozyten der Haut beschrieben (51,52,59).

5.2. Sekretion von IL-1 α

Neben der membrangebundenen Form wird proIL-1 α und mature IL-1 α auch von hämatopoetischen sowie nicht-hämatopoetischen Zellen sezerniert. In seiner konstitutiv intrazellulär exprimierten Form kommt IL-1 α die Rolle eines Alarmins zu, welches das umliegende Gewebe vor Zellschädigung „warnt“ (55). Kommt es infolge einer Zellschädigung zur Auflösung der Membranintegrität, wird IL-1 α passiv aus den nekrotischen Zellen freigesetzt und „alarmiert“ die umliegenden Zellen, was zu einer lokalen Inflammation und Infiltration des Gewebes durch neutrophile Granulozyten führt (85). Beispielsweise bei Hypoxie sind hierbei die Transkriptionsfaktoren Hypoxie-induzierbare Faktoren (HIF) HIF-1 α und HIF-2 für die vermehrte Expression von IL-1 α verantwortlich (86). Es ist jedoch weiterhin umstritten, ob die passive Sekretion von IL-1 α aus nekrotischen Zellen oder IL-1 α , welches von Makrophagen sezerniert wird, die sterile Inflammation, welche von nekrotische Zellen ausgelöst wird, initiiert (55,85,87).

In Zellen, welche in Apoptose gehen, wird im Unterschied zu nekrotischen Zellen pro-IL-1 α in den Zellkern transloziert, wo es an Chromatin bindet und somit seine Freisetzung aus der Zelle inhibiert wird (45). Werden apoptotische Zellen jedoch nicht zügig abgebaut kommt es zur Freisetzung von IL-1 α enthaltenden Mikropartikeln, den ‚apoptotic bodies‘, welche bei Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins ebenfalls zu einer Inflammationsreaktion führen (65).

Die Regulation des Transportes von pro-IL-1 α in den Zellkern findet über eine Kernlokalisierungssequenz (NLS) statt, welche sich auf IL-1 α -NTP befindet (88). Dieser Transport findet aktiv über den Ran-GTP/GDP Zyklus und Kernporen statt (89). Eine wichtige Rolle spielt hierbei das Protein HAX-1, welches unter anderem in der Regulation von Apoptose eine Rolle spielt. Zudem spielen auch IL-1R2 eine Rolle beim Transport von pro-IL-1 α in den Zellkern. In Fibroblasten führte die Suppression von HAX-1 zur Verhinderung des Transports von IL-1 α in den Zellkern und Untersuchungen von Kawaguchi et al. legen nahe, dass ein Komplex aus pro-IL-1 α , IL-1R2, Hax-1 und weiteren Proteinen für den intranukleären Transport sowie die Bindung von IL-1 α an DNA essentiell sind (90). Durch Schädigung der DNA wird die NLS an Lys82 acetyliert und daraufhin wird pro-IL-1 α vermehrt in den Zellkern transportiert (91). Außerdem besitzt die NLS zellmembranpenetrierende Eigenschaften und somit könnte IL-1 α theoretisch aufgrund seiner Größe auch passiv in den Zellkern gelangen (89,92). Es gibt somit unterschiedliche Wege des Transportes von pro-IL-1 α und IL-1 α -NTP in den Zellkern, wobei deren Funktion bislang unklar ist. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass IL-1 α bei Nekrose freigesetzt wird, während seine Freisetzung in Apoptose durch Translokation in den Zellkern und die Bindung an Chromatin verhindert wird. Verbleibt IL-1 α im Zytosol, wird es schließlich ubiquitinyliert und somit dem Proteasom zum Abbau zugeführt (93).

In Monozyten hingegen wird IL-1 α nicht konstitutiv exprimiert, sondern erst nach Stimulation zum Beispiel mit dem TLR4 Liganden LPS kommt es zur Transkription der mRNA von IL-1 α . (94). Diese Expression wird über Signalwege, welche die Transkriptionsfaktoren AP1 und NF- κ B aktivieren, reguliert (95,96). In Monozyten konnte außerdem eine antisense-IL-1 α RNA nachgewiesen werden, welche bei Stimulation mit Liganden des TLR über NF- κ B hochreguliert wird und für die Expression von IL-1 α über diesen Signalweg essentiell ist (97). Im Unterschied zu IL-1 β , welches durch Caspase-1 prozessiert wird, wird proIL-1 α durch Calpain-Proteasen zu maturem IL-1 α geschnitten (98,99). Da pro-IL-1 α wie auch matures IL-1 α mit ähnlicher Affinität an den IL-1R1 binden, kommt dieser Prozessierung vermutlich keine Aktivierungsfunktion zu (54). Sie ist vielmehr für den Sekretionsweg der aktiven Sekretion von maturem IL-1 α nach Stimulation der Zelle von Bedeutung. So wurde nach Stress durch Hitzeschocks matures IL-1 α aktiv sezerniert, wohingegen proIL-1 α intrazellulär verblieb (100).

Da matures IL-1 α keine Signalpeptidsequenz für das Endoplasmatische Retikulum (ER) besitzt, kann es jedoch nicht über den klassischen Sekretionsweg der Exozytose über den ER-Golgi-Apparat sezerniert werden. Einen möglichen Sekretionsweg von maturem IL-1 α stellt die Komplexbildung mit dem Exportprotein S100A13 da, mit welchem es einen heterotetrameren Komplex bildet und daraufhin über die Plasmamembran transportiert wird (101). Weiterhin wird eine Rolle des Inflammasom-Signalweges über Caspase-1 bei der Sekretion von IL-1 α diskutiert. Bei Stimulation von Monozyten mit Stimulantien des Inflammasom-Signalweges, war die Sekretion von IL-1 α je nach Stimulus abhängig, oder unabhängig von den Komponenten ASC, NALP3 und Caspase-1. Obwohl Caspase-1 nicht direkt an der Prozessierung von proIL-1 α zu mature IL-1 α beteiligt ist, ist die Sekretion von IL-1 α nach Stimulation mit ATP und Nigericin Caspase-1-abhängig. Aluminium hingegen stimuliert die Sekretion von IL-1 α durch Monozyten unabhängig von Inflammasom und Caspase-1 (102). Werden die Aluminiumkristalle phagozytiert, kommt es zur Destabilisierung der Phagolysosomen, was wiederum zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in der Zelle führt (103). Diese aktivieren den TRPM2 Kanal und es kommt zu einem Einstrom von Calcium-Ionen, wodurch wiederum das NLRP3-Inflammasom aktiviert wird (104). Da die Sekretion von IL-1 α durch Stimulation mit Aluminium jedoch unabhängig von der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms ist, wird Calpain vermutlich direkt durch den Einstrom der Ca²⁺-Ionen aktiviert und IL-1 α prozessiert und sezerniert. Die genauen Signalwege, über welche die verschiedenen Stimulantien zur Sekretion von IL-1 α führen, sind unbekannt. Allerdings zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Stimulantien, so dass auch hier von einer komplexen Regulation auszugehen ist. Abbildung 21 fasst die Mechanismen zusammen, über welche es zur Expression und Sekretion von IL-1 α kommt.

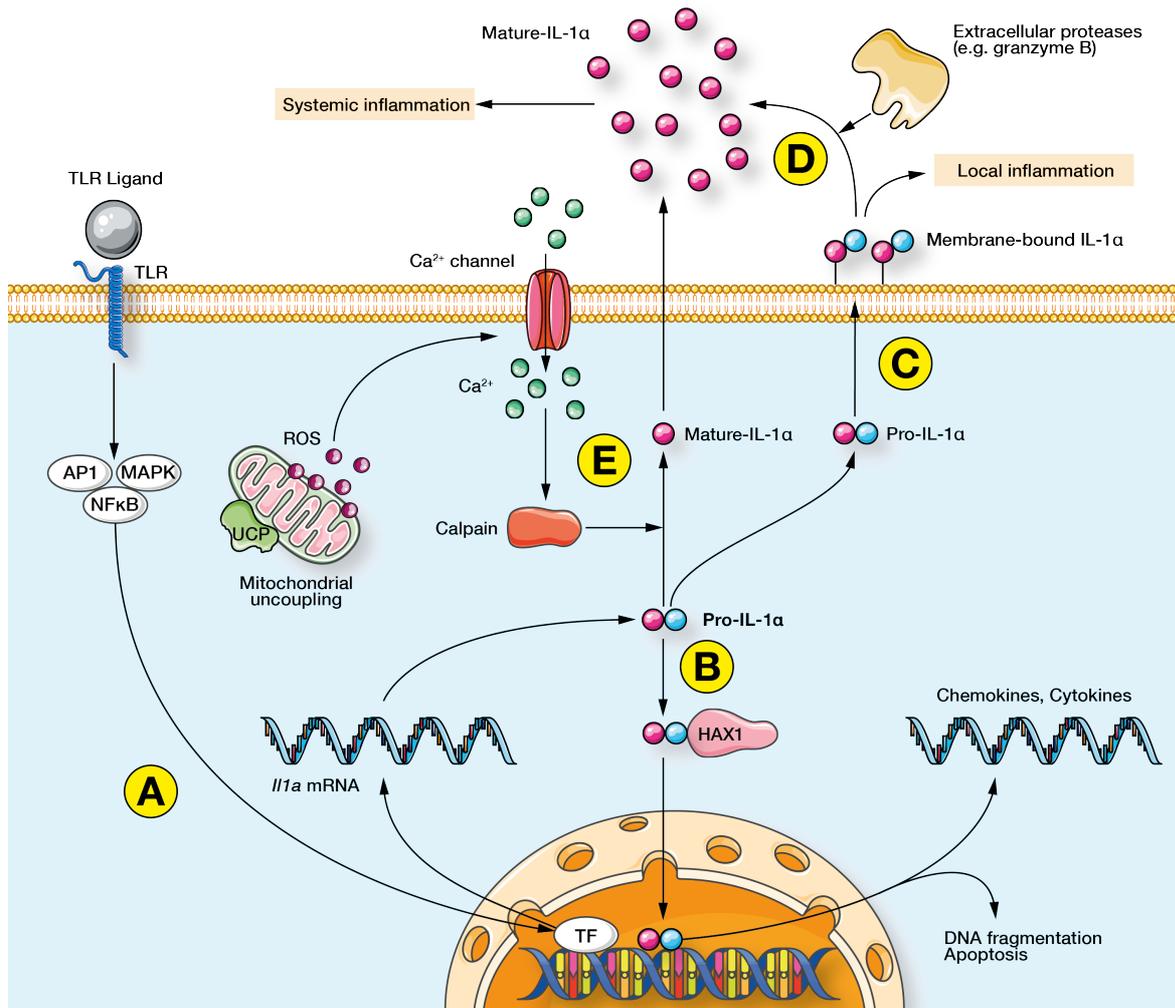


Abbildung 21 Expression und Sekretion von IL-1 α . Durch Bindung an TLRs kommt es zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (A), zur Transkription von IL-1 α mRNA und deren Translation zu Pro-IL-1 α . Dieses kann durch Bindung an HAX1 und eine NLS, in den Zellkern translozieren (B) und dort die Transkription von Zytokinen und Chemokinen aktivieren, sowie zur Fragmentierung der DNA und zu Apoptose führen. Pro-IL-1 α kann über eine Lectinbindung auf der Oberfläche der Zelle exprimiert werden (C) und so eine lokale Entzündung auslösen. Wird es durch extrazelluläre Proteasen wie z.B. Granzym B von der Membran gelöst kann es auch systemisch wirksam werden (D). IL-1 α kann auch aktiv sezerniert werden. Durch Freisetzung von Sauerstoffradikalen kommt es zu einem Einstrom von Ca²⁺-Ionen und zu einer Aktivierung der Protease Calpain. Diese schneidet Pro-IL-1 α zu mature IL-1 α welches über einen alternativen Sekretionsweg freigesetzt wird (E). Verwendung der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr. Dr. T. Speer.

Neben den in dieser Arbeit verwendeten Stimuli ist eine Vielzahl weiterer Stimulatoren der Sekretion von IL-1 α bekannt. Dazu gehören *Candida albicans*, Uratkristalle, Siliziumkristalle, Titanoxid und Toxin B (102). Außerdem führte die Stimulation von Endothelzellen mit Seren chronisch Nierenkranker zu einer vermehrten Expression des TLR4 auf deren Oberfläche sowie zu einer Aktivierung des Inflammasoms (105) und könnte somit auch die Expression von IL-1 α beeinflussen. Zusammen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, spricht dies dafür, dass es im urämischen Milieu zu verstärkter Stimulation der Monozyten kommt.

Eine mögliche Ursache könnten Stoffe sein, welche aufgrund der verminderten Nierenfunktion im Serum akkumulieren. Der Vergleich des Metaboloms chronisch Nierenkranker mit dem Nierengesunder hat eine Vielzahl an Stoffen identifiziert, welche bei CKD akkumulieren (106,107). Eine Gruppe von Stoffen welche vielfach untersucht wurde, sind Metabolite der Aminosäure Tryptophan. So stimuliert Indoxylsulfat die Produktion von ROS durch Makrophagen und führt zu einer Freisetzung von Ca^{2+} aus den Mitochondrien (108). Diese intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung könnte auch Calpain-Proteasen aktivieren und somit zu der vermehrten Sekretion von IL-1 α durch Monozyten chronisch Nierenkranker beitragen.

Daneben akkumuliert auch Trimethylamin N-oxid (TMAO) bei chronisch Nierenkranken (109). Es ist bei chronisch Nierenkranken mit vermehrter Atherosklerose und einer erhöhten Mortalität assoziiert (109,110). Stimulation von Endothelzellen mit TMAO *in vitro* führten zu einer Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und zur Sekretion von IL-1 β (111). Da dieser Signalweg eng mit der Regulation der Expression und Sekretion von IL-1 α verknüpft ist, könnte dieser Stimulus auch an der vermehrten Expression und Sekretion von IL-1 α durch Monozyten chronisch Nierenkranker im Vergleich zu Gesunden beteiligt sein.

Neben Stoffen, welche bei CKD akkumulieren, könnten auch Proteine, welche bei chronisch Nierenkranken verändert vorliegen zu einer Stimulation der Monozyten führen.

Proteine werden nach Translation sowohl intrazellulär als auch extrazellulär modifiziert. Zu diesen posttranslationalen Modifikationen welche bei CKD und CVD relevant sind gehören Carbamylierung, Glykierung, Oxidation und Carbonylierung (112). Im urämischen Milieu chronisch Nierenkranker kommt es vermehrt zur Carbamylierung von Proteinen im Vergleich zu gesunden Patienten und diese ist mit einer erhöhten Mortalität assoziiert (113,114). Weiterhin werden vermehrt antioxidativ wirksame Stoffe wie Glutathion und Cystein carbamylisiert, was zu einem verminderten Schutz vor ROS bei chronisch Nierenkranken beiträgt (115). Außerdem führt carbamylisiertes LDL zu einer endothelialen Dysfunktion mit vermehrter Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (116). Über diese Mechanismen könnte es auch zu der Stimulation der Monozyten chronisch Nierenkranker und deren verstärkter Expression von IL-1 α kommen.

Weiterhin geht ein Verlust der Nierenfunktion mit einer vermehrten Retention glykierter Proteine einher, welche auch beim Diabetes mellitus, einem Hauptrisikofaktor der CKD, vermehrt vorkommen (117,118). Diese 'advanced glycation endproducts' (AGE) binden an den 'receptor for advanced glycation endproducts' (RAGE) und führen über diesen zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Daraufhin werden vermehrt proinflammatorische Zytokine wie IL-1 α oder IL-6 sezerniert (119,120). Dies wäre ein möglicher Signalweg, welcher zu der chronischen Inflammation bei chronisch Nierenkranken beiträgt und zu der verstärkten Expression und Sekretion von IL-1 α durch Monozyten chronisch Nierenkranker führt.

Eine weitere Form der posttranslationalen Modifikation, welche bei Patienten mit CKD im Vergleich zu Gesunden vermehrt vorkommt ist die Oxidation und Carbonylierung von Serumproteinen (121). Chronisch Nierenkranke zeigen erhöhte Werte für 'advanced oxidation protein products' (AOPPs), sowie für IL-1 (122). Erhöhte Serumwerte für AOPPs gehen bei chronisch Nierenkranken mit erhöhtem Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse einher (123).

Ebenfalls ist bei chronisch Nierenkranken bekannt, dass HDL durch symmetrisches Dimethylarginin (SDMA) modifiziert ist, wodurch HDL nicht mehr vasoprotektiv wirkt, sondern zur endothelialen Dysfunktion beiträgt und erhöhte Serumwerte für SDMA sind bei chronisch Nierenkranken mit einer erhöhter kardiovaskulären Mortalität assoziiert (42,124). Somit kommen auch derart modifizierte Proteine als Ursache der vermehrten Expression sowie Sekretion von IL-1 α durch Monozyten chronisch Nierenkranker in Frage. Es konnte jedoch bisher noch für keinen dieser Stoffe eine direkte Stimulation der Monozyten zur Expression von IL-1 α nachgewiesen werden.

5.3. Biologische Wirkung von IL-1 α

IL-1 α bindet an den IL-1R1, welcher zusammen mit seinem Corezeptor IL-1RAcP zur Aktivierung von MyD88 führt. Darüber kommt es zur Translokation von NF- κ B und MAPK in den Zellkern und zur Transkription proinflammatorischer Zytokine. Der Signalweg über den IL-1R1 ist in Abbildung 22 dargestellt.

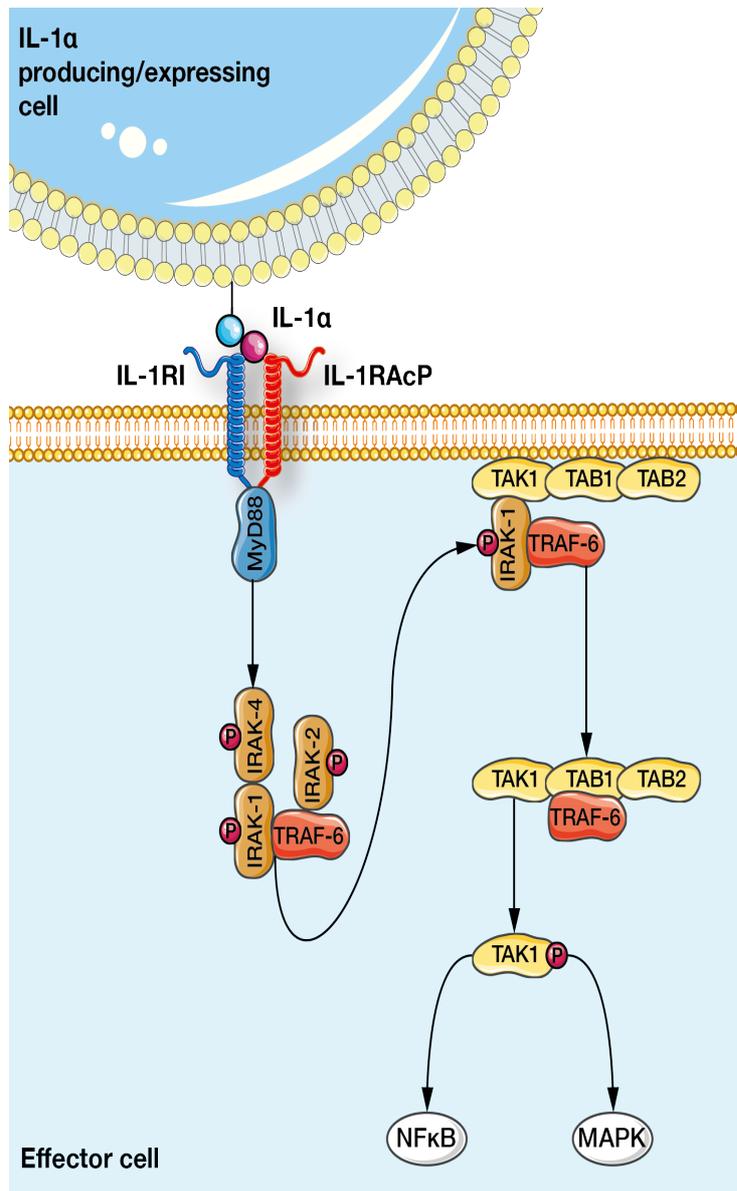


Abbildung 22 Signalweg von IL-1 α . IL-1 α bindet an den IL-1R1, über welchen er zusammen mit dem Corezeptor IL-1RAcP zu einer Aktivierung von MyD88 führt (125). MyD88 interagiert mit IRAK-4 und IRAK-1, und IRAK-4 phosphoryliert im Anschluss IRAK-1, woraufhin dieses TRAF-6 bindet (126,127). Der Komplex aus IRAK-1 und TRAF-6 bindet an den membrangebundenen Komplex aus TAK1, TAB1 und TAB2 und löst ihn von der Zellmembran. TAK-1 wird daraufhin aktiviert und führt über NF- κ B und MAPK zur Transkription proinflammatorischer Effektoren (128,129). Verwendung der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr. Dr. T. Speer.

Nach Aktivierung dieser Signalwege kommt es zur Sekretion einer Vielzahl an proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-8, MCP-1, COX-2, IL-1 β und IL-1 α (130). Die physiologischen und pathophysiologischen Funktionen von IL-1 α sind dabei vielfach untersucht worden.

Die physiologischen Funktionen von IL-1 α als ‚Alarmin‘ und seine Funktion in der Unterscheidung von apoptotischem und nekrotischem Zelltod wurden bereits zuvor besprochen (siehe Seite 4). Eine weitere wichtige Funktion kommt IL-1 α bei der Immunreaktion gegen *Legionella pneumophila* zu. Im Mausmodell ist hier IL-1 α aus Monozyten der Initiator der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten nach Lungeninfektion mit *L. pneumophila* (131). Auch bei der Infektion von Mäusen mit *Yersinia enterocolitica* ist IL-1 α das entscheidende Zytokin zur Initiierung einer Entzündungsreaktion (132). Bei Infektion mit Adenoviren war IL-1 α ebenfalls das entscheidende Zytokin für die Freisetzung von CXCL-1 und CXCL-2 und die Infiltration neutrophiler Granulozyten in die Milz (133,134). Somit ist IL-1 α an diversen Abwehrreaktion auf Pathogene über PRRs des angeborenen Immunsystems beteiligt und hat hierbei seine Funktion vor allem bei der Initiierung der Entzündung.

Neben seiner physiologischen Funktion spielt IL-1 α bei verschiedenen Erkrankungen eine Rolle. Wie bereits beschrieben ist IL-1 α am SASP und der Zellalterung beteiligt. Dieser Phänotyp geht mit tumorfördernden Eigenschaften einher. Bei Patienten mit squamösem Zellkarzinom der Haut gingen erhöhte Werte für IL-1 α mit einer verstärkten Metastasierung sowie einer deutlich verschlechterten Prognose einher (135). Auch *in vitro* Experimente zeigen eine tumor- und metastasenfördernde Wirkung von IL-1 α auf Leber- und Pankreastumorzellen (136,137).

IL-1 α ist auch an der Pathophysiologie autoinflammatorischer Erkrankungen beteiligt wie zum Beispiel den ‚cryopyrin associated periodic syndromes‘, systemischer Sklerose, familiärem mediterranen Fieber, Morbus Behçet oder Gicht (138). So zeigten Fibroblasten von Patienten mit systemischer Sklerose eine erhöhte Expression von IL-1 α , welche zu einer vermehrten Expression von IL-6 und Platelet-derived Growth Factor A (PDGF-A) führte (139). Einige Experimente *in vitro* und im Mausmodell zeigten, dass IL-1 α bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ein entscheidender Faktor bei der Initiierung der Inflammation ist und seine Blockade führte zu einer Reduktion der Entzündung (59,140,141).

An der Entzündung des Gehirns nach Schlaganfall ist IL-1 α ebenfalls beteiligt (142,143). Im Mausmodell zeigten die Tiere nach hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung erhöhte Serumwerte für IL-1 α und im Rattenmodell für ischämische Hirnschädigung zeigte sich ein hirnpotektiver Effekt für die Applikation von IL-1RA (144,145).

Bei chronisch inflammatorischen Erkrankungen wie der CVD oder CKD führt ebenfalls das angeborene Immunsystem zu einer sterilen Inflammation über IL-1 α . Freigang et al. konnten im Mausmodell zeigen, dass ein Knockout für IL-1 α zu verminderter Bildung von fettinduzierter Atherosklerose führt und die Sekretion von IL-1 α durch fettsäurestimulierte Knochenmark-stämmiger Makrophagen (BMDMs) Ca²⁺-abhängig ist (60). Außerdem zeigten Mäuse, welche nur in hämatopoetischen Zellen einen Knockout für IL-1 α haben, eine verringerte Bildung von Atherosklerose durch fettreiche Nahrung (146).

Somit spielt IL-1 α bei einer Vielzahl häufiger Erkrankungen als auch seltenerer Erkrankungen eine Rolle, weshalb das Verständnis der physiologischen als auch der pathophysiologischen Funktionen von IL-1 α , welches erst seinen Anfängen begriffen ist, Gegenstand einer Vielzahl aktueller Experimente und Studien ist.

5.4. Therapeutische Konsequenzen

Eine Vielzahl an Studien zeigt eine sterile chronische Inflammation als pathogenetischen Faktor der chronischen Nierenerkrankung und ihrer Begleiterkrankungen (72–76). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit untermauern diese Hypothese und zeigen, dass IL-1 α in diesen Prozess involviert sein kann. Eine Reduktion der Inflammation bei Patienten mit CKD bietet somit eine vielversprechende therapeutische Option.

Einen potentiellen Ansatz bietet der Einsatz von Statinen bei Patienten mit CKD. In der JUPITER-Studie zeigte die Behandlung mit Statinen neben den lipidsenkenden Eigenschaften auch eine Reduktion der Inflammation und eine Verringerung des kardiovaskulären Risikos (147). Weiterhin führte die Statinbehandlung bei CKD-Patienten mit erhöhten inflammatorischen Markern zu einer geringeren Abnahme der GFR im Vergleich zu CKD-Patienten ohne Erhöhung dieser Marker (148).

Eine weitere potentielle Interventionsmöglichkeit zur Reduktion der Inflammation besteht in der Blockade von IL-1. Sie wird bereits in der Therapie einer Vielzahl von Erkrankungen eingesetzt.

Dabei sind derzeit drei verschiedene Therapeutika zugelassen: der rekombinante IL-1 Rezeptorantagonist Anakinra, der humane IL-1 β Antikörper Canakinumab und der Decoy-Rezeptor Rilonacept. Ein Anti-IL-1 α -Antikörper sowie ein Anti-IL-1R-Antikörper befinden sich in klinischen Studien (138).

Ihr therapeutisches Potential zeigte sich in der Behandlung der Cryopyrin-assoziierten periodischen Syndrome. Diese seltenen Erkrankungen zeichnen sich durch Mutationen im NLRP3-Inflammasom aus, wodurch übermäßig IL-1 β freigesetzt wird, was zu Fieber, Myalgien bis hin zu aseptischer Meningitis führen kann (149–151). Sowohl Rilonacept als auch Canakinumab führten bei diesen Patienten zu einem schnellen Rückgang der Symptome bei geringen Nebenwirkungen (152–154).

Eine weitere Gruppe von Erkrankungen, welche auf die Blockade von IL-1 ansprechen, sind entzündliche Gelenkerkrankungen wie die rheumatoide Arthritis oder Gicht. Die Wirkung von Anakinra bei rheumatoider Arthritis ist in einigen klinischen Studien belegt und auch Canakinumab führte zu einem deutlichen Rückgang der Symptome (155,156). Bei der Behandlung von Gicht zeigten sich für Anakinra, Canakinumab und Rilonacept eine Reduktion schmerzhafter Anfälle und eine Reduktion der Entzündung (157–161). Uratkristalle, welche für die schmerzhaften Gichtanfälle verantwortlich sind, stimulieren Makrophagen zur Sekretion von IL-1 α und IL-1 β (162). Dass die Inhibierung dieses Mechanismus therapeutisch erfolgreich ist, lässt vermuten, dass auch bei chronisch Nierenkranken die Blockade von IL-1 erfolgreich zur Behandlung der chronisch sterilen Inflammation eingesetzt werden könnte.

Auch bei Diabetes mellitus zeigt die Blockade von IL-1 therapeutische Erfolge. Im Mausmodell für Typ-1-Diabetes führte ein knock-out des IL-1R zu einer verzögerten Progression der Erkrankung (163). Bei Kindern mit Typ-1 Diabetes führte die Behandlung mit Anakinra direkt nach Erstdiagnose ebenfalls zur Verzögerung der Progression des Diabetes (164). Bei bestehendem Typ-1 Diabetes konnte jedoch in Placebo-kontrollierten Studien weder für Anakinra, noch Canakinumab eine Wirksamkeit gezeigt werden (165). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass IL-1 an der Initiierung des Typ-1 Diabetes beteiligt ist, und am ehesten in dieser Krankheitsphase eine Blockade von IL-1 therapeutisches Potential bietet. Die Behandlung von Patienten mit Typ-2 Diabetes mit Anakinra führte zu Verbesserung der Blutzuckerkontrolle, einer Reduktion der Inflammationsmarker wie CRP und IL-6, sowie zu einer verstärkten Insulinproduktion (166). Interessanterweise hielt der Effekt der 13-wöchigen Behandlung an und auch 39 Wochen nach der Therapie zeigten die Patienten einen geringeren Insulinbedarf sowie ein reduziertes CRP und IL-6 im Vergleich zu vor der Therapie (167).

In einer Pilotstudie zeigten sich diese Effekte auch für die selektive Blockade von IL-1 α durch MABp1 (168). Große, randomisierte Placebo-kontrollierte Doppelblindstudien fehlen hier jedoch. Da in vielen Fällen der chronischen Nierenerkrankung ein Diabetes mellitus zugrunde liegt, könnte eine Therapie durch Blockade von IL-1 bei diesen Patienten synergistisch wirksam sein.

Weiterhin zeigt die Therapie durch Blockade von IL-1 vielversprechende Ergebnisse bei der Behandlung von Patienten nach Myokardinfarkt. In zwei randomisierten Placebo-kontrollierten Studien kam es durch Behandlung mit Anakinra zu einer Verbesserung der linksventrikulären Funktion im Vergleich zur Placebogruppe (169,170). In der Placebogruppe entwickelten 30% ein Herzversagen, im Unterschied zu 5% in der Gruppe unter Therapie mit Anakinra (170). Auch in weiteren Studien mit Anakinra kam es durch die Blockade von IL-1 zu einer Besserung der linksventrikulären Funktion (171).

Somit findet sich die Therapie durch Blockade von IL-1 bereits in einer Vielzahl verschiedener Erkrankungen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass die gezielte Blockade von IL-1 auch in der Therapie der CKD erfolgsversprechend sein könnte.

Im Tiermodell mit 5/6-nephrektomierten Ratten wurde durch Inhibierung der IL-1-Rezeptor assoziierten Kinase 4 (IRAK4) eine Reduktion inflammatorischer Marker wie IL-1 β , IL-6, MCP-1 sowie CRP, sowie eine Verbesserung der Clearance für Kreatinin im Vergleich zu unbehandelten Ratten erreicht (172). In einem Mausmodell für diabetische Nephropathie führte die Behandlung mit Anakinra zu einer reduzierten Nierenschädigung (173).

In einer Pilotstudie zeigte die Behandlung mit Anakinra bei Patienten an Dialyse eine Reduktion inflammatorischer Biomarker sowie einen Anstieg von Präalbumin im Serum (174). In einer weiteren Studie wurden Patienten der Stadien G3 und G4 für zwölf Wochen mit Rilonacept behandelt. Im Vergleich zur Behandlung mit Placebo hatten diese Patienten verminderte inflammatorische Biomarker sowie eine Verbesserung des ‚brachial artery flow mediated dilation‘ (FMD_{BA}), einem Maß für die Endothelfunktion. Eine weitere Studie zur Anwendung von Anakinra bei chronisch Nierenkranken mit Diabetes mellitus ist bereits abgeschlossen. Ihre Ergebnisse stehen jedoch noch aus (175). Die Ergebnisse der Studien sowie die vorliegende Arbeit zeigen deutlich, dass IL-1 α in den Prozess der sterilen Inflammation bei chronisch Nierenkranken involviert ist. Ein genaueres Verständnis der Ursache der erhöhten Expression von IL-1 α sowie größere Studien zur Wirksamkeit der Blockade von IL-1 werden hier weitere wichtige Erkenntnisse liefern.

5.5. Limitationen der Studie

In den Gruppen ‚CKD G1+2‘ und ‚Transplant‘ zeigte sich kein signifikanter Unterschied zur Gruppe der gesunden Probanden. Dies ist am ehesten der relativen niedrigen Gruppengrößen geschuldet. In die Studie wurden nur kaukasische Probanden eingeschlossen, was eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Ethnien mit teilweise unterschiedlichen Mechanismen der Entstehung der chronischen Nierenerkrankung einschränkt.

Abgesehen von diesen limitierenden Faktoren, zeichnete sich die untersuchte Population durch ein typisches Profil an Risikofaktoren und Begleiterkrankungen chronisch Nierenkranker wie einem erhöhten BMI, arterieller Hypertonie, einem erhöhten HbA1C, einem erhöhten CRP sowie einem verringerten Hämoglobinwert aus. Somit ist die untersuchte Kohorte als repräsentativ für Patienten mit einer chronischen Nierenerkrankung in den westlichen Industrieländern anzusehen. Zudem ist diese Analyse bislang die einzige Studie, in der systemisch bei Patienten mit unterschiedlichen Stadien einer chronischen Nierenerkrankung die Expression als auch die Sekretion von IL-1 α untersucht wurde.

5.6. Ausblick

Monozyten von chronisch Nierenkranken exprimieren vermehrt IL-1 α auf ihrer Oberfläche und sezernieren vermehrt IL-1 α nach Stimulation mit Stimulantien des NLRP3-Inflammasoms im Vergleich zu Gesunden. Diese Unterschiede sind Teil der proinflammatorischen Dysregulation, welche bei chronisch Nierenkranken zur Progression der CKD sowie zur Entstehung diverser Begleiterkrankungen führt. Offene Fragen wie nach der Ursache der erhöhten Expression von IL-1 α müssen durch weitere Experimente untersucht werden. Dies könnte gezielte Therapien gegen die Inflammation und ihre Folgen bei chronisch Nierenkranken ermöglichen. Da IL-1 α in einer Vielzahl von Erkrankungen eine Rolle spielt, ist auch die grundlegende physiologische Funktion und Regulation von IL-1 α weiter zu erforschen, um mögliche Zusammenhänge aufklären zu können. Antiinflammatorische Therapieansätze zur Behandlung der CKD zeigen in Studien vielversprechende Ergebnisse, sind jedoch erst in ihren Anfängen begriffen. Die gezielte Inhibierung von IL-1 findet in einem breiten Spektrum an Erkrankungen bereits Anwendung und eine Vielzahl an Studien, zusammen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass diese Strategie auch in der Behandlung der CKD erfolgreich sein könnte. Aus diesem Grund ist es wichtig, durch weitere klinische sowie Grundlagenforschung in diesem Bereich Fragen wie der nach einem Stimulus der Inflammation bei CKD zu beantworten.

6. Literaturverzeichnis

1. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int Suppl* [Internet]. 2013;3(1):4–4.
2. Oh K-H, Park SK, Park HC, Chin HJ, Chae DW, Choi KH, et al. KNOW-CKD (KoreaN cohort study for Outcome in patients With Chronic Kidney Disease): design and methods. *BMC Nephrol* [Internet]. 2014;15(1):80.
3. Lin Wu FL, Chen YM, Lai TS, Shen LJ, Ho YF, Lee YT, et al. Does Chinese herb nephropathy account for the high incidence of end-stage renal disease in Taiwan? *Nephron - Clin Pract*. 2012;120(4).
4. Vinge E, Lindergård B, Nilsson-Ehle P, Grubb a. Relationships among serum cystatin C, serum creatinine, lean tissue mass and glomerular filtration rate in healthy adults. *Scand J Clin Lab Invest*. 1999;59(8):587–92.
5. Stevens LA, Schmid CH, Greene T, Li L, Beck GJ, Joffe MM, et al. Factors other than glomerular filtration rate affect serum cystatin C levels. *Kidney Int* [Internet]. 2009;75(6):652–60.
6. Levey AS, de Jong PE, Coresh J, El Nahas M, Astor BC, Matsushita K, et al. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney Int* [Internet]. 2011;80(1):17–28.
7. Yang W, Xie D, Anderson AH, Joffe MM, Greene T, Teal V, et al. Association of kidney disease outcomes with risk factors for CKD: Findings from the Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) study. *Am J Kidney Dis*. 2014;63(2):236–43.
8. Levey AS, Coresh J. Chronic kidney disease. *Lancet* [Internet]. 2012;379(9811):165–80. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60178-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60178-5)
9. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380(9859):2095–128.
10. USRDS. Chapter 1 : CKD in the General Population. Vol. 1, USRDS Annual Data Report. 2015.
11. Zhang L, Wang F, Wang L, Wang W, Liu B, Liu J, et al. Prevalence of chronic kidney disease in China: A cross-sectional survey. *Lancet* [Internet]. 2012;379(9818):815–22.
12. Bruck K, Stel VS, Gambaro G, Hallan S, Volzke H, Arnlov J, et al. CKD Prevalence Varies across the European General Population. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2015;ASN.2015050542-.
13. Go AS, Chertow GM, Fan D, Mcculloch CE, Hsu C. Chronic Kidney Disease and the Risks of Death, Cardiovascular Events, and Hospitalization. *Mortality*. 2004;2006:1296–305.

14. Dounousi E, Papavasiliou E, Makedou A, Ioannou K, Katopodis KP, Tselepis A, et al. Oxidative Stress Is Progressively Enhanced With Advancing Stages of CKD. *Am J Kidney Dis.* 2006;48(5):752–60.
15. Terawaki H, Yosiumura K, Hasegawa T, Matsuyama Y, Negawa T, Yamada K, et al. Oxidative stress is enhanced in correlation with renal dysfunction: examination with the redox state of albumin. *Kidney Int.* 2004;66(5):1988–93.
16. Meuwese CL, Snaedal S, Halbesma N, Stenvinkel P, Dekker FW, Qureshi AR, et al. Trimestral variations of C-reactive protein, interleukin-6 and tumour necrosis factor- α are similarly associated with survival in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(4):1313–8.
17. Hwang I, Park HE, Kim H, Kim HM, Park J, Yoon Y, et al. Systemic Inflammation Is Associated With Coronary Artery Calcification and All-Cause Mortality in Patients With Chronic Kidney Disease. *J Am Coll Cardiol [Internet].* 2016;67(13):1575.
18. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol [Internet].* 2000;18(Figure 1):767–811.
19. van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ.* 1972;46(6):845–52.
20. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol [Internet].* 2009;27:669–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19132917>
21. Italiani P, Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. *Front Immunol.* 2014;5(OCT):1–22.
22. Serbina N V, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol [Internet].* 2008;26:421–52.
23. Wong KL, Tai JJ-Y, Wong W-C, Han H, Sem X, Yeap W-H, et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood [Internet].* 2011;118(5):e16-31.
24. Mitchell AJ, Roediger B, Weninger W. Monocyte homeostasis and the plasticity of inflammatory monocytes. *Cell Immunol [Internet].* 2014;291(1–2):22–31.
25. Furth Byrvan, Colin ZA. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med.* 1968;(May):415–35.
26. Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science [Internet].* 2012;336(6077):86–90.
27. Mills CD. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Crit Rev Immunol [Internet].* 2012;32(6):463–88.
28. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol [Internet].* 2011;11(11):723–37.

29. Cho KW, Morris DL, delProposto JL, Geletka L, Zamarron B, Martinez-Santibanez G, et al. An MHC II-dependent activation loop between adipose tissue macrophages and CD4+ T cells controls obesity-induced inflammation. *Cell Rep.* 2014;9(2):605–17.
30. O’Keeffe M, Mok WH, Radford KJ. Human dendritic cell subsets and function in health and disease. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(22):4309–25.
31. Geering B, Stoeckle C, Conus S, Simon HU. Living and dying for inflammation: Neutrophils, eosinophils, basophils. Vol. 34, *Trends in Immunology*. 2013. p. 398–409.
32. Mantovani A, Cassatella M a, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2011;11(8):519–31.
33. Spits H, Cupedo T. Innate Lymphoid Cells: Emerging Insights in Development, Lineage Relationships, and Function. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2012;30(1):647–75.
34. Della Chiesa M, Marcenaro E, Sivori S, Carlomagno S, Pesce S, Moretta A. Human NK cell response to pathogens. Vol. 26, *Seminars in Immunology*. 2014. p. 152–60.
35. Crouse J, Xu HC, Lang PA, Oxenius A. NK cells regulating T cell responses: Mechanisms and outcome. *Trends Immunol* [Internet]. 2015;36(1):49–58.
36. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: Signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev.* 2012;249(1):158–75.
37. Zewinger S, Schumann T, Fliser D, Speer T. Innate immunity in CKD-associated vascular diseases. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2015;gfv358.
38. Dambuza IM, Brown GD. C-type lectins in immunity: Recent developments. *Curr Opin Immunol.* 2015;32:21–7.
39. Poeck H, Bscheider M, Gross O, Finger K, Roth S, Rebsamen M, et al. Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 beta production. *Nat Immunol* [Internet]. 2010;11(1):63–9.
40. Anders H, Schaefer L. Beyond Tissue Injury — Damage-Associated Molecular Patterns , Toll-Like Receptors , and In fl ammasomes Also Drive Regeneration and Fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2014;1–14.
41. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* [Internet]. 2010;464(7293):1357–61.
42. Speer T, Rohrer L, Blyszczuk P, Shroff R, Kuschnerus K, Kränkel N, et al. Abnormal high-density lipoprotein induces endothelial dysfunction via activation of toll-like receptor-2. *Immunity.* 2013;38(4):754–68.
43. Dinarello C a, Goldin NP, Wolff SM. Demonstration and characterization of two distinct human leukocytic pyrogens. *J Exp Med.* 1974;139:1369–81.

44. March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Braedt G, Price V, et al. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature [Internet]*. 1985;315(6021):641–7.
45. Cohen I, Rider P, Carmi Y, Braiman A, Dotan S, White MR, et al. Differential release of chromatin-bound IL-1alpha discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]*. 2010;107(6):2574–9.
46. Krelin Y, Voronov E, Dotan S, Elkabets M, Reich E, Fogel M, et al. Interleukin-1 α -driven inflammation promotes the development and invasiveness of chemical carcinogen-induced tumors. *Cancer Res*. 2007;67(3):1062–71.
47. Carmi Y, Dotan S, Rider P, Kaplanov I, White MR, Baron R, et al. The role of IL-1beta in the early tumor cell-induced angiogenic response. *J Immunol [Internet]*. 2013;190(7):3500–9.
48. Besnard A-G, Togbe D, Guillou N, Erard F, Quesniaux V, Ryffel B. IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation. *Eur J Immunol [Internet]*. 2011;41(6):1675–86.
49. Vigne S, Palmer G, Martin P, Lamacchia C, Strebel D, Rodriguez E, et al. IL-36 signaling amplifies Th1 responses by enhancing proliferation and Th1 polarization of naive CD4+ T cells. *Blood*. 2012;120(17):3478–87.
50. Nold MF, Nold-Petry C a, Zepp J a, Palmer BE, Bufler P, Dinarello C a. IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nat Immunol [Internet]*. 2010;11(11):1014–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1944>
51. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity [Internet]*. 2013;39(6):1003–18.
52. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol [Internet]*. 2009;27:519–50.
53. van de Veerdonk FL, Netea MG, Dinarello CA, Joosten LAB. Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection. Vol. 32, *Trends in Immunology*. 2011. p. 110–6.
54. Mosley B, Urdal DL, Prickett KS, Larsen A, Cosman D, Conlon PJ. The Interleukin- 1 Receptor Binds the Human Interleukin- 1alpha Precursor but Not the Interleukin- 1betaPrecursor. *J Biol Chem*. 1987;1–4.
55. Chen C-J, Kono H, Golenbock D, Reed G, Akira S, Rock KL. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med [Internet]*. 2007;13(7):851–6.
56. Kurt-Jones EA, Beller DI, Mizel SB, Unanue ER. Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]*. 1985;82(4):1204–8.

57. Di Paolo NC, Shafiani S, Day T, Papayannoupoulou T, Russell DWW, Iwakura Y, et al. Interdependence between Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor Regulates TNF-Dependent Control of Mycobacterium tuberculosis Infection. *Immunity* [Internet]. 2015;43(6):1125–36.
58. Di Paolo NC, Shayakhmetov DM. Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nat Immunol* [Internet]. 2016;17(8):906–13.
59. Bersudsky M, Luski L, Fishman D, White RM, Ziv-Sokolovskaya N, Dotan S, et al. Non-redundant properties of IL-1 α and IL-1 β during acute colon inflammation in mice. *Gut* [Internet]. 2014;63(4):598–609.
60. Freigang S, Ampenberger F, Weiss A, Kanneganti T-D, Iwakura Y, Hersberger M, et al. Fatty acid-induced mitochondrial uncoupling elicits inflammasome-independent IL-1 α and sterile vascular inflammation in atherosclerosis. *Nat Immunol* [Internet]. 2013;14(10):1045–53.
61. Lin Z, Chiang NY, Chai N, Seshasayee D, Lee WP, Balazs M, et al. In vivo antigen-driven plasmablast enrichment in combination with antigen-specific cell sorting to facilitate the isolation of rare monoclonal antibodies from human B cells. *Nat Protoc* [Internet]. 2014;9(7):1563–77.
62. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M, et al. 2013 ESH/ESC Pocket Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2013;2159–219.
63. Beuscher HU, Colten HR. Structure and function of membrane IL-1. *Mol Immunol*. 1988;25(11):1189–99.
64. Di Paolo NC, Shayakhmetov DM. Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nat Immunol* [Internet]. 2016;17(8):906–13.
65. Berda-Haddad Y, Robert S, Salers P, Zekraoui L, Farnarier C, Dinarello C a., et al. Sterile inflammation of endothelial cell-derived apoptotic bodies is mediated by interleukin-1. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108(51):20684–9.
66. Conlon PJ, Grabstein KH, Alpert A, Prickett KS, Hopp TP, Gillis S. Localization of human mononuclear cell interleukin 1. *J Immunol* [Internet]. 1987;139(1):98–102.
67. Brody DT, Durum SK. Membrane IL-1: IL-1 alpha precursor binds to the plasma membrane via a lectin-like interaction. *J Immunol* [Internet]. 1989;143(4):1183–7.
68. E A Kurt-Jones , J S Pober WF. Membrane interleukin 1 induction on human endothelial cells and dermal fibroblasts . *J Immunol*. 1987;
69. Zola H, Flego L, Wong YT, Macardle PJ, Kenney JS. Direct demonstration of membrane IL-1 alpha on the surface of circulating B lymphocytes and monocytes. *J Immunol* [Internet]. 1993;150(5):1755–62.
70. Kaplanski G, Farnarier C, Kaplanski S, Porat R, Shapiro L, Bongrand P, et al. Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism. *Blood*. 1994;84(12):4242–8.

71. Smith WB, Gamble JR, Clark-Lewis I, Vadas MA. Interleukin-8 induces neutrophil transendothelial migration. *Immunology [Internet]*. 1991;72(1):65–72.
72. Stinghen AE, Goncalves SM, Martines EG, Nakao LS, Riella MC, Aita CA, et al. Increased plasma and endothelial cell expression of chemokines and adhesion molecules in chronic kidney disease. *Nephron Clin Pr [Internet]*. 2009;111(2):c117-26.
73. Lee BT, Ahmed FA, Hamm LL, Teran FJ, Chen CS, Liu Y, et al. Association of C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6 with chronic kidney disease . *BMC Nephrol*. 2015;16:77.
74. Spoto B, Mattace-Raso F, Sijbrands E, Leonardis D, Testa A, Pisano A, et al. Association of IL-6 and a functional polymorphism in the IL-6 gene with cardiovascular events in patients with CKD. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(2):232–40.
75. Sun J, Axelsson J, Machowska A, Heimbürger O, Barany P, Lindholm B, et al. Biomarkers of Cardiovascular Disease and Mortality Risk in Patients with Advanced CKD. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016;11(7):1163–72.
76. Panichi V, Taccola D, Rizza GM, Consani C, Ghiadoni L, Filippi C, et al. Interleukin-8 is a powerful prognostic predictor of all-cause and cardiovascular mortality in dialytic patients. *Nephron - Clin Pract*. 2006;102(2):51–8.
77. Hurme M. Differential Induction of Membrane-Associated Interleukin 1 (IL-1) Expression and IL-1α and IL-1 β Secretion by Lipopolysaccharide and Silica in Human Monocytes. *Scand J Immunol*. 1988;1:725–30.
78. Kurt-Jones EA, Virgin HW, Unanue ER. In vivo and in vitro expression of macrophage membrane interleukin 1 in response to soluble and particulate stimuli. *J Immunol [Internet]*. 1986;137(1):10–4.
79. Orjalo A V, Bhaumik D, Gengler BK, Scott GK, Campisi J. Cell surface-bound IL-1α is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]*. 2009;106(40):17031–6.
80. Shanahan CM. Mechanisms of vascular calcification in CKD—evidence for premature ageing? *Nat Rev Nephrol [Internet]*. 2013;(9):661–70.
81. Afonina IS, Tynan GA, Logue SE, Cullen SP, Bots M, Lüthi AU, et al. Granzyme B-dependent proteolysis acts as a switch to enhance the proinflammatory activity of IL-1α *Mol Cell*. 2011;44(2):265–78.
82. Wilson KC, Cruikshank WW, Center DM, Zhang Y. Prointerleukin-16 contains a functional CcN motif that regulates nuclear localization. *Biochemistry*. 2002;41(48):14306–12.
83. Yang H, Wang H, Tracey KJ. HMG-1 rediscovered as a cytokine. [Internet]. Vol. 15, *Shock* (Augusta, Ga.). 2001. p. 247–53.
84. Bertheloot D, Latz E. HMGB1, IL-1α, IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins. *Cell Mol Immunol [Internet]*. 2016;(February):1–22.

85. Eigenbrod T, Park J-H, Harder J, Iwakura Y, Núñez G. Cutting edge: critical role for mesothelial cells in necrosis-induced inflammation through the recognition of IL-1 alpha released from dying cells. *J Immunol*. 2008;181(12):8194–8.
86. Rider P, Kaplanov I, Romzova M, Braiman L, Braiman A, Voronov E, et al. The transcription of the alarmin cytokine interleukin-1 alpha is controlled by hypoxia inducible factors 1 and 2 alpha in hypoxic cells. *Front Immunol*. 2012;3(SEP).
87. Kono H, Karmarkar D, Iwakura Y, Rock KL. Identification of the cellular sensor that stimulates the inflammatory response to sterile cell death. *J Immunol* [Internet]. 2010;184(8):4470–8.
88. Wessendorf JH, Garfinkel S, Zhan X, Brown S, Maciag T. Identification of a nuclear localization sequence within the structure of the human interleukin-1 alpha precursor. *J Biol Chem* [Internet]. 1993;268(29):22100–4.
89. Luheshi NM, Rothwell NJ, Brough D. The dynamics and mechanisms of interleukin-1 α and β nuclear import. *Traffic*. 2009;10(1):16–25.
90. Kawaguchi Y, Nishimagi E, Tochimoto A, Kawamoto M, Katsumata Y, Soejima M, et al. Intracellular IL-1alpha-binding proteins contribute to biological functions of endogenous IL-1alpha in systemic sclerosis fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(39):14501–6.
91. Idan C, Peleg R, Elena V, Martin T, Cicerone T, Mareike W, et al. IL-1 α is a DNA damage sensor linking genotoxic stress signaling to sterile inflammation and innate immunity. *Sci Rep* [Internet]. 2015;5(August):14756.
92. Koo JH, Yoon H, Kim WJ, Lim S, Park HJ, Choi JM. Cell membrane penetrating function of the nuclear localization sequence in human cytokine IL-1 α *Mol Biol Rep*. 2014;41(12):8117–26.
93. Ainscough JS, Gerberick GF, Zahedi-Nejad M, Lopez-Castejon G, Brough D, Kimber I, et al. Dendritic cell IL-1 α and IL-1 β are polyubiquitinated and degraded by the proteasome. *J Biol Chem*. 2014;289(51):35582–92.
94. Carlsen TG, Kjærsgaard P, Jørgensen TL, Foldbjerg R, Nielsen ML, Poulsen TBG, et al. Interleukin-1 α activation and localization in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes and macrophages. *J Immunol Methods* [Internet]. 2015;422:59–71.
95. Bailly S, Fay M, Israël N, Gougerot-Pocidalo MA. The transcription factor AP-1 binds to the human interleukin 1 alpha promoter. *Eur Cytokine Netw* [Internet]. 1996;7(2):125–8.
96. Mori N, Prager D. Transactivation of the interleukin-1 alpha promoter by human T-cell leukemia virus. *Leuk Lymphoma*. 1997;26(5–6):421–33.
97. Chan J, Atianand M, Jiang Z, Carpenter S, Aiello D, Elling R, et al. Cutting Edge: A Natural Antisense Transcript, AS-IL1alpha, Controls Inducible Transcription of the Proinflammatory Cytokine IL-1alpha. *J Immunol*. 2015;195(4):1359–63.
98. Kobayashi Y, Yamamoto K, Saido T, Kawasaki H, Oppenheim JJ, Matsushima K. Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1990;87(14):5548–52.

99. Kavita U, Mizel SB. Differential sensitivity of interleukin-1 β and - α precursor proteins to cleavage by calpain, a calcium-dependent protease. *J Biol Chem*. 1995;270(46):27758–65.
100. Tarantini F, Micucci I, Bellum S, Landriscina M, Garfinkel S, Prudovsky I, et al. The Precursor but Not the Mature Form of IL1 α Blocks the Release of FGF1 in Response to Heat Shock. *J Biol Chem*. 2001;276(7):5147–51.
101. Mohan SK, Yu C. The IL1 α -S100A13 Heterotetrameric Complex Structure. *J Biol Chem [Internet]*. 2011;286(16):14608–17.
102. Groß O, Yazdi AS, Thomas CJ, Masin M, Heinz LX, Guarda G, et al. Inflammasome Activators Induce Interleukin-1 α Secretion via Distinct Pathways with Differential Requirement for the Protease Function of Caspase-1. *Immunity [Internet]*. 2012;36(3):388–400.
103. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol [Internet]*. 2008;9(8):847–56.
104. Zhong Z, Zhai Y, Liang S, Mori Y, Han R, Sutterwala FS, et al. TRPM2 links oxidative stress to NLRP3 inflammasome activation. *Nat Commun [Internet]*. 2013;4:1611.
105. Martin-Rodriguez S, Caballo C, Gutierrez G, Vera M, Cruzado JM, Cases A, et al. TLR4 and NALP3 inflammasome in the development of endothelial dysfunction in uraemia. *Eur J Clin Invest*. 2015;45(2):160–9.
106. Shah VO, Townsend RR, Feldman HI, Pappan KL, Kensicki E, Vander Jagt DL. Plasma metabolomic profiles in different stages of CKD. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013;8(3):363–70.
107. Duranton F, Lundin U, Gayraud N, Mischak H, Aparicio M, Mourad G, et al. Plasma and urinary amino acid metabolomic profiling in patients with different levels of kidney function. *Clin J Am Soc Nephrol [Internet]*. 2014;9(1):37–45.
108. Adesso S, Popolo A, Bianco G, Sorrentino R, Pinto A, Autore G, et al. The Uremic Toxin Indoxyl Sulphate Enhances Macrophage Response to LPS. *PLoS One*. 2013;8(9).
109. Stubbs JR, House JA, Ocque AJ, Zhang S, Johnson C, Kimber C, et al. Serum Trimethylamine-N-Oxide is Elevated in CKD and Correlates with Coronary Atherosclerosis Burden. *J Am Soc Nephrol [Internet]*. 2015;27(1):305–13.
110. Tang WH, Wang Z, Kennedy DJ, Wu Y, Buffa JA, Agatista-Boyle B, Li XS, Levison BS HS. Gut Microbiota-Dependent Trimethylamine N-Oxide (TMAO) Pathway Contributes to Both Development of Renal Insufficiency and Mortality Risk in Chronic Kidney Disease. *Circ Res*. 2015;116(3):448–55.
111. Sun X, Jiao X, Ma Y, Liu Y, Zhang L, He Y, et al. Trimethylamine N-oxide induces inflammation and endothelial dysfunction in human umbilical vein endothelial cells via activating ROS-TXNIP-NLRP3 inflammasome. *Biochem Biophys Res Commun [Internet]*. 2016;481(1–2):63–70.

112. Gajjala PR, Fliser D, Speer T, Jankowski V, Jankowski J. Emerging role of post-translational modifications in chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2015;30(11):1814–24.
113. Balion CM, Draisey TF, Thibert RJ. Carbamylated hemoglobin and carbamylated plasma protein in hemodialyzed patients. *Kidney Int*. 1998;53(2):488–95.
114. Koeth RA, Kalantar-Zadeh K, Wang Z, Fu X, Tang WH, Hazen SL. Protein carbamylation predicts mortality in ESRD. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2013;24(5):853–61.
115. Schreier SM, Steinkellner H, Jirovetz L, Hermann M, Exner M, Gmeiner BMK, et al. S-Carbamylation impairs the oxidant scavenging activity of cysteine: Its possible impact on increased LDL modification in uraemia. *Biochimie*. 2011;93(4):772–7.
116. Speer T, Owala FO, Holy EW, Zewinger S, Frenzel FL, Stähli BE, et al. Carbamylated low-density lipoprotein induces endothelial dysfunction. *Eur Heart J*. 2014;35(43):3021–32.
117. Thornalley PJ. Glycation free adduct accumulation in renal disease: The new AGE. *Pediatric Nephrology*. 2005;20(11):1515–22.
118. Agalou S, Ahmed N, Babaei-Jadidi R, Dawnay A, Thornalley PJ. Profound mishandling of protein glycation degradation products in uremia and dialysis. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2005;16(5):1471–85.
119. Bucciarelli LG, Wendt T, Rong L, Lalla E, Hofmann MA, Goova MT, et al. RAGE is a multiligand receptor of the immunoglobulin superfamily: Implications for homeostasis and chronic disease. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59(7):1117–28.
120. Stingham AEM, Massy ZA, Vlassara H, Striker GE, Boullier A. Uremic Toxicity of Advanced Glycation End Products in CKD. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2016;27(2):354–70.
121. Matsuyama Y, Terawaki H, Terada T, Era S. Albumin thiol oxidation and serum protein carbonyl formation are progressively enhanced with advancing stages of chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol*. 2009;13(4):308–15.
122. Rasool M, Ashraf MAB, Malik A, Waquar S, Khan SA, Qazi MH, et al. Comparative study of extrapolative factors linked with oxidative injury and anti-inflammatory status in chronic kidney disease patients experiencing cardiovascular distress. *PLoS One* [Internet]. 2017;12(2):e0171561.
123. Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Gausson V, Mothu N, et al. Advanced oxidation protein products as risk factors for atherosclerotic cardiovascular events in nondiabetic predialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 2005;45(1):39–47.
124. Zewinger S, Kleber ME, Rohrer L, Lehmann M, Triem S, Jennings RT, et al. Symmetric dimethylarginine, high-density lipoproteins and cardiovascular disease. *Eur Heart J* [Internet]. 2017;1–11.

125. Burns K, Martinon F, Esslinger C, Pahl H, Schneider P, Bodmer JL, et al. MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J Biol Chem*. 1998;273(20):12203–9.
126. Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. MyD88: An adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity*. 1997;7(6):837–47.
127. Takaesu G, Ninomiya-Tsuji J, Kishida S, Li X, Stark GR, Matsumoto K. Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase leads to activation of TAK1 by inducing TAB2 translocation in the IL-1 signaling pathway. *Mol Cell Biol*. 2001;21(7):2475–84.
128. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* [Internet]. 2004;18(18):2195–224.
129. Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* [Internet]. 2001;412(6844):346–51.
130. Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1 (IL-1) Pathway. *Sci Signal*. 2010;3(105):1–7.
131. Barry KC, Fontana MF, Portman JL, Dugan AS, Vance RE. IL-1 α signaling initiates the inflammatory response to virulent *Legionella pneumophila* in vivo. *J Immunol* [Internet]. 2013;190(12):6329–39.
132. Dube PH, Revell P a, Chaplin DD, Lorenz RG, Miller VL. A role for IL-1 alpha in inducing pathologic inflammation during bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2001;98(19):10880–5.
133. Di Paolo NC, Miao EA, Iwakura Y, Murali-Krishna K, Aderem A, Flavell RA, et al. Virus Binding to a Plasma Membrane Receptor Triggers Interleukin-1 α -Mediated Proinflammatory Macrophage Response In Vivo. *Immunity*. 2009;31(1):110–21.
134. Di Paolo NC, Baldwin LK, Irons EE, Papayannopoulou T, Tomlinson S, Shayakhmetov DM. IL-1 α and Complement Cooperate in Triggering Local Neutrophilic Inflammation in Response to Adenovirus and Eliminating Virus-Containing Cells. *PLoS Pathog*. 2014;10(3).
135. León X, Bothe C, García J, Parreño M, Alcolea S, Quer M, et al. Expression of IL-1 α correlates with distant metastasis in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* [Internet]. 2015;6(35).
136. Sakurai T, He G, Matsuzawa A, Yu G, Maeda S, Karin M. Hepatocyte necrosis induced by oxidative stress and IL-1 α release mediate carcinogen-induced compensatory proliferation and liver tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2009;14(2):156–65.
137. Tjomsland V, Bojmar L, Sandström P, Bratthäll C, Messmer D, Spångeus A, et al. IL-1 α Expression in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Affects the Tumor Cell Migration and Is Regulated by the p38MAPK Signaling Pathway. *PLoS One*. 2013;8(8).
138. Dinarello CA, van der Meer JWM. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. Vol. 25, *Seminars in Immunology*. 2013. p. 469–84.
139. Kawaguchi Y, Hara M, Wright TM, Rodnan G, Lipinski E, Luksick J, et al. Endogenous IL-1alpha from systemic sclerosis fibroblasts induces IL-6 and PDGF-A. *J Clin Invest* [Internet]. 1999;103(9):1253–60.

140. Youngman KR, Simon PL, West G a, Cominelli F, Rachmilewitz D, Klein JS, et al. Localization of intestinal interleukin 1 activity and protein and gene expression to lamina propria cells. *Gastroenterology*. 1993;104:749–58.
141. Scarpa M, Kessler S, Sadler T, West G, Homer C, McDonald C, et al. The epithelial danger signal IL-1 α is a potent activator of fibroblasts and reactivator of intestinal inflammation. *Am J Pathol*. 2015;185(6):1624–37.
142. Boutin H, Lefevre RA, Horai R, Asano M, Iwakura Y, Rothwell NJ. Role of IL-1 α and IL-1 β in Ischemic Brain Damage. *Measurement*. 2001;21(15):5528–34.
143. Brough D, Denes A. Interleukin-1 α and brain inflammation. *IUBMB Life*. 2015;67(5):323–30.
144. Rosenkranz K, Tenbusch M, May C, Marcus K, Meier C. Changes in Interleukin-1 alpha serum levels after transplantation of umbilical cord blood cells in a model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Anat [Internet]*. 2012;195(2):1–6.
145. Mulcahy NJ, Ross J, Rothwell NJ, Loddick S a. Delayed administration of interleukin-1 receptor antagonist protects against transient cerebral ischaemia in the rat. *Br J Pharmacol*. 2003;140(August):471–6.
146. Kamari Y, Werman-Venkert R, Shaish A, Werman A, Harari A, Gonen A, et al. Differential role and tissue specificity of interleukin-1alpha gene expression in atherogenesis and lipid metabolism. *Atherosclerosis [Internet]*. 2007;195(1):31–8.
147. Ridker, P.M., Danielson, E., Fonseca F.A. et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein - An analysis. Vol. 359, *N Engl J Med*. 2008. p. 2195–207.
148. Fassett RG, Robertson IK, Ball MJ, Geraghty DP, Coombes JS. Effects of atorvastatin on biomarkers of inflammation in chronic kidney disease. *Clin Nephrol [Internet]*. 2014;81(2):75–85.
149. Tassi S, Carta S, Delfino L, Caorsi R, Martini A, Gattorno M, et al. Altered redox state of monocytes from cryopyrin-associated periodic syndromes causes accelerated IL-1beta secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]*. 2010;107(21):9789–94.
150. Goldbach-Mansky R, Dailey NJ, Canna SW, Gelabert A, Jones J, Rubin BI, et al. Neonatal-Onset Multisystem Inflammatory Disease Responsive to Interleukin-1 β Inhibition. *N Engl J Med [Internet]*. 2006;355(6):581–92.
151. Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J. NALP3 forms an IL-1 β -processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity*. 2004;20(3):319–25.
152. Hoffman HM, Throne ML, Amar NJ, Sebai M, Kivitz AJ, Kavanaugh A, et al. Efficacy and safety of riloncept (Interleukin-1 Trap) in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes: Results from two sequential placebo-controlled studies. *Arthritis Rheum*. 2008;58(8):2443–52.
153. Lachmann HJ, Kone-Paut I, Kuemmerle-Deschner JB, Leslie KS, Hachulla E, Quartier P, et al. Use of canakinumab in the cryopyrin-associated periodic syndrome. *N Engl J Med*. 2009;360:2416–25.

154. Kuemmerle-Deschner JB, Hachulla E, Cartwright R, Hawkins PN, Tran TA, Bader-Meunier B, et al. Two-year results from an open-label, multicentre, phase III study evaluating the safety and efficacy of canakinumab in patients with cryopyrin-associated periodic syndrome across different severity phenotypes. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2011;70(12):2095–102.
155. Mertens M, Singh JA. Anakinra for rheumatoid arthritis: a systematic review. *J Rheumatol* [Internet]. 2009;36(6):1118–25.
156. Alten R, Gomez-Reino J, Durez P, Beaulieu A, Sebba A, Krammer G, et al. Efficacy and safety of the human anti-IL-1 β monoclonal antibody canakinumab in rheumatoid arthritis: results of a 12-week, Phase II, dose-finding study. *BMC Musculoskelet Disord* [Internet]. 2011;12:153.
157. So A, De Smedt T, Revaz S, Tschopp J. A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2007;9(2):R28.
158. Schlesinger N, Alten RE, Bardin T, Schumacher HR, Bloch M, Gimona A, et al. Canakinumab for acute gouty arthritis in patients with limited treatment options: results from two randomised, multicentre, active-controlled, double-blind trials and their initial extensions. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2012;71(11):1839–48.
159. So A, De Meulemeester M, Pikhak A, Yucel AE, Richard D, Murphy V, et al. Canakinumab for the treatment of acute flares in difficult-to-treat gouty arthritis: Results of a multicenter, phase II, dose-ranging study. *Arthritis Rheum*. 2010;62(10):3064–76.
160. Schlesinger N, Mysler E, Lin H-Y, De Meulemeester M, Rovensky J, Arulmani U, et al. Canakinumab reduces the risk of acute gouty arthritis flares during initiation of allopurinol treatment: results of a double-blind, randomised study. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(7):1264–71.
161. Terkeltaub R, Sundry JS, Schumacher HR, Murphy F, Bookbinder S, Biedermann S, et al. The interleukin 1 inhibitor riloncept in treatment of chronic gouty arthritis: results of a placebo-controlled, monosequence crossover, non-randomised, single-blind pilot study. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(10):1613–7.
162. Gicquel T, Robert S, Loyer P, Victoni T, Bodin A, Ribault C, et al. IL-1 β production is dependent on the activation of purinergic receptors and NLRP3 pathway in human macrophages. *FASEB J*. 2015;29(10):4162–73.
163. Thomas HE, Irawaty W, Darwiche R, Brodnicki TC, Santamaria P, Allison J, et al. IL-1 Receptor Deficiency Slows Progression to Diabetes in the NOD Mouse. *Diabetes*. 2004;53(1):113–21.
164. Sumpter KM, Adhikari S, Grishman EK, White PC. Preliminary studies related to anti-interleukin-1 β therapy in children with newly diagnosed type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2011;12(7):656–67.
165. Moran A, Bundy B, Becker DJ, DiMeglio L a, Gitelman SE, Goland R, et al. Interleukin-1 antagonism in type 1 diabetes of recent onset: two multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trials. *Lancet* [Internet]. 2013;381(9881):1905–15.

166. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Vølund A, Ehses JA, Seifert B, et al. Interleukin-1-Receptor Antagonist in Type 2 Diabetes Mellitus. *N Engl J Med* [Internet]. 2007;356(15):1517–26.
167. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Ehses JA, Donath MY, Mandrup-Poulsen T. Sustained effects of interleukin-1 receptor antagonist treatment in type 2 diabetes. *Diabetes Care* [Internet]. 2009;32(9):1663–8.
168. Timper K, Seelig E, Tsakiris DA, Donath MY. Safety, pharmacokinetics, and preliminary efficacy of a specific anti-IL-1alpha therapeutic antibody (MABp1) in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* [Internet]. 2015;29(7):955–60.
169. Abbate A, Kontos MC, Grizzard JD, Biondi-Zoccai GGL, Van Tassell BW, Robati R, et al. Interleukin-1 Blockade With Anakinra to Prevent Adverse Cardiac Remodeling After Acute Myocardial Infarction (Virginia Commonwealth University Anakinra Remodeling Trial [VCU-ART] Pilot Study). *Am J Cardiol*. 2010;105(10).
170. Abbate A, Van Tassell BW, Biondi-Zoccai G, Kontos MC, Grizzard JD, Spillman DW, et al. Effects of interleukin-1 blockade with anakinra on adverse cardiac remodeling and heart failure after acute myocardial infarction [from the virginia commonwealth university-anakinra remodeling trial (2) (vcu-art2) pilot study]. *Am J Cardiol*. 2013;111(10):1394–400.
171. Ikonomidis I, Lekakis JP, Nikolaou M, Paraskevaidis I, Andreadou I, Kaplanoglou T, et al. Inhibition of interleukin-1 by anakinra improves vascular and left ventricular function in patients with rheumatoid arthritis. *Circulation*. 2008;117(20):2662–9.
172. Kondo M, Tahara A, Hayashi K, Abe M, Inami H, Ishikawa T, et al. Renoprotective effects of novel interleukin-1 receptor-associated kinase 4 inhibitor AS2444697 through anti-inflammatory action in 5/6 nephrectomized rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2014;909–19.
173. Shahzad K, Bock F, Dong W, Wang H, Kopf S, Kohli S, et al. Nlrp3-inflammasome activation in non-myeloid-derived cells aggravates diabetic nephropathy. *Kidney Int* [Internet]. 2015;87(1):74–84.
174. Hung AM, Ellis CD, Shintani A, Booker C, Ikizler TA. IL-1 β receptor antagonist reduces inflammation in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(3):437–42.
175. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Identifier NCT02278562, Nutrition, Inflammation and Insulin Resistance in End Stage Renal Disease-Aim 2 (INSPIRED); October 28, 2014 [cited 2017 Apr 22].

7. Eigene Publikationen

Zewinger S, Jennings RT, Jankowski V, Alansary D, Klug M, Triem S, Petrakis I, Selejan S, Paschen A, Herter T, Maack C, Sester M, Sester U, Jahnen-Dechent W, Rohrer L, März W, Jankowski J, Kopf M, Latz E, Niemeyer BA, Fliser D, Laufs U, Speer T. Apolipoprotein C-III induces systemic inflammation by activating the NLRP3 inflammasome. *Immunity*. In Revision.

8. Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Danilo Fliser für die Vergabe des Themas und der Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe mitzuarbeiten.

Weiterhin danke ich meinem Betreuer der Arbeit Dr. Dr. Timotheus Speer für die Geduld, die er mir, trotz seiner Belastung in Klinik und Forschung, entgegenbrachte, sowie für die Unterstützung und Korrekturhilfe bei der Ausarbeitung der Arbeit.

Besonderer Dank gilt den Biologinnen sowie der MTA des Laborteams, M.Sc. Mira Klug, M. Sc. Sarah Triem sowie Claudia Noll für die Einarbeitung und Unterstützung bei der experimentellen Arbeit und die geduldige Hilfe bei Problemlösungen.

Nicht zuletzt danke ich meinen Großeltern, Eltern und Geschwistern, sowie allen Freunden welche in anstrengenden Phasen immer für mich da waren.

Außerdem geht ein großer Dank an meine Partnerin Leire Almena Sebastian, für die Unterstützung und den Mut mit dem sie immer hinter mir stand.