

Lehrstuhl für Translationale Kardiorenale Medizin

Universität des Saarlandes

Homburg/Saar

Univ.-Prof. Dr. med. Dr. sc. nat. Thimoteus Speer

**Die Rolle von Dickkopf-3 als Mediator einer reziproken
Organschädigung von Lunge und Niere**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2022

vorgelegt von:

Gregor Hütter

Geboren am 06.04.1990 in Marl

Tag der Promotion: 06.12.2022

Dekan: Univ.-Prof.Dr.med Michael D. Menger

Berichterstatter: Univ.-Prof.Dr.med.Dr.sc.nat. Thimoteus Speer

Univ.-Prof.Dr.med Hans-Joachim Schäfers

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten wurden in Form einer Originalarbeit publiziert (*Schunk et al. Kidney Int 2021*). Bei der Durchführung der Arbeit und bei der Auswertung der Daten wurde ich von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. sc. nat. Thimoteus Speer und Herrn Dr. med. Stefan J. Schunk betreut. Der Text und die Abbildungen dieser Dissertationsschrift sind daher in weiten Teilen eine deutsche Reproduktion der Originalarbeiten.

1	Abbildungsverzeichnis	6
2	Tabellenverzeichnis	8
3	Abkürzungsverzeichnis	9
4	Zusammenfassung.....	13
5	Abstract	14
6	Einleitung	16
6.1	Chronische Nierenerkrankung (CKD).....	16
6.1.1	Definition und Klassifikation.....	16
6.1.2	Epidemiologie	17
6.1.3	Ursachen	17
6.1.4	Prognose	18
6.2	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD).....	18
6.2.1	Definition und Klassifikation.....	18
6.2.2	Epidemiologie	19
6.2.3	Ursachen	20
6.2.4	Prognose	21
6.3	Wnt/β-Catenin Signalweg und Dickkopf-Proteinfamilie.....	22
6.3.1	Wnt/ β -Catenin Signalweg	22
6.3.2	Dickkopf-Proteinfamilie.....	23
6.3.3	Renale Effekte von DKK3.....	24
6.4	Zielsetzung.....	25
7	Methodenteil	26
7.1	Materialien und Chemikalien	26
7.1.1	Materialien	26
7.1.2	Reagentien und Kits	27
7.2	Bronchoalveoläre Lavage (BALF), Organentnahme, Blutentnahme und Euthanasie.....	30
7.3	Immunfluoreszenzfärbung ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex-Technik) mit Tyramidverstärkung.....	30
7.3.1	Durchführung.....	31
7.4	Siriusrot-Färbung	32
7.5	Harnstoff- und Kreatinin Messung mit dem Beckman Coulter AU480	33
7.6	Multiplex Cytokin Array.....	33
7.6.1	Durchführung.....	34
7.7	ELISA für die Detektion von humanem DKK3 im Urin	35
7.8	Mausstämme und Tiermodelle	36

7.8.1	Adeninmodell	36
7.8.2	Rauchmodell.....	37
7.9	COSYCONET	37
7.10	Statistische Auswertung.....	38
8	Ergebnisse	40
8.1	Auswirkungen renaler Dysfunktion auf eine Lungenschädigung	40
8.1.1	Outline der Tierexperimente	40
8.1.2	Zellzahl und Entzündungszellen in der BALF	41
8.1.3	Proinflammatorische Zytokine in BALF und Serum.....	43
8.1.4	Immunzellen im Lungengewebe	46
8.1.5	Harnstoff und Kreatinin im Serum.....	48
8.1.6	Nierenfibrose	49
8.1.7	Renale Neutrophilen-Akkumulation	50
8.1.8	Renale DKK3-Expression.....	52
8.1.9	Einfluss von DKK3 auf die Entstehung von Mikroinflammation und Nierenfibrose	54
8.2	Klinische Studie.....	58
8.2.1	Outline der Analysen in COSYCONET	58
8.2.2	Baseline-Charakteristika.....	59
8.2.3	Assoziation zwischen Urin-DKK3 und Änderung der FEV ₁	61
8.2.4	Assoziation zwischen Urin-DKK3 und dem Exazerbationsrisiko	64
8.2.5	Assoziation zwischen Urin-DKK3 und der körperlichen Leistungsfähigkeit.....	64
8.3	DKK3 und Progression der Niereninsuffizienz.....	65
8.3.1	Assoziation zwischen Urin-DKK3 und Änderung der eGFR	65
8.3.2	DKK3 und Trajekturen der eGFR	69
8.3.3	Initiale Proteinurie, eGFR und Trajekturen der eGFR	71
8.4	Urin-DKK3 und Mortalität.....	72
9	Diskussion	74
9.1.1	Mechanismen der Fibroseentstehung bei CKD	74
9.1.2	Die Rolle des Wnt/ β -Catenin Signalwegs bei der Entstehung einer Nierenfibrose	76
9.1.3	Rolle von DKK3 im Wnt/ β -Catenin Signalweg.....	80
9.1.4	Rolle von DKK3 bei der Nierenschädigung	81
9.1.5	Rolle des Wnt/ β -Catenin Signalwegs bei COPD	82
9.1.6	Zusammenhang zwischen COPD und CKD	83
9.1.7	Therapeutische Ansatzpunkte durch Modulation des Wnt/ β -Catenin Signalwegs	85
9.1.8	Ausblick	87
10	Publikation	88

11	Danksagung	89
12	Literaturverzeichnis	90

1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klassifikation der CKD anhand der eGFR und dem Grad der Albuminurie.	16
Abbildung 2: Wnt Signalweg in Abwesenheit und Anwesenheit von Wnt-Liganden sowie die Inhibierung durch Dickkopfproteine.....	23
Abbildung 3: Struktur der Dickkopfproteine.....	24
Abbildung 4: Ablauf der Immunfluoreszenzfärbung.	31
Abbildung 5: Ansicht einer TE1010 Smoking Machine im betriebsbereiten Zustand.....	37
Abbildung 6: Outline der Experimente.	40
Abbildung 7: Totale Zellzahl in der BALF.....	41
Abbildung 8: Neutrophilenzahl in der BALF.	42
Abbildung 9: Lymphozytenzahl in der BALF.	43
Abbildung 10: Darstellung der Messung Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine in BALF und Serum.....	44
Abbildung 11: Quantifizierung Ly-6B positiver Zellen im Lungengewebe.	46
Abbildung 12: Ly-6B Färbung im Lungengewebe.	46
Abbildung 13: Quantifizierung von CD3+ Zellen im Lungengewebe in der Lunge.....	47
Abbildung 14: CD3-Färbung Zellen im Lungengewebe in der Lunge.	47
Abbildung 15: Quantifizierung von Kreatinin im Serum.....	48
Abbildung 16: Quantifizierung von Harnstoff im Serum.	48
Abbildung 17: Auswertung Siriusrot gefärbter Areale.	49
Abbildung 18: Histologische Darstellung der Nierenfibrose in der Siriusrotfärbung.....	49
Abbildung 19: Auswertung der Ly6G Expression im Nierengewebe.....	50
Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung der Ly6G Expression im Nierengewebe.....	51
Abbildung 21: Auswertung der DKK3 Expression im Nierengewebe.....	52
Abbildung 22: Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung der DKK3 Expression im Nierengewebe. G = Glomerulus.....	53
Abbildung 23: Quantifizierung von Immunzellen in der BALF <i>Dkk3</i> -defizienter Mäuse und korrespondierender Wildtypmäuse drei Wochen nach kombinierter Zigarettenrauchinhalation und Adenindiät.	55
Abbildung 24: Quantifizierung von Serum-Kreatinin.	56
Abbildung 25: Quantifizierung von Serum-Harnstoff.....	56
Abbildung 26: Quantifizierung der Fibrose anhand der Siriusrotfärbung.	57
Abbildung 27: Histologische Darstellung der Nierenfibrose in der Siriusrotfärbung.....	57
Abbildung 28: Outline der Studie.	58
Abbildung 29: Einteilung der der FEV ₁ mittels Trajektoren in 3 Gruppen.	61

Abbildung 30: Zusammenhang zwischen Urin-DKK3 und dem Risiko für die Zuordnung in die Trajektorengruppe C FEV ₁ . Dargestellt ist die Odds ratio (OR) mit den entsprechenden 95% Konfidenzintervallen.....	62
Abbildung 31: Änderung der eGFR (%) in 6 Monaten anhand der initialen DKK3 Konzentration.....	65
Abbildung 32: Änderung der eGFR (%) nach 18 Monaten anhand der initialen DKK3 Konzentration.....	67
Abbildung 33: Darstellung des Verlaufes der eGFR über die Zeit mithilfe von Trajektorien.	69
Abbildung 34: Zusammenhang zwischen der DKK3-Konzentration im Urin und dem Risiko für eine fallende eGFR im Verlauf (Trajektorengruppe C).	70
Abbildung 35: Kaplan-Meier Kurve für das prozentuale Überleben anhand der initialen DKK3-Konzentration.	72
Abbildung 36: Darstellung der unterschiedlichen Einflüsse des Wnt/ β -Catenin Signalings auf die Mechanismen der Entstehung einer Nierenfibrose.	78
Abbildung 37: Effekte von DKK3 als Stressmediator auf Entstehung und Progression der Nierenfibrose.....	79

2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Schweregradeinteilung der COPD anhand der postbronchodilatatorischen FEV ₁	19
Tabelle 2: Materialien.....	26
Tabelle 3: Reagentien und Kits.....	29
Tabelle 4: Zytokinkonzentrationen in der BALF.	45
Tabelle 5: Baseline-Charakteristika der Probanden in der COSYCONET Kohorte.	60
Tabelle 6: Logistische Regressionsanalyse zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen der Urin-DKK3-Konzentration und der Zuordnung zur FEV ₁ Trajektorengruppe C (abfallende FEV ₁).....	62
Tabelle 7: Zusammenhang zwischen eGFR und Proteinurie und dem Risiko für eine abfallende FEV ₁	63
Tabelle 8: Zusammenhang zwischen Urin-DKK3 und dem Risiko einer Exazerbation der COPD im Follow-up.	64
Tabelle 9: Zusammenhang zwischen Urin-DKK3 und der körperlichen Leistungsfähigkeit.	64
Tabelle 10: Prozentuale Veränderungen der eGFR nach 6 Monaten.....	66
Tabelle 11:Änderung der eGFR in ml/min/1,73m ² nach 6 Monaten.....	66
Tabelle 12: Zusammenhang zwischen Urin-DKK3 und der prozentualen Veränderung der eGFR nach 18 Monaten.....	68
Tabelle 13: Zusammenhang zwischen Urin-DKK3 und der Veränderung der eGFR in ml/min/1,73m ² nach 18 Monaten.	68
Tabelle 14: Logistische Regressionsanalyse für den Zusammenhang zwischen der Urin DKK3-Konzentration und dem Risiko für eine abfallende eGFR im Verlauf (Trajektorengruppe C).....	70
Tabelle 15: Logistische Regressionsanalyse für den Zusammenhang zwischen Baseline-Proteinurie der eGFR Gruppe C (fallende eGFR).....	71
Tabelle 16: Logistische Regressionsanalyse für den Zusammenhang zwischen logarithmierter Baseline-eGFR und der eGFR Gruppe C (fallende eGFR). ...	71
Tabelle 17: Cox Regressionsanalyse zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen der DKK3-Konzentration im Urin und der Mortalität.....	73
Tabelle 18: Medikamentöse Effektoren des Wnt/β-Catenin Signalwegs.	86

3 Abkürzungsverzeichnis

6 MWD Test	6 Minutes Walking Distance Test
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
ADPKD	Autosomal–dominante polyzystische Nierenerkrankung
AK	Antikörper
AKI	Acute Kidney Injury
ANOVA	Analysis of variance
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APC	Adenomatous Polyposis Coli
BAL	Bronchoalveolar Lavage
BALF	Bronchoalveolar lavage fluid
BIC	Bayesian information criterion
BMI	Body Maß Index
BODE–Index	Body-Mass Index,Airflow Obstruction,Dyspnea and exercise capacity in Chronic Obstructive Pulmonary Disease
BOLD	Burden of Obstructive Lung Disease
Borg-CR10-Skala	Borg-Category Ratio Skala
CAT	COPD Assessment Test
CD	Cluster of Differentiation
CDK	Cycline-dependent kinase
CK1	Casein Kinase 1
CKD	Chronic Kidney Disease
CO	Kohlenstoffmonoxid
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
COSYCONET	German COPD and Systemic Consequences - Comorbidities Network
CRD	Cysteine-riche domains
CVD	Cardiovascular Disease

CVE	Cardiovascular Events
DALYs	Disability Adjusted Life Years
DAPI	4'6-Diamidin-2-phenylindol
DKK	Dickkopf
DNA	Desoxyribonucleinacid
dvl	Dishevelled protein
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	enhanced green fluorescent protein
eGFR	estimated Glomerular Filtration Rate
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESRD	End-Stage-Renal-Disease
EZM	Extrazelluläre Matrix
Fab	Fragment antigen binding
Fc	Fragment crystallizable
FEV ₁	Forced Expiratory Pressure in 1 Second
FGFR	Fibroblast growth factor
FoxO3	Forkhead-box-protein O3
FVC	Forced vital capacity, forcierte exspiratorische Vitalkapazität
FZD	Frizzled Protein
G-CSF	Granulocytes-colony stimulating factor
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 beta
GTP	Guanosintriphosphat
HK2	Human embryonic kidney cells
HR	Hazard Ratio
HRP	Horseradisch peroxidase
HZV	Herz-Zeit-Volumen
IDI	integrierte Diskriminationsverbesserung
IDS	Isotopenverdünnungsmassenspektroskopie

IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
IRI	Ischaemia-reperfusion-injury
kDa	Kilo Dalton
KDIGO	Kidney Disease: Improve Global Outcome
KHK	Koronare Herzkrankheit
KI	Konfidenzintervall
LED	Light-emitting diode
LiCl	Lithiumchlorid
LRP6	Lipoprotein receptor related-Protein 6
Ly-6B	Lymphocyte Antigen 6 B
MIP-2	Macrophage inflammatory protein 2
MMP-12	Matrix-metalloproteinase-12
mMRC	Modified medical research council dyspnea scale
mRNA	Messenger RNA
NIST	National Institute of Standards and Technology
NRI	Nettoreklassifizierungsanalyse
OR	Odds Ratio
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet derived growth factor
pH	Pondus hydrogenii
PKD1	Polycystic kidney disease
R-PE	Streptavidin-Phycoerythrin
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron System
rpm	Revolutions per minute
RRT	Renal Replacement Therapy

siRNA	Small interfering RNA
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
SPSS	Statistical package for the social science
STOP-IgAN-Studie	Supportive Versus Immunosuppressive Therapy for the Treatment of Progressive IgA Nephropathy Trial
TBS	Tris-puffered Saline
TCF-LEF	T-Cell-factor/lymphoid-enhancing binding factor
TECs	Tubular-epithelilal cells
TGF- β	Transforming growth factor β
TLCO	Transfer factor of the lung for carbin monoxide, Kohlenmonoxid-Transferfaktor
TMD	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
TSP	Total suspendend particulate
UO	Unilateral Ureter Obstruction
V.	Vena
Vv.	Venae
WHO	World Health Organisation
α -SMA	Alpha smooth muscle actin

4 Zusammenfassung

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) und die chronische Nierenerkrankung (CKD) stellen als Erkrankungen eine wesentliche Belastung der Gesundheitssysteme weltweit dar. Ein Hauptgrund dafür ist die weltweit zunehmende Prävalenz. Beide Entitäten sind assoziiert mit einer hohen Komplikations- und Sterberate sowie dem Auftreten von Komorbiditäten. Trotz dieser massiven Einflüsse auf das Gesundheitssystem sind die Zusammenhänge zwischen Erkrankungen der Lungen und denen der Nieren nicht hinreichend untersucht. Somit ist es unklar, ob eine Abnahme der Nierenfunktion bei Patienten mit COPD eine Progredienz der COPD verursachen kann und vice versa. Das Protein Dickkopf-3 wurde bereits als wichtiger Mediator der renalen Fibrose identifiziert. Im Zuge dieser Erkenntnisse ergibt sich die Vermutung, dass DKK3 an pathophysiologischen Prozessen zwischen COPD und CKD beteiligt sein könnte. In dieser Studie wurde der Einfluss von Nierenerkrankungen auf die Lungenfunktion anhand der DKK3 Expression untersucht.

Dies geschah in zwei Schritten. Zunächst wurde im Tierexperiment an Mäusen eine kombinierte Nieren- und Lungenschädigung hervorgerufen zur Beurteilung des Einflusses einer Nierenschädigung auf die Funktion der Lungen. In einem zweiten Schritt wurde die Urin-DKK3-Konzentration von COPD-Patienten der COSYCONET Kohorte gemessen, um das Risiko einer Progression der COPD bei gleichzeitigem Vorliegen einer CKD zu kalkulieren.

Hierfür wurden C57Bl/6J und *Dkk3*^{-/-} Mäuse verschiedenen Schädigungsmodellen zugeführt, um die Auswirkungen einer CKD auf die COPD zu erfassen. In den Versuchstieren wurde entweder eine CKD mittels Adenindiät oder eine COPD durch Rauchexposition induziert. Eine dritte Gruppe wurde sowohl der Adenindiät als auch einer Rauchexposition - zur Simulation einer kombinierten Lungen- und Nierenschädigung - ausgesetzt.

Bei den Versuchstieren, die einer kombinierten Lungen- und Nierenschädigung zugeführt wurden, war eine deutliche Zunahme systemischer und pulmonaler Inflammation zu beobachten im Gegensatz zu den Ergebnissen bei alleiniger Rauchexposition. Umgekehrt konnte ein Zusammenhang zwischen Zigarettenrauchexposition und der vermehrten Expression von DKK3 und damit auch auf die Zunahme renaler Fibrose festgestellt werden. Der DKK3-Knockout reduzierte sowohl die renale Schädigung als auch die pulmonale Inflammation.

Nachfolgend wurde die Konzentration von DKK3 im Urin von Probanden der COPD-Kohorte COSYCONET gemessen, um die Progression der COPD in Bezug auf die Nierenfunktion abschätzen zu können. Es zeigte sich, dass initial erhöhte Konzentrationen von DKK3 im Urin der Probanden mit einer Abnahme der Funktionsparameter FEV₁ und eGFR im Follow-up assoziiert waren. Weiterhin waren höhere Ausgangskonzentrationen von DKK3 mit einem

höheren Exazerbationsrisiko, einer Abnahme der körperlichen Belastungsfähigkeit und einer erhöhten Sterblichkeit assoziiert.

Diese Ergebnisse weisen nicht nur auf einen Zusammenhang zwischen Erkrankungen von Lungen und Nieren hin, sondern zeigen auch, dass eine Progression der CKD eine Verschlechterung der Lungenfunktion bedingen kann. Weiterhin wurde DKK3 als möglicher prädiktiver Marker für eine Progression der COPD bei gleichzeitig vorliegender CKD entdeckt. Dementsprechend könnte die Messung von DKK3 im Urin möglicherweise benutzt werden, um betroffene Patienten zu identifizieren und präventive Therapieansätze zu etablieren.

5 Abstract

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and chronic kidney disease (CKD) represent a major burden on healthcare systems worldwide. With steadily increasing prevalence throughout the world, both conditions are associated with a high frequency of complications and mortality, as well as the occurrence of comorbidities. Despite that substantial impact on healthcare systems, the pathophysiological relationship between lung and kidney failure remains widely undiscovered. Thus, it is unclear whether a decrease in kidney function in patients with COPD can cause worsening of lung function and vice versa. Recently, we found that Dickkopf-3 plays an important role in the development of kidney fibrosis and urinary DKK3 concentrations identify patients at risk for CKD progression. In this study, the role of urinary DKK3 as a marker for reciprocal lung and kidney injury was explored.

In animal experiments, C57Bl/6J and *Dkk3*^{-/-} mice were used in four experimental groups. One group was exposed to cigarette smoke to induce lung dysfunction, another was fed with adenine to induce kidney failure. A third group was exposed to both, adenine diet and smoke exposure to create a combined animal model for lung and kidney failure. Lastly an untreated group on a standard diet and normal air acted as a control.

We observed a significant increase in systemic and pulmonary inflammation in mice exposed to combined lung and kidney injury as compared to cigarette smoke exposure alone. Interestingly, there was evidence that cigarette smoke increases renal fibrosis by upregulating expression of DKK3. Knockout of DKK3 reduced kidney injury and pulmonary inflammation alike.

In a second step, we measured urinary DKK3 concentrations in COPD patients of the COSYCONET cohort and assessed its association with changes of lung and kidney function (FEV₁ and eGFR) over a follow-up of 37 months. We found that increased baseline concentrations of DKK3 in the urine of patients were associated with declining FEV₁ and eGFR. Besides that, higher baseline urinary DKK3 concentrations predicted a higher risk of

exacerbation and declining exercise capacity. In line with these findings, high baseline DKK3 was also associated with higher mortality in patients of COSYCONET cohort.

These findings provide strong evidence of a link between lung and kidney disease and that progressive kidney failure causes subsequent worsening of pulmonary function. These results suggest, that assessing urinary DKK3 may be useful to identify COPD patients at high risk for progression for both conditions. Accordingly, DKK3 could be used to establish possible preventive strategies for these patients in the future.

6 Einleitung

6.1 Chronische Nierenerkrankung (CKD)

6.1.1 Definition und Klassifikation

Die chronische Nierenerkrankung ist nach KDIGO (Kidney Disease: Improve Global Outcome)-Kriterien definiert als Veränderung der Nierenstruktur- oder funktion, die länger als drei Monate besteht. Zur Diagnosestellung herangezogen werden eine eGFR (estimated Glomerular Filtration Rate) $<60\text{ml/min/1,73m}^2$ als laborchemisches Korrelat der Nierenfunktionseinschränkung und verschiedene Marker der Nierenschädigung, wie Albuminurie, pathologische histologische Befunde, morphologische Auffälligkeiten in der Bildgebung, Auffälligkeiten im Urinsediment sowie Elektrolytverschiebungen im Blut als auch eine Nierentransplantation in der Anamnese. Die Einteilung in die fünf Stadien der CKD erfolgt anhand der eGFR sowie dem Grad der Albuminurie (Abbildung 1).[60]

Prognosis of CKD by GFR and albuminuria category

Prognosis of CKD by GFR and Albuminuria Categories: KDIGO 2012				Persistent albuminuria categories Description and range		
				A1	A2	A3
				Normal to mildly increased	Moderately increased	Severely increased
				<30 mg/g <3 mg/mmol	30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	>300 mg/g >30 mg/mmol
GFR categories (ml/min/ 1.73 m ²) Description and range	G1	Normal or high	≥90			
	G2	Mildly decreased	60-89			
	G3a	Mildly to moderately decreased	45-59			
	G3b	Moderately to severely decreased	30-44			
	G4	Severely decreased	15-29			
	G5	Kidney failure	<15			

Green: low risk (if no other markers of kidney disease, no CKD); Yellow: moderately increased risk; Orange: high risk; Red, very high risk.

Abbildung 1: Klassifikation der CKD anhand der eGFR und dem Grad der Albuminurie.
Entnommen aus Kidney disease: Improving global outcomes (KDIGO) CKD work group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease [60].

6.1.2 Epidemiologie

2017 lag die Prävalenz der CKD bei weltweit 697,5 Millionen Fällen ($\approx 9,1\%$ der Weltbevölkerung). Die Prävalenz in Deutschland betrug in diesem Zeitraum ca. 9 Millionen Fälle. Die altersstandardisierte Prävalenz der CKD war bei Frauen (8,8-10,2%) 1,3-fach höher als bei Männern (6,8-7,9%). Dahingegen war die Inzidenz für die Notwendigkeit einer Dialysebehandlung (RRT: Renal Replacement Therapy) oder Transplantation bei Männern (12,6-14,9%) 1,47-fach höher als bei Frauen (7,9-9,3%). Die weltweite Prävalenz der CKD stieg zwischen 1990-2017 um 29,3%. Die weltweite Inzidenz von RRT und Nierentransplantation über alle Altersgruppen stieg in diesem Zeitraum um 43,1% (40,5-45,8%) und 34,4% (29,7-38,9%). Hierbei ist der Anstieg des Einsatzes der Dialysebehandlung unter anderem auf das steigende Alter der Gesamtbevölkerung zurückzuführen. Trotz der steigenden Dialysebehandlungen ist die Verfügbarkeit von RRT in vielen Regionen der Welt mit hohen Zahlen von CKD eingeschränkt. Weltweit waren 1,2 Millionen Todesfälle im Jahr 2017 auf CKD zurückzuführen und 1,4 Millionen Todesfälle hatten eine kardiovaskuläre Diagnose (CVD: Cardiovascular Disease), der eine eingeschränkte Nierenfunktion vorausgegangen war. Damit stieg die CKD von Platz 17 der weltweit häufigsten Todesursachen in 1990 auf Platz 12 in 2017.[8]

6.1.3 Ursachen

Aufgrund ethnischer Unterschiede, aber auch durch die Struktur und Qualität des jeweiligen Gesundheitssystems sind Inzidenz, Prävalenz und Progression der CKD in verschiedenen Ländern unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Ursachen der CKD sind nicht nur vielfältig, sie unterliegen auch regionalen Unterschieden. Man kann sie unterteilen in primäre Erkrankungen der Niere (z.B. Glomerulonephritiden, tubulointerstitielle Erkrankungen) und sekundäre Ursachen, die konsekutiv eine Nierenschädigung induzieren (z.B. Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie). Die häufigsten Ursachen einer CKD in den Industrienationen sind der Diabetes mellitus und die arterielle Hypertonie. Ungefähr 40% aller Patienten mit Diabetes mellitus entwickeln im Lauf ihres Lebens eine CKD. Diabetes ist für 30-50% aller CKD Fälle unter Erwachsenen weltweit verantwortlich [119] und es wird vermutet, dass diese Zahl bis 2030 um bis zu 69% in Ländern mit hohem Einkommen und um bis zu 20% in Ländern mit mittlerem und niedrigem Einkommen steigen wird [119]. Zur Jahrtausendwende wurde die Prävalenz von arterieller Hypertonie auf mehr als ein Viertel der erwachsenen Bevölkerung geschätzt; bis 2025 wird mit einem Anstieg um bis zu 60% gerechnet. Neben Glomerulonephritiden und Autoimmunerkrankungen gibt es viele singuläre und polygene Ursachen für eine CKD. Diese machen allerdings nur einen geringen Anteil der Gesamtprävalenz aus. Einige dieser Erkrankungen betreffen die Anatomie des Urogenitaltrakts und sind bereits pränatal von Bedeutung (z.B. VUR, ARPKD). Andere

manifestieren sich erst in späteren Lebensjahren, z.B. die ADPKD. Auch genetische Polymorphismen und Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) rücken immer weiter in den Vordergrund, da sie zu einer Beschleunigung einer bestehenden CKD beitragen könnten. Umwelteinflüsse können eine Änderung der Epigenetik hervorrufen, die möglicherweise Änderungen des Phänotyps bewirken. DNA-Methylierung, Histonmodifikationen und Einfluss auf Abbau der Telomerasen und damit der Telomere spielen eine wichtige Rolle, sowohl in der normalen Entwicklung als auch im Auftreten und in der Progredienz, Koexistenz und Aggravation von Krankheiten, wie z.B. dem häufigen gemeinsame Auftreten von Übergewicht und Typ 2 Diabetes. [119] [31]

6.1.4 Prognose

Patienten mit CKD haben ein hohes Risiko für einen fortschreitenden und irreversiblen Verlust der Nierenfunktion bis hin zum terminalen Nierenversagen (ESRD: End-Stage-Renal-Disease) mit Notwendigkeit der Dialysebehandlung oder Nierentransplantation. Da das klinische Erscheinungsbild der CKD sehr variabel ist, ist es schwierig, den individuellen Verlauf der CKD vorherzusagen. Bei manchen Patienten kann die CKD stabile Verläufe annehmen, während bei anderen Patienten mit rapider Verschlechterung und schweren Komplikationen gerechnet werden muss. Das Auftreten von Proteinurie, Albuminurie und sinkender eGFR ist assoziiert mit einer schlechten Prognose [60][3] [48]. Aber es gibt insgesamt wenige Marker, um den Verlauf der CKD prognostizieren zu können. Die Progression der Erkrankung und das Auftreten von CVE (Cardiovascular Events) ist abhängig von der Grunderkrankung, von nicht beeinflussbaren Faktoren, wie der ethnischen Zugehörigkeit [8], dem Geschlecht (Männer > Frauen) [109] [30] sowie der Nierenfunktion zum Zeitpunkt der Diagnose. Ebenfalls relevant sind beeinflussbare Faktoren, zu denen das Rauchen [82], die Proteinurie [48], und hoher Blutdruck [72] gehören. Erschwerend kommt hinzu, dass die CKD eine stark aggravierende Wirkung auf viele Erkrankungen hat, die nicht renaler Ursache sind. Hier sind vor allem kardiovaskuläre Erkrankungen zu nennen, für die die CKD einen bedeutsamen Risikofaktor darstellt [38]. Die CKD weist eine hohe Gesamtmortalität auf, welche mit abfallender Nierenfunktion ansteigt. Dabei ist die Haupttodesursache nicht die Dialysepflichtigkeit, sondern es sind kardiovaskuläre Erkrankungen, was sich dadurch zeigt, dass viele Patienten das Stadium der terminalen Niereninsuffizienz aufgrund von kardiovaskulären Ereignissen nicht erreichen [88][95], sondern vorher versterben.

6.2 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)

6.2.1 Definition und Klassifikation

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist gekennzeichnet durch eine persistierende, nicht durch Bronchodilatoren vollständig reversible Atemwegsobstruktion,

welche regelhaft progressiv verläuft und mit einer verstärkten Entzündungsreaktion der Atemwege, getriggert durch Noxen, wie Mikropartikel oder Gase, einhergeht. Die Reduktion des Atemflusses bei COPD ist charakterisiert als die Kombination aus einer obstruktiven Bronchiolitis und der zunehmenden Zerstörung des Lungenparenchyms (Emphysem), die individuell stärker oder geringer ausgeprägt sein können [40]. Die chronische Entzündungsreaktion verursacht strukturelle Veränderungen und Obstruktionen der Atemwege, während der Effekt auf das Lungenparenchym den Verlust der alveolären Verbindung zu den Atemwegen nach sich zieht, was die elastischen Rückstellkräfte der Lunge behindert. Beide Effekte gemeinsam verringern die Fähigkeit der Atemwege während der Expiration offen zu bleiben, welches zur Überblähung der Lungen unter Belastung führen kann. [40]

Die COPD wurde lange Zeit nach dem Schweregrad der Obstruktion, quantifiziert durch die Messung der FEV₁ mittels postbronchodilatatorischer Spirometrie (Tabelle 1), klassifiziert. Dieser Marker weist aber Schwächen hinsichtlich der stark variierenden Symptomatik auf, so dass es seit 2018 die Empfehlung gibt, die Klassifikation durch Fragebögen hinsichtlich der Symptomatik und durch die Anzahl an Exazerbationen pro Jahr einzuteilen. Die Exazerbationen werden durch die Anzahl an Krankenhausaufenthalten ermittelt und die Symptome durch validierte Fragebögen erfasst. Durch das Zusammenspiel dieser Instrumente gelingt eine Einstufung des Patienten in die entsprechenden GOLD-Stadien.[40]

Schweregradeinteilung anhand der postbronchodilatatorisch gemessenen FEV₁	Kriterium für Obstruktion FEV₁/FVC < LLN oder <70%
IV (sehr schwer)	FEV ₁ <30%
III (schwer)	FEV ₁ 30% - 49%
II (mittelgradig)	FEV ₁ 50% - 79%
I (leicht)	FEV ₁ ≥80%

Tabelle 1: Schweregradeinteilung der COPD anhand der postbronchodilatatorischen FEV₁. Entnommen aus Global Strategy for Diagnosis, Management, and Prevention of COPD. <http://goldcopd.org/> [116].

6.2.2 Epidemiologie

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist eine der häufigsten Todesursachen weltweit. War sie im Jahr 2000 noch an Platz 4 der weltweit ermittelten Todesursachen gelistet, konnte sie 2016 bereits auf Platz 3 gefunden werden [120]. 2017 waren 3,2 Millionen Todesfälle weltweit auf COPD zurückzuführen. Es wird geschätzt, dass bis 2040 die Zahl der Todesfälle auf 4,4 Millionen pro Jahr ansteigen wird [93][67]. Die Global Burden of Disease Daten aus dem Jahr 2015 schätzen die Prävalenz auf 174 Millionen Fälle weltweit [8]. Der

Anstieg ist einerseits der immer älter werdenden Weltbevölkerung geschuldet, andererseits dem weit verbreiteten Konsum von Tabak als Hauptrisikofaktor für die Entstehung einer COPD [116][67]. Die WHO warnt zudem, dass die globale Prävalenz der COPD unterschätzt wird, was zum einen an den unterschiedlichen Methoden bei der Datenerhebung (Spirometrie vs Symptomerhebung) liegt, zum anderen ist die Krankheit bei jungen Menschen und in Ländern mit niedrigem Einkommen unterdiagnostiziert [44] [45]. Die BOLD Studie nutzte standardisierte Verfahren zur Einschätzung der Prävalenz und zeigte, dass es hier erhebliche Unterschiede zwischen verschiedenen Ländern gibt. Die Prävalenz von COPD GOLD 1 oder höher war laut der BOLD-Studie signifikant unterschiedlich in verschiedenen Ländern und allgemein höher bei Männern als bei Frauen. Die Prävalenz für COPD GOLD 2 oder höher wurde mit durchschnittlich 10,1% beziffert. Auch hier zeigte sich eine höhere Prävalenz beim männlichen Geschlecht. Sie stieg aber auch mit zunehmendem Alter, unabhängig vom Geschlecht, an. Generell war die Prävalenz positiv korreliert mit Pack-Years (Zigarettenpackung pro Tag x Raucherjahre), was das Rauchen als stärksten Risikofaktor bekräftigt. Die Studie schätzt die weltweite Prävalenz von COPD GOLD 2 oder höher bei über Vierzigjährigen auf 9-10%. Für Deutschland liegt die geschätzte Prävalenz zwischen 5-10%.

Ergebnisse zu Krankenhauseinweisungen mit der Diagnose COPD oder exazerbierte COPD konnten zeigen, dass Deutschland zu den Ländern mit den meisten Einweisungen zählt. Eine Krankenhaussterblichkeit von 7% und 90-Tage-Mortalität von 15% waren das Ergebnis einer britischen Studie, was die Relevanz der COPD für die Belastung der Gesundheitssysteme weltweit nochmals hervorhebt [133].

6.2.3 Ursachen

Die COPD ist zumeist das Resultat jahrelanger Exposition gegenüber inhalativer Noxen. Sie hat verschiedene Risikofaktoren, von denen Tabakrauch der bekannteste ist. Das Auftreten und die Häufigkeit der unterschiedlicher Risikofaktoren variiert innerhalb verschiedener Populationen abhängig von Herkunftsland, Geschlecht, Einkommen und Exposition [15]. Rauchen ist nach WHO-Schätzung ursächlich für 73% der COPD-assoziierten Todesfälle in Ländern mit hohem Einkommen und für 40% in Ländern mit mittlerem und niedrigem Einkommen [76]. Da aber nicht alle Raucher eine COPD entwickeln, scheint es weitere Einflussfaktoren, zum Beispiel genetische Prädisposition, zu geben, für die Rauchen relevant ist. Aber auch epigenetische Veränderungen sind in der Pathogenese der COPD involviert [90]. Schätzungsweise 25-45% der COPD Patienten haben nie geraucht, aber ungefähr die Hälfte der Weltbevölkerung ist Rauch durch das Abbrennen von Biomasse als Brennstoff ausgesetzt. Die Exposition gegenüber Innen- als auch Außenluftverschmutzung, wie sie beim Abbrennen von Biomassen oder Kochen in schlecht belüfteten Räumen vorkommt, scheint ein erhebliches Risiko für die Entwicklung einer COPD zu bergen und bei ca. 3 Milliarden

betroffenen Menschen ist die Risikogruppe entsprechend hoch [115][94]. Arbeitsplatzbedingte Exposition gegenüber Stäuben und Dämpfen [134][10] sowie die Belastung durch Feinstaub und Passivrauchen sind in den letzten 25 Jahren stark angestiegen und werden in Zukunft eine größere Rolle spielen [8]. Rezidivierende Infekte der unteren Atemwege in der Kindheit, chronisches Asthma, Lungentuberkulose, Rauchen während der Schwangerschaft [104] und geringes Geburtsgewicht [46] sowie ein niedriger sozialer Status sind weitere Risikofaktoren und Gründe für Entstehung und/oder Progression einer COPD [94].

6.2.4 Prognose

COPD ist eine primäre Erkrankung der Lungen, aber die systemische Inflammation, die bei dieser Erkrankung auftritt, prädisponiert für das Auftreten von Komorbiditäten [27]. Sie sind sehr häufig [27], können jederzeit bei einer COPD, unabhängig der GOLD-Stufe, auftreten und bestimmen maßgeblich das Outcome der Patienten [1]. Bei COPD Patienten scheinen viele Komorbiditäten auch häufiger zusammen aufzutreten [112]. Die häufigsten Komorbiditäten, die bei einer COPD auftreten, sind kardiovaskuläre Erkrankungen, Osteoporose, Stoffwechselstörungen, muskuloskeletale Dysfunktionen, Depressionen oder andere psychiatrische Erkrankungen, Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes und respiratorische Erkrankungen, wie Asthma, Lungenfibrose oder Lungentumoren [27] [87]. Studien konnten zeigen, dass die Länge eines Krankenhausaufenthaltes mit dem Auftreten akuter Exazerbationen positiv korreliert. Gleichzeitig war ein verlängerter Krankenhausaufenthalt assoziiert mit dem Auftreten von CVE, Herzinsuffizienz und Diabetes [118]. Vielen dieser Komorbiditäten ist ein signifikanter Anteil an Todesfällen von COPD zuzusprechen; am häufigsten durch kardiovaskuläre Erkrankungen oder Lungentumoren [87] [80]. Zur multidimensionalen Schweregradeinteilung aufgrund der Vielfalt an Komorbiditäten hat sich der BODE-Index etabliert. Er beinhaltet die vier Variablen Body-Mass Index, Grad der Atemwegsobstruktion, Grad der Dyspnoe und körperliche Leistungsfähigkeit [42]. Er eignet sich als Prognoseparameter für den Endpunkt Tod bei COPD besser als die FEV₁ [19].

Hierfür wird der 6-Minuten-Gehtest zur Objektivierung der Belastung herangezogen: Er ist der am häufigsten benutzte Belastungstest. Hierbei geht der Patient über 6 Minuten eine steigungslose Strecke von mindestens 30 m Länge. Die Entfernung, die der Patient in der vorgegebenen Zeit von 6 Minuten zurücklegt, wird gemessen. Kurz vor dem Start und nach Beendigung des Tests wird die Dyspnoe des Patienten mit der Borg-CR10-Skala gemessen (0-10 Punkte; 0= keine Dyspnoe, 10= stärkste Dyspnoe). [25]

6.3 Wnt/ β -Catenin Signalweg und Dickkopf-Proteinfamilie

6.3.1 Wnt/ β -Catenin Signalweg

Der Name Wnt ist eine Amalgamierung aus dem Namen des Gens „Wingless“ der *Drosophila melanogaster* und der Wortendung „nt“ des Protoonkogens „Int-1“. Der Wnt- β -Catenin Signalweg ist evolutionär stark konserviert und involviert in die Embryogenese und Zelldifferenzierung aber auch in die Entstehung von Tumoren. Bis heute sind neunzehn Wnt-Gene in Genomen von Säugetieren nachgewiesen worden, die alle eine wichtige Rolle in zellulären Entwicklungsprozessen, vor allem im Bereich der Stammzellen, spielen [53] [84]. Man unterscheidet kanonisches und nicht-kanonisches Wnt-signaling. Bei der kanonischen Form erfolgt die Aktivierung konventionell über Wnt-Liganden, die zur Dimerisierung von Frizzled-Rezeptoren zusammen mit den Korezeptoren LRP5/6 führt und damit die Akkumulation von β -Catenin in der Zelle fördert. Das β -Catenin transloziert nun in den Nukleus, um dort einen Komplex mit dem T-Cell-factor/Lymphoid-enhancing binding factor (TCF-LEF) zu bilden, welcher als Transkriptionsfaktor eine Wnt-abhängige Genexpression ermöglicht [23]. Bei der nicht-kanonischen Form gibt es die Möglichkeit der direkten Wnt- Ca^{2+} -Aktivierung über trimere G-Proteine und nachfolgende Aktivierung von Proteinkinasen als auch die Aktivierung über die Regulation kleiner GTPasen, die den Aufbau des Zytoskelett und damit die planare Polarität regulieren [73][121]. In Abwesenheit von Wnt-Liganden wird β -Catenin durch den sogenannten „Destruction-Complex“, bestehend aus den Proteinen GSK3 β , Axin, APC und CK1, reguliert. Dieser Komplex phosphoryliert und ubiquitiniert β -Catenin, was letztlich die proteasomale Degradierung des Proteins induziert [74] (Abbildung 2).

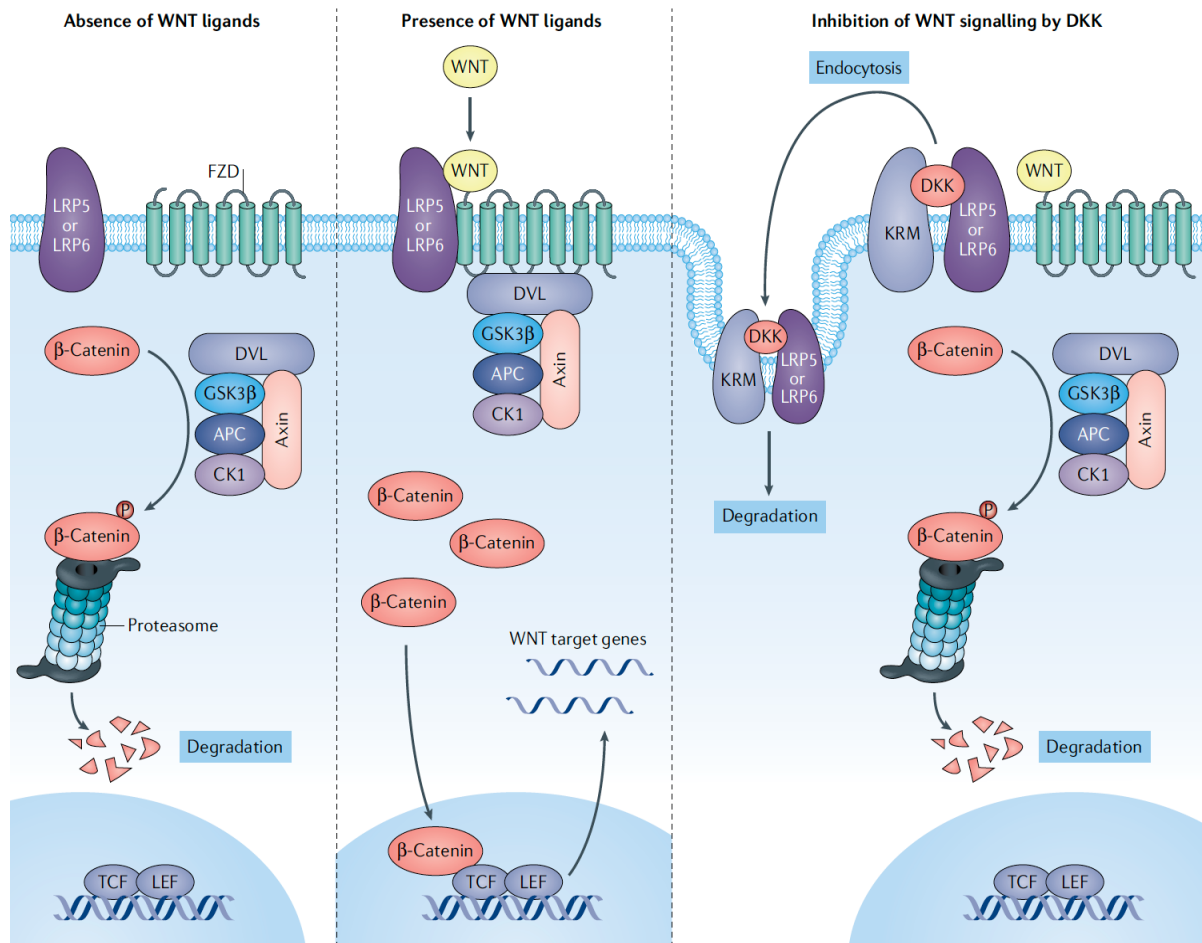


Abbildung 2: Wnt Signalweg in Abwesenheit und Anwesenheit von Wnt-Liganden sowie die Inhibition durch Dickkopfproteine.

Entnommen aus: Schunk SJ, Floege J, Fliser D, Speer T (2020) WNT-β-catenin signalling — a versatile player in kidney injury and repair. *Nat Rev Nephrol* [97].

6.3.2 Dickkopf-Proteinfamilie

Der Name „Dickkopf“ leitet sich von der Funktion der Dickkopfproteine ab, die eine wichtige Rolle in der Embryogenese und speziell in der Entwicklung des Schädels, des Herzens, der Nieren und der oberen Extremitäten spielt. [81]. Die Dickkopf-Familie umfasst die Gene Dickkopf 1-4 und das DKK3 verwandte Gen DKKL1 (Soggy). Dickkopf-Proteine sind Glykoproteine mit einer Länge von 255 bis 350 Aminosäuren. Die Proteine besitzen zwei N-terminale CRD (cysteine-rich domains), die bei den Dickkopfproteinen 1, 2 und 4 durch eine Linkerregion variabler Länge ähnlich aufgeteilt sind, welche aber sehr viel kürzer bei DKK3 ausfällt (Abbildung 3) [57]. Die Gene von DKK1, DKK2 und DKK4 befinden sich in einer paralogen Anordnung auf den Chromosomen 4, 5, 8 und 10, wohingegen DKK3 nicht in dieser Gruppierung zu finden ist [89][70]. Weiterhin unterscheidet sich das Molekulargewicht von DKK3 von den anderen Dickkopf-Proteinen, welches mit 38 kDa bei DKK3 höher ist als das der anderen DKK Proteine (DKK1/2: 28 kDa, DKK4: 24 kDa).

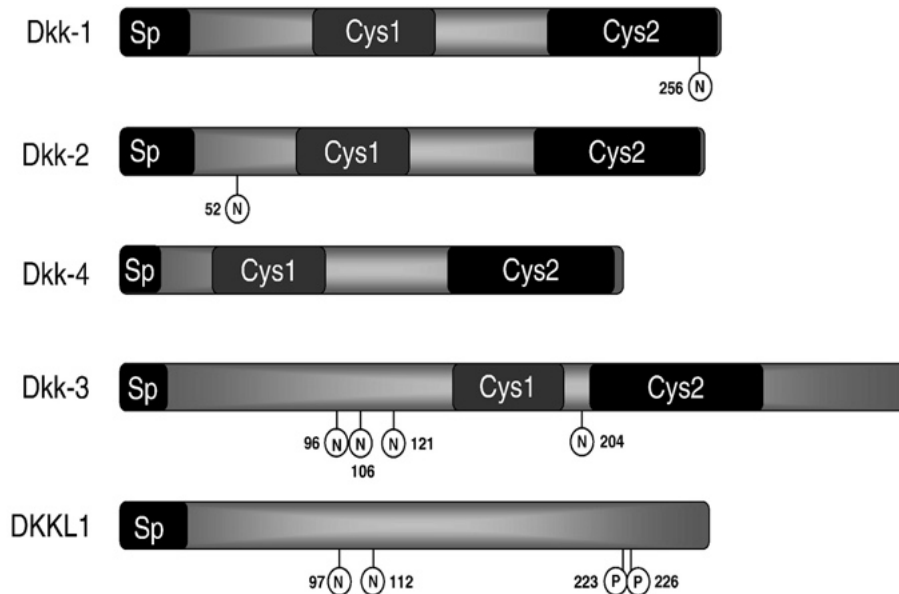


Abbildung 3: Struktur der Dickkopfproteine.

Entnommen aus Veeck J, Dahl E (2012) Targeting the Wnt pathway in cancer: The emerging role of Dickkopf-3. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* 1825:18–28 [114].

Während die Wirkung von DKK1, 2 und 4 durch Interaktion mit dem Kremenrezeptor zur Internalisierung des Lipoprotein receptor related-Protein 6 (LRP6) und damit zur Inhibierung der kanonischen Aktivierung des Wnt- β -Catenin Signalweges führt, ist die genaue Wirkweise von DKK3 in diesem Signalweg noch weitestgehend unverstanden. [77]

6.3.3 Renale Effekte von DKK3

In der Embryogenese der Nieren konnte eine DKK3 Expression nachgewiesen werden, die im Erwachsenenalter sistiert [32]. Während DKK3 im gesunden Nierengewebe nicht exprimiert wird, kommt es bei Schädigung des Nierengewebes zur Reexpression und Sekretion von DKK3 in den Urin. Sowohl toxische als auch mechanische Nierenschädigung (Adenindiät oder UUO) im Mausmodell konnten DKK3 als zentrales Protein bei der Entstehung einer Nierenfibrose identifizieren [98]. Im Vergleich zwischen *Dkk3*^{-/-} und Wildtypmäusen konnte ein signifikanter Unterschied im Grad der Nierenfibrosierung und der Schädigung von tubuloepithelialen Zellen (TECs) nachgewiesen werden. Die *Dkk3*-defizienten Mäuse wiesen signifikant weniger Fibrose auf. Auch eine Applikation von Anti-DKK3 Antikörpern kam zu ähnlichen Ergebnissen [32].

Gleichzeitig unterstreichen diese Befunde die Wichtigkeit von TECs (tubulo-epithelial cells) bei der Entstehung einer Nierenfibrose. Entsprechend konnten signifikant höhere Konzentrationen von DKK3 im Urin von CKD-Patienten nachgewiesen werden. Damit eignet sich DKK3 als Biomarker für TEC-Schädigung und renalen Stress. In einer prospektiven Studie an Patienten mit CKD konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Bestimmung von DKK3 die Abschätzung der individuellen Progression der CKD präzise erlaubt. [126]

Ebenso konnte gezeigt werden, dass erhöhte Konzentrationen von DKK3 im Urin mit einem stärkeren Abfall der eGFR innerhalb von 6 Monaten assoziiert waren (STOP-IgAN-Studie) [91]. Ein weiterer Hinweis auf die außerordentliche Rolle von DKK3 als renal tubulärer Stressmarker waren Untersuchungen der AG Speer, die DKK3 als präoperativen Biomarker benutzten, um ein akutes Nierenversagen nach kardiochirurgischen Eingriffen zu prognostizieren. Hierbei zeigte sich, dass präoperativ erhöhte Konzentrationen von DKK3 im Urin mit einem erhöhten Risiko für ein postoperatives AKI assoziiert waren. Auch konnte DKK3 den Übergang eines AKI in eine CKD im Langzeit Follow-Up vorhersagen.[98][96]

6.4 Zielsetzung

Während der Einfluss von COPD und CKD auf das kardiovaskuläre System und daraus resultierende Erkrankungen bereits hinreichend beschrieben sind, ist der Zusammenhang zwischen CKD und COPD bislang nicht ausreichend untersucht. Ziel dieser Dissertation ist es deshalb, die pathophysiologische Verbindung zwischen CKD und COPD zu untersuchen. Hierzu wurde ein kombiniertes Mausmodell für Nieren- und Lungenschädigung etabliert. Zudem wurde die Rolle von DKK3 durch den Einsatz von *Dkk3*^{-/-} Mäusen untersucht. Zusätzlich wurde in der COSYCONET Kohorte, einer prospektiven multizentrischen Kohorte von Patienten mit stabiler COPD, DKK3 im Urin der Patienten quantifiziert, um damit den Zusammenhang zwischen CKD und COPD darzustellen.

Somit sollten in dieser Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

1. Gibt es einen pathophysiologischen Zusammenhang in der Entstehung von COPD bei CKD und vice versa?
2. Welche Rolle spielt DKK3 bei der Entstehung von Nieren- und Lungenerkrankungen?
3. Welchen Effekt hat renal tubulärer Stress, quantifiziert durch die Bestimmung von DKK3 im Urin, auf die Progression von Lungen- und Nierenschädigung bei Patienten mit COPD?

7 Methodenteil.

Materialien und Chemikalien

7.1.1 Materialien

Brutschrank	Fa. Franz Binder GmbH & Co., Neckarsulm
Kühlschrank	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß
Dampfgarer	Philips GmbH Market DACH, Hamburg
Feuchte Kammer	Fa. Tupperware Deutschland GmbH, Frankfurt am Main
Färbegestell	Fa. Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Deckgläser 18 x 18mm	Fa. Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen
Eppendorf-Pipetten + Spitzen	Fa. Eppendorf SE, Hamburg
Mikroplatte mit 96 Wells vorbeschichtet mit Beads	Fa. Luminex-DiaSorin, Saluggia, Italien
Mikrowell-Plattenphotometer mit 450nm Filter	Tecan Group Ltd., Schweiz
Mikroplatten Wascher	Tecan Group Ltd., Schweiz
TE-10 Smoking Machine	Fa. Teague Enterprises, Woodland, USA
Research Zigaretten 3R4F	College of Agriculture, University of Kentucky, USA
Falcon Röhrchen 15ml	Fa. Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg
Magnetrührer mit Temperaturregler	Fa. Ika-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
pH-Meter	Fa. Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Färbegestell	Fa. VWR International GmbH, Darmstadt
Glasküvetten	Fa. VWR International GmbH, Darmstadt
Messzylinder 100ml, 1000ml	Fa. VWR International GmbH, Darmstadt
Erlenmeyerkolben 1000ml	Fa. VWR International GmbH, Darmstadt
Pipette 5ml	Fa. Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg
Präzisionswischtücher	Fa. Kimberly-Clark GmbH, Koblenz

Tabelle 2: Materialien.

7.1.2 Reagentien und Kits

Xylol	Fa. Aug. Hedinger GmbH & Co. KG, Stuttgart
Ethanol 99%	Fa. Sigma-Aldrich: Merck KGaA, Darmstadt
Aqua dest.	Eigene Herstellung Klinikapotheke
Wasserstoffperoxidlösung 30%	Fa. Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken
Sodium-Citrate	Fa. Sigma-Aldrich: Merck KGaA, Darmstadt
PBS (Phosphate buffered Saline)	Fa. Sigma-Aldrich: Merck KGaA, Darmstadt
Tris Hydrochlorid	Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid	Fa. Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Biotin Tyramidreagenz Blocking Reagenz Amplification Diulent Streptavidin-HRP	Fa. Akoya Biosciences, San Francisco, USA
Primär-AK Anti-DKK3 (Rabbit) ab187532	Fa. Abcam, Cambridge, UK
Sekundär-AK, biotinyliert, Anti-Rabbit, 31820	Fa. Thermo Fisher Scientific, Massachussets, USA
Primär-AK Anti-Ly-6-G (Rat) MCA771GA	Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Sekundär-AK, biotinyliert, Anti-Rat, 31830	Fa. Thermo Fisher Scientific, Massachussets, USA
Primär-AK-Anti-CD-3, ab5690	Fa. Abcam, Cambridge, UK
DMSO	Fa. Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Texas Red Streptavidin	Fa. Vector
Hepes-Puffer	Fa. Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
NaCl	Fa. Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Sodium acid	Fa. Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Vectashield Hard + Set	Fa. Serva
Mounting Medium with DAPI	Fa. Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA
AEC-Staining-Kit:	Fa. Sigma-Aldrich: Merck KGaA, Darmstadt

Acetate Buffer AEC Chromogen 3% H ₂ O ₂	
Essigsäure 100%	Fa. Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Hämatoxylinlösung nach Weigert	Fa. Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Siriusrotlösung F3B	Fa. Waldeck GmbH & Co. KG, Münster
Pikrinsäurelösung 1,2%	Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt
Entellan	Fa. Sigma-Aldrich: Merck KGaA, Darmstadt
DKK3 ELISA Kit	Fa. Diaren UG, Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg
<p>Mouse Standard Cocktails:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Magnetische, vorgemischte Mikropartikel Maus Cocktail (0,6ml konzentrierter Mikropartikel mit Konservierungsmitteln) • Vorgemischter Maus Biotin-Antikörper Cocktail (0,6ml konzentrierter, biotinylierter Antikörpercocktail mit Konservierungsmittel) • Streptavidin-Phycoerythrin-Konzentrat (0,25ml konzentrierter Streptavidin-Phycoerythrin Lösung mit Konservierungsmittel) • Assay Diluent RD1W (11ml Pufferlösung auf Proteinbasis mit Konservierungsmittel) • Calibrator Diluent RD6-52 (3 Ampullen (21 ml pro Ampulle) Pufferlösung auf Proteinbasis mit Konservierungsmittel) • Waschpufferkonzentrat (21ml eines 25fach konzentrieren Tensidpuffers mit Konservierungsmittel) 	Fa. Luminex-DiaSorin, Saluggia, Italien

<ul style="list-style-type: none"> • 100ml gebrauchsfertiger Probenpuffer (Tris-puffered-Saline (TBS), bovines Serumalbumin (BSA), Tween und Na-Azid), orange gefärbt • 100ml Waschpuffer (TBS, Tween und Bromonitrodioxan) als zehnfach Konzentrat, blau gefärbt • gebrauchsfertige Standards (TBS, BSA, Tween, Na-Azid) mit jeweils 2 ml und 0, 30, 85, 245, 700 und 2000pg DKK3ml, blau gefärbt • 14ml polyklonaler, biotinylierter DKK3 Antikörper, rot gefärbt. Gepufferte Lösung mit stabilisierendem Protein, Methylisothiazolon und Bromonitrodioxan • 14ml gebrauchsfertige Streptavidin-HRP-Lösung, grün gefärbt. Gepufferte Lösung mit stabilisierendem Protein, Methylisothiazolon und Bromonitrodioxan • 14ml gebrauchsfertige Streptavidin-HRP-Lösung, grün gefärbt. Gepufferte Lösung mit stabilisierendem Protein, Methylisothiazolon und Bromonitrodioxan • 14ml gebrauchsfertige Stopplösung (0,2 M H₂SO₄), farblos. 	
---	--

Tabelle 3: Reagentien und Kits.

7.2 Bronchoalveoläre Lavage (BALF), Organentnahme, Blutentnahme und Euthanasie

Die Blutentnahme der Mäuse erfolgte entweder retrobulbär oder submandibulär in leichter Isoflurannarkose. Die Proben wurden sofort gekühlt oder analysiert. Nach letztmaligen Wiegen der Mäuse erfolgte eine Narkoseeinleitung- und aufrechterhaltung bis zur bronchoalveolären Lavage und Euthanasie des Tieres mittels Isofluran (Piramal critical care, 1,5-2%). Zur Analgesie der Maus wurde das Medikament Carprofen (Rimadyl; Zoetis, 15mg/kg KG) subkutan appliziert. Nach Desinfektion des Thorax erfolgte eine zervikale Mittellinieninzision zur Darstellung der Trachea und der Lungen. Die Kanülierung der Trachea wurde mithilfe einer peripheren Venenverweilkanüle, 18G, Durchmesser 1,0mm, durchgeführt. Durch beidseitige Punktion des Zwerchfells wurde ein bilateraler Pneumothorax induziert. Über den so geschaffenen Zugang zu den Atemwegen konnte mittels einer Spritze 4% Phosphat-gepuffertes Formaldehyd (pH =7) mit einem Druck von 20 cm H₂O in die kollabierten Lungen eingeleitet und wieder aspiriert werden. Die Proben wurden umgehend gekühlt. Nach Beendigung der Prozedur erfolgte die Euthanasie der weiterhin narkotisierten und analgesierte Maus mittels Luxation des Atlanto-Occipital Gelenkes. Abschließend wurden die Lungen und Nieren des Tieres entnommen und in 4%igen Formalin über Nacht fixiert.

Zur histologischen Begutachtung der Organe mussten diese paraffiniert und in dünne Proben geschnitten werden. Die Einbettung der Organe in Paraffinblöcke erfolgte am Folgetag. Anschließend wurden die Proben nach ausreichender Kühlung auf einer Kühlplatte (Fa. Slee) am Mikrotom (Fa. Slee) in 3µm geschnitten und auf Objektträger (SuperFrost UltraPlus, Fa. Roth) aufgezogen. Nach Schneiden und Aufziehen aller Proben auf dementsprechend markierte Objektträger wurden diese über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank angetrocknet.

7.3 Immunfluoreszenzfärbung ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex-Technik) mit Tyramidverstärkung

Zur Quantifizierung der DKK3-, Ly6G-, und CD3-Expression wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit Tyramidverstärkung durchgeführt. Der Technik liegt die hohe Affinität von (Strept)Avidin zu Biotin zugrunde. Biotin weist 4 Bindungsstellen für (Strept)Avidin auf. Der indirekte Nachweis erfolgt hierbei über einen speziellen, biotinylierten Sekundär-Antikörper, der spezifisch den Primär-Antikörper an seinem Fc-Teil bindet. Nach Zugabe von Streptavidin, Biotin sowie HRP (horseradisch peroxidase) reagieren diese nun als Komplex mit dem biotinyliertem Sekundär-Antikörper. Unter Ausnutzung der hohen Bindungsaffinität von HRP-Streptavidin für Biotin bildet sich so ein Komplex, bestehend aus biotinyliertem Sekundär-Antikörper und dem (Strept)Avidin-HRP-Biotin Komplex. Zur Amplifikation des Signals wird die Probe nun mit biotinyliertem Tyramid inkubiert. In Gegenwart von H₂O₂

wandelt die HRP die markierten Tyramidsubstrate in hochreaktive Tyramidradikale um, welche schnell an Tyrosinreste binden. Diese Markierungen werden nun durch den Fluoreszenzfarbstoff „Texas Red“ hervorgehoben und sichtbar gemacht, da dieses kovalent an jene Tyrosinreste bindet. Schlussendlich erfolgt das Eindecken des Präparats mit „Mounting-Medium with DAPI“ zur Fixierung und Gegenfärbung der Zellkerne.

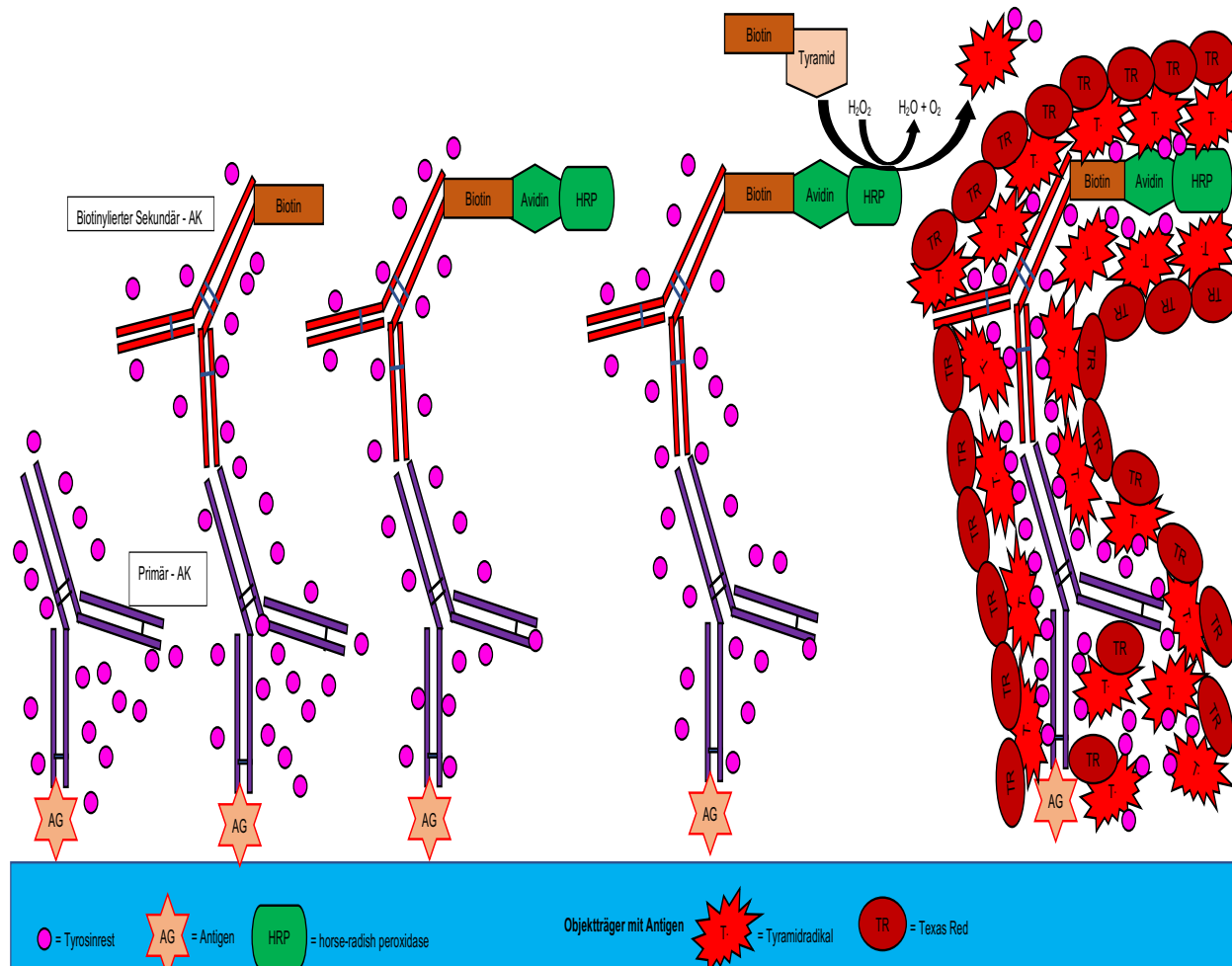


Abbildung 4: Ablauf der Immunfluoreszenzfärbung.

7.3.1 Durchführung

Zunächst wurden die Schnitte bei 56°C für 1 Stunde im Brutschrank angetrocknet. Danach erfolgte eine Rehydrierung durch Xylol und eine absteigende Alkoholreihe. Die Schnitte verweilten für 2 mal 10 Minuten in Xylol, 2 mal 5 Minuten in 100% Ethanol und danach für jeweils 5 Minuten in 90% Ethanol, 80% Ethanol und 70% Ethanol. Nach Abwaschen mit destilliertem Wasser wurden die Proben zur Blockade der Peroxidase noch 5 Minuten in Wasserstoffperoxid inkubiert. Anschließend erfolgte die Antigendemaskierung in 10mM Na-Citrat-Puffer bei 95°C im Dampfgerär. Die Proben wurden in 3 Waschgängen in PBS abgewaschen. Danach inkubierten die Proben für eine halbe Stunde in einer feuchten

Kammer. Die Verdünnung des Primär-AK erfolgte 1:50 in 1000µl TNB-Blocking-Puffer. Über Nacht lagerten die Schnitte in einer feuchten Kammer bei 4°C im Kühlschrank.

Am zweiten Tag erfolgte zunächst eine erneute Inkubation im Brutschrank bei 37°C für 1 Stunde mit anschließendem Waschgang in PBS wie oben beschrieben. Danach wurde der entsprechende Sekundär-Antikörper aufgetragen. Die Verdünnung erfolgte 1:200 mit 1000µl TNB-Blocking-Puffer. Nach 45 Minuten Inkubation in der feuchten Kammer und einem weiteren Waschvorgang in PBS wurde das Streptavidin-HRP in der Verdünnung 1:100 mit TNB-Blocking-Puffer aufgetragen. Hiernach erfolgte wieder dreimaliges Waschen in PBS. Zur Signalamplifikation wurde nun das Tyramid in der Verdünnung 1:50 mit Amplification Diluent auf die Proben aufgetragen und für weitere 10 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert. Nach wiederholtem PBS-Waschgang wurde als letztes der Farbstoff SA-Fluorophore (Texas Red) in der Verdünnung 1:50 in 1000µl TNB-Blocking-Puffer aufgetragen und für 30 Minuten bei 37°C im Brutkasten inkubiert. Nach letztmaligem Waschvorgang in PBS erfolgte abschließend das Eindecken mit Mounting Medium mit DAPI. Die Proben wurden bis zur Begutachtung im Kühlschrank gelagert. Die Untersuchung der Präparate erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Axio Imager M2 der Firma Zeiss. Die Auswertung der Proben wurde mittels der Software ZEN 3.0 (blue edition) der Firma Zeiss durchgeführt.

Zur besseren Beurteilung der Proben wurde diese in einzelnen Schritten ausgewählt, aufgenommen und zusammengesetzt, so dass das Präparat als Ganzes ausgewertet werden konnte.

Die Quantifizierung der DKK3 Expression erfolgte mittels Image J.

7.4 Siriusrot-Färbung

Die Siriusrot-Färbung ist ein histologisches Verfahren zur Darstellung von Kollagenstrukturen im Gewebe. Bei dieser Methode färben sich Muskulatur und Zytoplasma gelblich und das Kollagen rot an. Siriusrot bewirkt eine Zunahme der Doppelbrechung an Kollagenfasern, wenn es sich an ihnen anlagert. Pikrosiriusrot-Lösung enthält zwei Farbstoffe, das grob disperse Siriusrot, welches, wie oben beschrieben, Bindegewebe anfärbt, sowie Pikrinsäure, die fein dispers dichtes Gewebe (Muskulatur) anfärbt.

Die Schnitte wurden für 30 Minuten bei 60°C im Brutschrank angetrocknet. Danach erfolgte eine Wässerung durch eine absteigende Alkoholreihe und Entparaffinierung in Xylol. Die Schnitte verweilten für 2 mal 10 Minuten in Xylol und danach jeweils einmal für 5 Minuten in 70% Ethanol, 80% Ethanol, 90% Ethanol und zweimal in 100% Ethanol. Nach Abwaschen in destilliertem Wasser erfolgte eine einstündige Inkubation in Pikro-Siriusrotlösung (Fa. AppliChem/Fa. Waldeck). Nach Ablauf der Einwirkzeit wurden die Proben mit 1% Essigsäure und destilliertem Wasser abgespült und danach in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ablauf

umgekehrt wie oben beschrieben) und Xylol entwässert. Abschließend erfolgte das Eindecken der Schnitte mit Entellan (Fa. Merck). Die Begutachtung der Proben erfolgte lichtmikroskopisch am Mikroskop Axio Imager M2 der Firma Zeiss. Die Software Zen 3.0 (blue edition) der Firma Zeiss wurde hier ebenfalls verwendet. Die Quantifizierung Siriusrot-positiver Areale erfolgte mittels ImageJ.

7.5 Harnstoff- und Kreatinin Messung mit dem Beckman Coulter AU480

Die Messungen der Harnstoff- und Kreatinin Konzentrationen der Versuchstiere erfolgte mit dem chemischen Analysegerät Beckman Coulter AU480. Kreatinin bildet in einem alkalischen Medium zusammen mit Pikrinsäure einen gelb-orangen Komplex, den Meisenheimerkomplex (Jaffe-Reaktion). Die Änderungsgeschwindigkeit der Absorption bei 520/800nm ist hierbei proportional der Kreatininkonzentration in der Probe.[78]

Vor dem Start der Messung ist eine Kalibration des Gerätes notwendig. Hierfür verwendet man genormte Proben (NIST: National Institute of Standards and Technology), die in einer Isotopenverdünnungsmassenspektroskopie (IDMS) gemessen werden. Die Kalibration des Geräts erfolgt täglich, eine Qualitätskontrolle alle acht Stunden [135].

7.6 Multiplex Cytokin Array

Zur Detektion proinflammatorischer Zytokine in BALF oder Serum der Versuchstiere wurde ein Multiplex Cytokin Array durchgeführt. Mithilfe dieses Assays können auch kleinste Probenmengen verwertet sowie präzise Analysen von bis zu 100 einzelner Komponenten in einer einzigen Probe ermittelt werden. Gemessen wurden die Konzentrationen der Zytokine G-CSF (granulocytes-colony stimulating factor), MIP-2 (Macrophage inflammatory Protein 2), KC (Chemokin C-X-C) Ligand-1, MMP-12 (Matrix-metalloprotease 12), IFN- γ (Interferon- γ), IL-12 (Interleukin-12) und TNF- α (Tumornekrosefaktor- α). Hierfür wurde ein Luminex Assay (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) benutzt. Die Auswertung erfolgte mittels MAGPIX (Luminex corporation, Austin, USA).

Bei diesen Verfahren werden die Wells einer Platte mit spezifischen Fänger-Antikörpern, welche an magnetische Mikropartikel (im englischen „Beads“) gekoppelt sind, vorbeschichtet. Diese Beads bestehen aus Polystyrol und sind mit jeweils individuellen Anteilen von roten und infraroten Fluorophoren gefärbt, die einer spezifischen spektralen Signatur oder Region eines Beads entsprechen. Spezifische Antikörper, die gegen das jeweils zu analysierende Zytokin gerichtet sind, werden an eine der einzigartigen Bead-Regionen gekoppelt und mit der Probe inkubiert. Nach einem Waschvorgang, der erfolgt, um unerwünschte Probenbestandteile zu entfernen, werden die Proben mit einem Streptavidin-Phycoerythrin (R-PE) Komplex sowie einem biotinylierten sekundär-Antikörper (im Sinne eines Sandwich-ELISA) beladen.

Mithilfe eines Magneten im MAGPIX werden die Beads in einem Monolayer festgehalten und mit 2 unterschiedlichen Wellenlängen aus LED-Lasern beleuchtet. Die individuellen Beads-Regionen können so dem entsprechenden Zytokin zugeordnet werden. Während der erste Laser das Zytokin identifiziert, bestimmt ein zweiter Laser die Stärke des detektierten PE-Signals, welches proportional zur Menge des gebundenen Zytokins ist.

7.6.1 Durchführung

Nach Entnahme der Blutproben in EDTA Röhrchen wurden diese innerhalb von 30 Minuten bei 2000g für 20 Minuten zentrifugiert. Das Serum wurde entweder direkt pipettiert und analysiert oder bis zur Analyse tiefgefroren. Das gleiche Vorgehen erfolgte bei der Gewinnung der BALF.

Die Proben wurden vor Ansetzen des Assays zunächst für 4 Minuten bei 16.000g zentrifugiert und danach einer zweifachen Verdünnung unterzogen (75µl Probe + 75µl Calibrator Diluent RD6-52).

Zunächst wurden alle Reagenzien auf Raumtemperatur aufgewärmt. Das Ansetzen des Waschpuffers erfolgte mit 20ml des Waschpufferkonzentrates und 480ml destilliertem Wasser, um so ein Gesamtvolumen von 500 ml Waschpuffer zu erhalten.

Jeder der Standardcocktails wurde vor der Verdünnung mit Calibrator Diluent RD6-52 für 15 Minuten vorsichtig auf einer Schüttelplatte homogenisiert. Nach Rekonstitution der Standardcocktails erhielt man eine zehnfache Konzentration der Lösung.

Die Zusammenstellung der insgesamt 6 Standards erfolgte nach einem Schema, welches abhängig von der Gesamtzahl der Standardcocktails ist. Zur Leerwertkontrolle wurde das Calibrator Diluent RD6-52 benutzt.

Das Mikropartikelgemisch wurde für 30 Sekunden bei 100g zentrifugiert und zur Resuspension vorsichtig gevortext. Die Verdünnung des Mikropartikelcocktails erfolgte mittels des mitgelieferten Assay Diluent RD1W (bei 96 Wells 500µl Mikropartikelcocktail + 500ml Assay Diluent RD1W).

Die Verdünnung des Biotin-Antikörper Cocktails erfolgte analog zur Verdünnung des Mikropartikelcocktails.

Die Ampulle mit dem Streptavidin-PE wurde zunächst für 30 Sekunden bei 1000g zentrifugiert, dann vorsichtig gevortext und abschließend mittels Waschpuffer verdünnt (bei 96 Wells 220 µl Streptavidin-PE + 5,35ml Waschpuffer).

Nach Vorbereitung der Proben sowie aller Reagenzien wurden 50µl Probe oder Standard in jedes Well pipettiert. In jedes Well wurde nun zusätzlich 50µl Mikropartikel Cocktail gegeben, die Platte lichtdicht abgedeckt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einer Schüttelplatte

bei 800rpm inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte einem Waschgang unterzogen, bei dem in jedes Well 100µl Waschpuffer pipettiert und wieder entfernt wurden. Der Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Danach wurden 50µl des biotinylierten Sekundär-Antikörpers in jedes Well pipettiert. Die Mikrowell Platte wurde wieder lichtdicht abgedeckt und wie oben beschrieben für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgten drei weitere Waschgänge. Als nächstes wurden 50µl Streptavidin-PE in jedes Well pipettiert und die Platte für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Als letztes wurde die Mikrowell Platte erneut gewaschen und abschließend mit jeweils 100µl Waschpuffer pro Well nochmals für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Plattenschüttler inkubiert. Die Auswertung der Proben erfolgte innerhalb von 90 Minuten mittels MAGPIX (Luminex corporation, Austin, USA).

7.7 ELISA für die Detektion von humanem DKK3 im Urin

Die quantitative Messung von DKK3 im Urin wurde standardisiert mittels ReFiNE (DiaRen, Homburg) ELISA (Enzyme-Linked Immuno Assay) durchgeführt.

Die Kavitäten (=Wells) der Platten sind mit einem monoklonalen DKK3-AK versehen, welcher DKK3 Antigen in der Probe detektiert und mit seinem Fab-Teil bindet; so entsteht ein Antigen-Antikörper-Komplex. Nach Abwaschen nichtgebundener Probenbestandteile wird ein zweiter DKK3 Antikörper hinzugegeben. Dieser Antikörper ist im Gegensatz zum ersten ein polyklonaler und biotinylierter Antikörper. Er bindet mit seinem Fab-Teil an das Antigen, welches bereits an den ersten DKK3-AK gebunden ist. Nun wird ein Gemisch aus Streptavidin und Meerrettichperoxidase (HRP: horse-radish-peroxidase) hinzugegeben, welches aufgrund der hohen Affinität von Streptavidin zu Biotin an letzteres bindet. Nach nochmaligem Entfernen anderer Probenbestandteile durch Waschen mit TBS (Tris-puffered Saline) wird die DKK3-Konzentration der Probe anhand der reaktionsbedingten Farbumsetzung und -entwicklung photometrisch gemessen und quantifiziert. Das Ausmaß der Farbentwicklung ist hierbei proportional zur DKK3-Konzentration der Probe.

Die Lagerung des Testkits erfolgte bei Temperaturen zwischen 2-8°C, sodass erst eine Aufwärmphase Raumtemperatur auf 23±3°C erfolgen musste. Das Waschpufferkonzentrat (TBS) in zehnfacher Konzentration (100ml) verdünnte man mit 900ml destilliertem Wasser auf eine einfache Konzentration. Die Proben entsprachen morgendlichem Mittelstrahlurin und wurden in einem Urinbehälter aufgefangen und dicht abgeschlossen gesammelt. Makroskopisch auffällig verunreinigte Proben (z.B. durch Hämaturie) wurden verworfen. Die Lagerung der Proben erfolgte bei 2-8°C und die Analyse wurde innerhalb von drei Tagen durchgeführt. Proben, die nicht nach drei Tagen analysiert waren, wurden bis zum Zeitpunkt einer späteren Messung tiefgefroren. Vor der Analyse erfolgte zur Klärung der Proben eine Zentrifugation (Heraeus Fresco 17; Thermo Fisher Scientific) für 10 Minuten bei 2000rpm.

Anschließend wurde der Überstand pipettiert und 1:10 (100µl Probe + 900µl Probenpuffer) verdünnt und gemischt.

Nach Erreichen der geforderten Temperatur für die Messmaterialien auf $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ wurden je 100µl der Standards, der Kontrollen und der verdünnten Proben zügig in die Wells pipettiert. Danach wurde die Mikrowellplatte bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Wells geleert und nachfolgend 4 Waschgängen mit jeweils 350µl Waschpuffer unterzogen, um nicht relevante Probenbestandteile zu entfernen. Nun erfolgte das zügige Pipettieren von 100µl des biotinylierten sekundären DKK3-Antikörpers in die Wells. Anschließend nahm man eine weitere Inkubation der Platte für 30 Minuten bei Raumtemperatur vor. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde ein weiterer Waschvorgang, wie oben beschrieben, durchgeführt. Nach dem Waschen wurden den Proben jeweils 100µl Substrat zugesetzt und nochmal, wie oben beschrieben, bei Raumtemperatur inkubiert. Die Substratlösung enthält TMD, welches in Gegenwart von HRP oxidiert wird und einen blauen Farbumschlag aufzeigt. Zuletzt wurden jeweils 100µl Stopplösung zügig zugesetzt; es erfolgte ein Farbumschlag von Blau nach Gelb. Die Festphase wurde für wenige Sekunden auf einer Schüttelplatte geklärt. Abschließend erfolgte die sofortige Messung der Proben im Mikrowell-Plattenphotometer bei 450nm. [110]

7.8 Mausstämme und Tiermodelle

Um die Auswirkungen einer Lungenerkrankung auf die Nieren und vice versa zu untersuchen, wurde ein kombiniertes Rauch-Adenin-Modell und Kontrollgruppen mit isolierter Adenindiät und isolierter Rauchexposition in 8 Wochen alten, weiblichen C57Bl6/J Mäusen angewandt.

Die C57Bl/6 Mäuse für dieses Projekt wurden über das Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) bezogen. Zur Untersuchung des Effekts von DKK3 wurden *Dkk3^{-/-}* Mäuse verwendet, die von Prof. Dr. Hermann-Josef Gröne (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurden. Die Mäuse wurden entsprechend der Richtlinien für Tierhaltung und Tierexperimente gehalten, alle Versuche wurden von der zuständigen Landesbehörde (08/2019) genehmigt. Die Mäuse wurden während des Experiments wöchentlich gewogen und hatten jederzeit Zugang zu Trinkwasser. Die Euthanasie der Mäuse erfolgte 3 Wochen nach Start des Experiments während der bronchoalveolären Lavage (BAL).

7.8.1 Adeninmodell

Die 8 Wochen alten, weiblichen C57Bl6/J Mäuse erhielten über einen Zeitraum von drei Wochen eine Adenindiät mit 0,2% Adenin-Zusatz im Futter (Fa. Altromin: Altromin 1324 mit dem Zusatz 2g/kg Adenin, in 10mm Pelletierung). Hierdurch wurde eine chronische Nierenerkrankung (CKD) der betreffenden Mäuse induziert. Die Nierenfunktion wurde zu

Beginn des Experiments anhand der Harnstoff- und Kreatininkonzentration im Serum und nach drei Wochen durch die Entnahme und Analyse von Blutproben überprüft.

7.8.2 Rauchmodell

Gleichzeitig wurden weitere Mäuse einer dreiwöchigen Rauchexposition ausgesetzt. Hierzu wurde eine Rauchmaschine der Firma Teague Enterprises benutzt (TE-10 Smoking Machine, Woodland, CA, USA). Die TE-10 ist eine mikroprozessorgesteuerte Zigarettenrauchmaschine, welche entweder Seitenstromrauch oder Hauptstromrauch (oder die Kombination aus beidem) aus gefilterten Research-Zigaretten produziert. Dabei werden bis zu 10 Zigaretten auf einmal verraucht, der entstehende Rauch mit einem Volumen von 3-5cm³ aufgefangen und den Mäusen innerhalb einer Minute in einer Expositionskammer zugeführt.



Abbildung 5: Ansicht einer TE1010 Smoking Machine im betriebsbereiten Zustand.
Abbildung entnommen aus <https://www.teague-ent.com/smoking-machines/>.

In diesem Modell wurden die Mäuse an 5 Tagen pro Woche, jeweils zweimal täglich, für 50 Minuten Zigarettenrauch mit einer Total suspended particulate Menge (TSP) von 500mg/m³ bei 350ppm CO Konzentration zur Induktion einer Lungenschädigung ausgesetzt. Als Research Zigaretten wurden Zigaretten des Typs 3R4F (College of Agriculture, University of Kentucky, USA) benutzt. Die Zigarettenfilter wurden von Hand entfernt. Nach 3 Wochen erfolgte die bronchoalveoläre Lavage (BALF) und die Euthanasie der Mäuse.

7.9 COSYCONET

COSYCONET steht für **COPD and Systemic consequences-Comorbidities NETWORK** und ist eine deutsche, prospektive, multizentrische Studie, welche die Interaktion von COPD, ihrer Komorbiditäten und systemischer Inflammation untersucht. 2741 Patienten mit der klinischen Diagnose COPD wurden im Zeitraum von 2010-2013 in 31 deutschen Studienzentren rekrutiert und zusätzlich zur Baseline Diagnostik in einem Follow-up über 6, 18, 36 und 54

Monate nachbeobachtet. Patienten ≥ 40 Jahre aller Schweregrade der COPD nach GOLD, inklusive der ehemaligen Stufe 0, wurden miteinbezogen.

Einschlusskriterien:

- Alter ≥ 40 Jahre
- Diagnostizierte COPD (nach GOLD Kriterien) oder chronische Bronchitis
- Verfügbarkeit für Follow-ups über mindestens 18 Monate

Ausschlusskriterien:

- Große thoraxchirurgische Eingriffe (Lungenvolumenreduktion, Lungentransplantation)
- Milde oder schwere Exazerbation in den letzten 4 Wochen
- Lungentumor
- Physische oder kognitive Einschränkungen, die es unmöglich machen zu gehen oder die Intention der Studie zu verstehen

Messungen und Tests

Der Schweregrad der COPD wurde nach GOLD Kriterien durch postbronchodilatatorische Spirometrie ermittelt [117]. Die Grenze für die GOLD 1 war hierbei ein Tiffeneauindex (FEV_1/FVC) < 70 %. Die Gold Schweregrade A, B, C, D wurden durch Fragebögen (CAT, mMRC) validiert.

7.10 Statistische Auswertung

Die Erhebung statistisch relevanter Werte (Varianz und Standardabweichung, Mittelwert, Median, Interquartilabstände) erfolgte aus allen gewonnenen Daten und wurden zur Beurteilung der statistischen Signifikanz verschiedenen Tests unterzogen. Hierbei wurde das Signifikanzniveau bei 5% festgelegt und daraus folgend *P*-Werte von $< 0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Kontinuierliche Variablen wurden bei Normalverteilung als Mittelwert \pm der Standardabweichung oder als Median (Interquartilsabstand) bei nicht normal verteilten Variablen dargestellt. Um statistische Unterschiede zwischen kontinuierlichen oder kategorialen Variablen darzustellen, wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA), der Kruskal-Wallis-Test oder der Student's-t-Test durchgeführt. Bei den Tierexperimenten erfolgte im Anschluss an die einfaktorielle Varianzanalyse noch ein Dunnett's-Test, um paarweise Vergleiche anzustellen.

Zur Analyse von Änderungen longitudinaler Variablen wurden mithilfe von „STATA traj“ gruppenbasierte Trajekturen modelliert. Hiermit konnten die Beziehungen zwischen der Baseline Urin-DKK3 Konzentration und Änderungen der eGFR oder der FEV_1 dargestellt werden. Dieses Modell basiert auf dem SAS PROC TRAJ Makro, welches eine semiparametrische Darstellung von Daten aus Längsschnittstudien unter Verwendung der

Methode der größten Plausibilität (Maximum-Likelihood-Methode) realisieren kann. Mithilfe des Bayesian-information-criterion (BIC) wurde die optimale Anzahl an Gruppen ermittelt. In Folge konnten die Trajektoengruppen A (steigende FEV₁), B (stabile FEV₁) und C (sinkende FEV₁) für die FEV₁ definiert werden. Analog erfolgte die Gruppierung für die eGFR: A (steigende eGFR), B (stabile eGFR) und C (sinkende eGFR). Durch logistische Regression wurde der Zusammenhang zwischen der Baseline-DKK-3 Urinkonzentration und dem Verlauf der Gruppen (sinkend) für die FEV₁ und die eGFR, mit der entsprechenden Gruppe B (stabil) als Kontrolle, untersucht. Adjustierungen erfolgten für Alter, Geschlecht, GOLD-Stadium, Raucherstatus, BMI, initiale Nierenfunktion und Proteinurie.

Zur Erfassung des Zusammenhangs zwischen dem Risiko einer COPD Exazerbation/Mortalität und der Baseline DKK3-Konzentration im Urin wurden ebenfalls logistische Regressionsanalysen bzw. Cox-Regressionsanalysen durchgeführt.

Die Assoziation zwischen der Ausgangs-DKK3 Urinkonzentration und den Ergebnissen des 6-MWD wurde mittels verallgemeinerter linearer Modelle und adjustierten, multivariaten, kleinsten quadrierten Mittelwerten des 6-MWD berechnet und in entsprechende DKK3 Kategorien eingeordnet. Die Adjustierungen erfolgten wie oben beschrieben.

Zur Darstellung der nicht-linearen Beziehung zwischen der Baseline Urin-DKK3 Konzentration und Veränderungen der eGFR nach 6 und 18 Monaten wurden restricted cubic Splines verwendet.

Weiterhin wurden lineare Modelle benutzt, um die Veränderung der eGFR in Bezug auf die entsprechenden DKK3 Kategorien während des Nachbeobachtungszeitraums zu schätzen.

Die Schätzung erfolgte, wie oben beschrieben, durch Berechnung der kleinsten quadratischen Mittelwerte der eGFR Änderung. Auch hier erfolgten die Adjustierungen für Alter, Geschlecht, GOLD-Stadium, Raucherstatus, BMI, initiale Nierenfunktion und Proteinurie.

DKK3 wurde zur Kategorisierung in 2 Gruppen unterteilt: ≤ 200 pg/mg und > 200 pg/mg.

Statistische Analysen wurden mittels SPSS (Version 21.0) und STATA IC 15 (postrcspline und traj) durchgeführt.

8 Ergebnisse

8.1 Auswirkungen renaler Dysfunktion auf eine Lungenschädigung

8.1.1 Outline der Tierexperimente

Um einen Zusammenhang zwischen renaler Dysfunktion und einer Lungenschädigung und vice versa zu untersuchen, wurde an Mäusen eine kombinierte Organschädigung induziert. Hierfür wurde mittels Adenindiät eine Niereninsuffizienz hervorgerufen sowie durch Rauchinhalation eine Lungenschädigung erzeugt. Die Einteilung erfolgte in die 4 Gruppen wie in Abbildung 6 dargestellt.

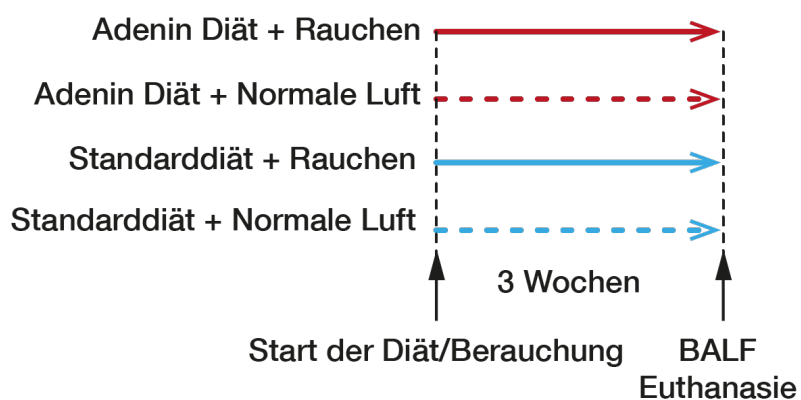


Abbildung 6: Outline der Experimente.

Einteilung der Versuchstiere in 4 Gruppen. Abbildung entnommen aus Schunk et al. Kidney Int 2021.

8.1.2 Zellzahl und Entzündungszellen in der BALF

8.1.2.1 Gesamtzellzahl

Drei Wochen nach Beginn des Experiments wurde die BAL mit anschließender Euthanasie des Tieres durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass bei den Tieren, die ausschließlich einer Adenindiät unterzogen wurden, keine signifikanten Veränderungen der Zellzusammensetzung in der BALF vorlag. Wie zu erwarten war, zeigten die Mäuse, die Zigarettenrauch exponiert wurden, eine insgesamt signifikant höhere Zellzahl in der BALF. Im kombinierten Lungen- und Nierenschädigungsmodell konnte eine nochmals signifikant höhere Zellzahl, verglichen mit der im Zigarettenrauchmodell, ermittelt werden (Abbildung 7).

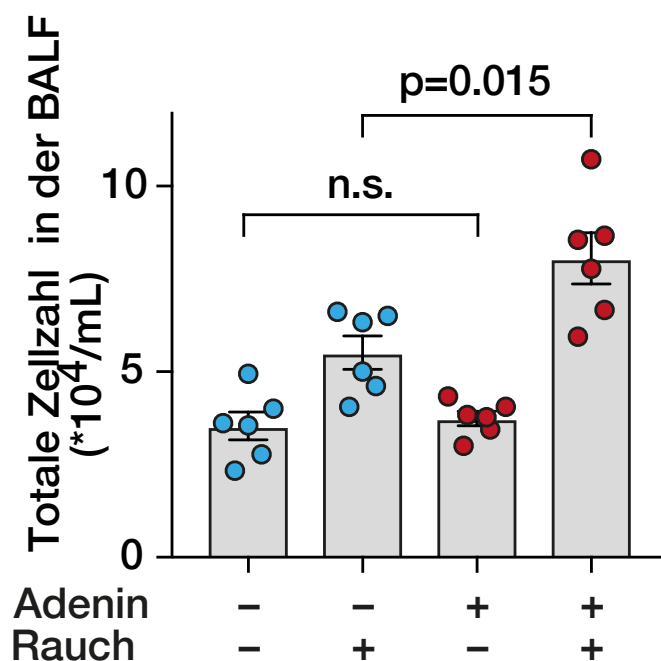


Abbildung 7: Totale Zellzahl in der BALF.

Auswertung nach drei Wochen Zigarettenrauchexposition, Adenindiät oder beidem gleichzeitig verglichen mit einer Kontrollgruppe. Jeder Punkt entspricht einem Tier. Abbildung entnommen aus Schunk et al. Kidney Int 2021.

8.1.2.2 Neutrophile Granulozyten

Bei den Tieren, die einer Rauchexposition ausgesetzt waren, kam es erwartungsgemäß, wie bei einer COPD, zu einem Anstieg neutrophiler Granulozyten in der BALF. Interessanterweise konnte man beobachten, dass die gleichzeitige Induktion einer Nierenschädigung bei gerauchten Tieren zu einem signifikanten Anstieg der Neutrophilen führte (Abbildung 8).

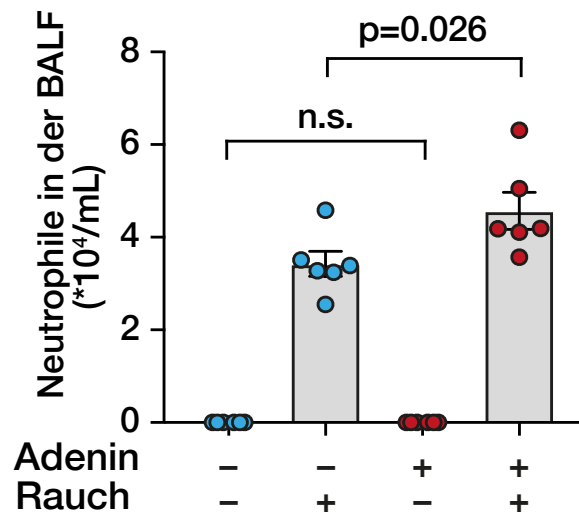


Abbildung 8: Neutrophilenzahl in der BALF. Auswertung nach drei Wochen Zigarettenrauchexposition, Adenindiät oder beidem gleichzeitig verglichen mit einer Kontrollgruppe. Jeder Punkt entspricht einem Tier. Abbildung entnommen aus Schunk et al. *Kidney Int* 2021.

8.1.2.3 Lymphozyten

Ein ähnliches Bild wie bei den Neutrophilen ergab sich bei den Lymphozyten. Auch hier war zu erkennen, dass die Induktion einer Lungenschädigung mittels Zigarettenrauch der Versuchstiere zu einem Anstieg von Lymphozyten in der BALF führte, während das alleinige Vorliegen einer Nierenschädigung keinen Einfluss auf die Zahl der Lymphozyten in der Lavage hatte. Interessanterweise wurde bei gleichzeitiger Schädigung von Lungen und Nieren ein, verglichen zur isolierten Rauchexposition, nochmals signifikanter Anstieg der Lymphozyten in der BALF verzeichnet.

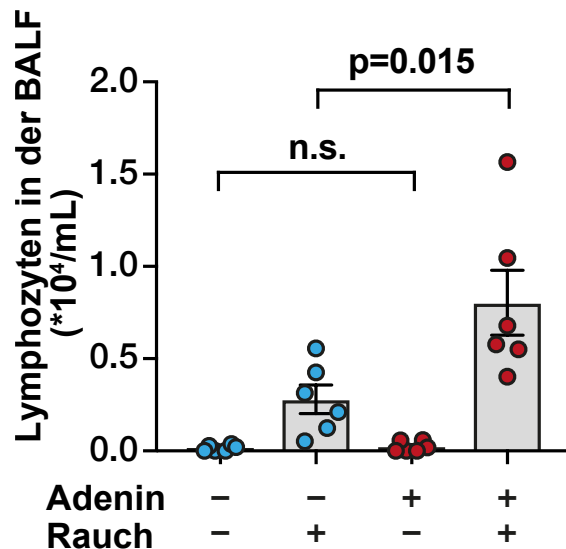


Abbildung 9: Lymphozytenzahl in der BALF.

Auswertung nach drei Wochen Zigarettenrauchexposition, Adenindiät oder beidem gleichzeitig verglichen mit einer Kontrollgruppe. Jeder Punkt entspricht einem Tier. Abbildung entnommen aus Schunk et al. *Kidney Int* 2021.

8.1.3 Proinflammatorische Zytokine in BALF und Serum

In der BALF der rauchexponierten Mäuse konnten erwartungsgemäß erhöhte Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine gemessen werden, wohingegen bei den Tieren mit einer Nierenschädigung kein relevanter Anstieg jener Zytokine in der BALF beobachtet wurde. Im Serum der Tiere stellte sich, wie bei isolierter Nierenschädigung, als Reaktion auf eine Adenindiät-induzierte Niereninsuffizienz ein Konzentrationsanstieg entzündlich wirksamer Zytokine ein. Auch bei den berauchten Tieren zeigte sich ein Anstieg der Zytokinkonzentration im Serum; dieser war aber nicht so stark wie unter Adenindiät. Waren beide Organsysteme erkrankt, so zeigte sich ein, im Vergleich zur isolierten Organschädigung, signifikanter Anstieg proinflammatorischer Agenzien im Serum (Abbildung 10 und Tabelle 4).

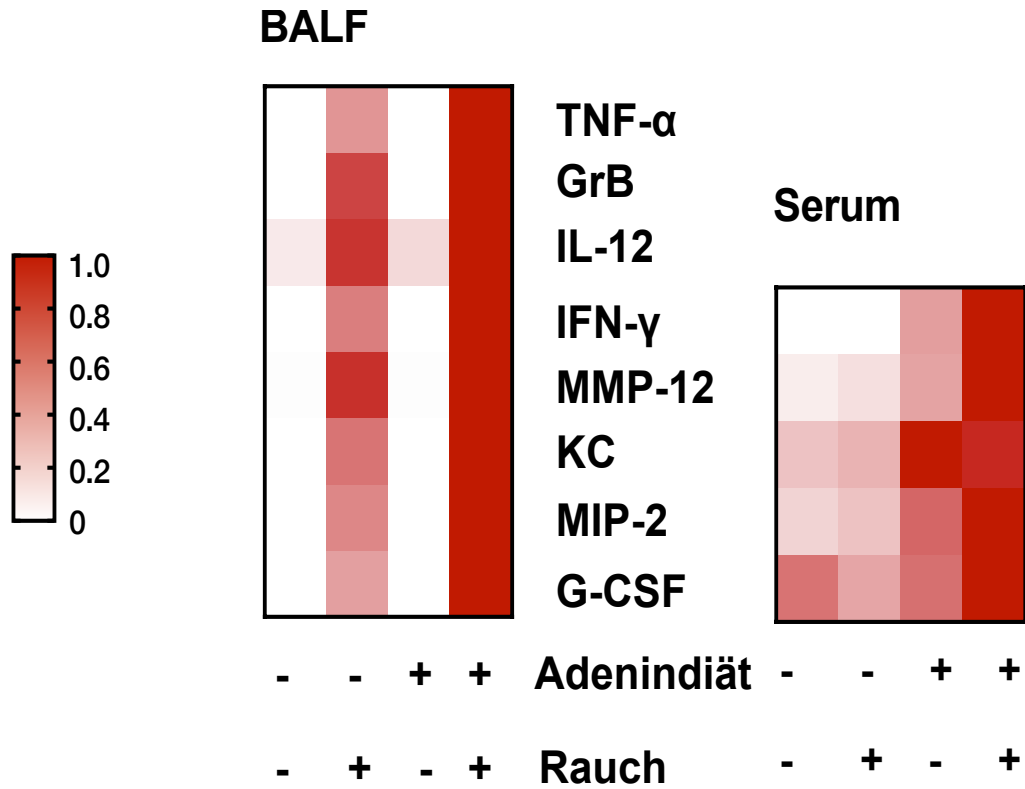


Abbildung 10: Darstellung der Messung Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine in BALF und Serum. Abbildung entnommen aus Schunk et al. *Kidney Int* 2021.

	Standarddiät + normale Luft (pg/μl)	Standarddiät + Rauchen (pg/μl)	Adenindiät + normale Luft (pg/μl)	Adenindiät + Rauchen (pg/μl)
G-CSF	n.d.	15,3 ± 1,7	n.d.	34,2 ± 1,9
MIP-2	n.d.	23,2 ± 1,0	n.d.	42,0 ± 1,7
KC	n.d.	114,4 ± 2,6	n.d.	181,0 ± 9,1
MMP-12	21,8 ± 2,0	96889,8 ± 233,3	12,2 ± 0,6	10882,0 ± 0,0
IFN-γ	n.d.	5,9 ± 5,7	n.d.	9,9 ± 0,4
IL-12	5,1 ± 1,1	43,0 ± 0,9	8,8 ± 1,5	49,1 ± 0,7
Granzym B	n.d.	20,8 ± 0,7	n.d.	25,5 ± 0,6
TNF-α	n.d.	3,9 ± 0,3	n.d.	7,8 ± 0,2

Tabelle 4: Zytokinkonzentrationen in der BALF.

G-CSF=Granulocytes-colony stimulating factor; MIP-2=Macrophage inflammatory protein 2; KC=Chemokine (C-X-C Motif) ligand 1; MMP-12=Matrix-metalloproteinase-12; IFN-γ= Interferon-γ; IL-12= Interleukin-12; TNF-α= Tumor necrosis factor-α. n.d. = nicht detektierbar. N=6 pro Gruppe. Konzentrationen in pg/μl. Tabelle zeigt Mittelwert ± Standardabweichung. Abbildung entnommen aus Schunk et al. Kidney Int 2021.

8.1.4 Immunzellen im Lungengewebe

Die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen des Lungengewebes bei Tieren, die einer Adenindiät unterzogen wurden, zeigten eine Anhäufung Ly6B positiver neutrophiler Granulozyten und Monozyten. Bei zusätzlicher Lungenschädigung durch Zigarettenrauch konnte eine verstärkte Infiltration des Lungengewebes mit Ly6B positiven neutrophilen Granulozyten und Monozyten beobachtet werden (Abbildung 11; Abbildung 12).

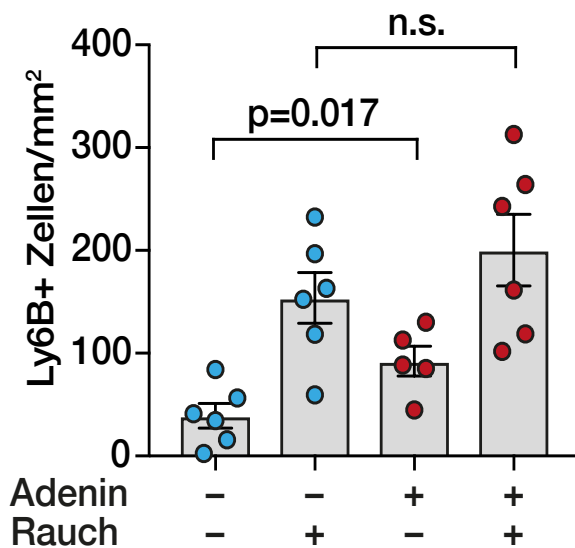


Abbildung 11: Quantifizierung Ly-6B positiver Zellen im Lungengewebe. Auswertung nach drei Wochen Zigarettenrauchexposition, Adenindiät oder beidem gleichzeitig verglichen mit einer Kontrollgruppe. Jeder Punkt entspricht einem Tier. Abbildung entnommen aus Schunk et al. Kidney Int 2021.

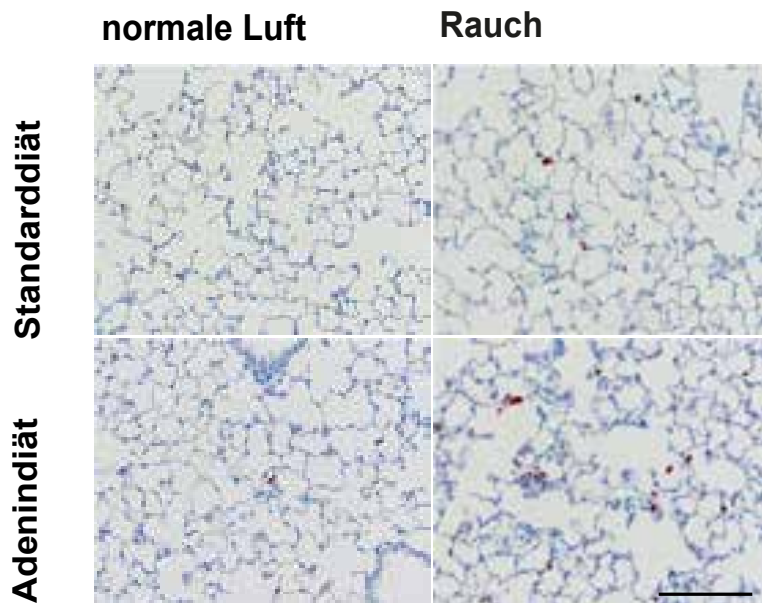


Abbildung 12: Ly-6B Färbung im Lungengewebe. Auswertung nach drei Wochen Zigarettenrauchexposition, Adenindiät oder beidem gleichzeitig verglichen mit einer Kontrollgruppe. Abbildung entnommen aus Schunk et al. Kidney Int 2021.

Zudem zeigte sich, dass nach Rauchexposition die Zahl der CD3⁺ Zellen in der Lunge höher war als in der Kontrollgruppe. Eine alleinige Induktion einer Niereninsuffizienz bei den Tieren hatte ebenfalls Einfluss auf die Akkumulation von T-Zellen im Lungengewebe. Wieder erfolgte bei gleichzeitigem Vorliegen von Lungen- und Nierenschädigung ein signifikanter Anstieg der CD3⁺ Zellzahl (Abbildung 13; Abbildung 14).

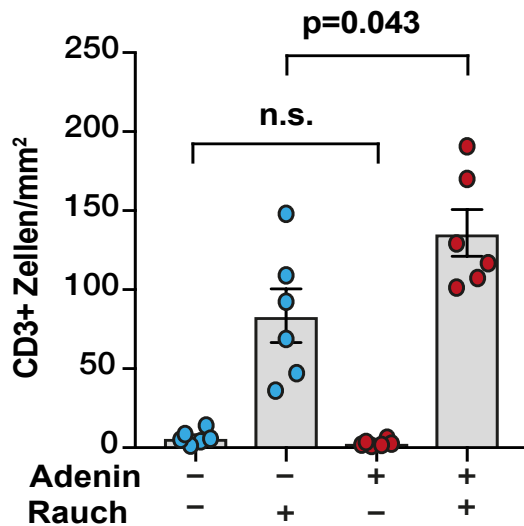


Abbildung 13: Quantifizierung von CD3⁺ Zellen im Lungengewebe in der Lunge. Auswertung nach drei Wochen Zigarettenrauchexposition, Adenindiät oder beidem gleichzeitig verglichen mit einer Kontrollgruppe. Jeder Punkt entspricht einem Tier. Abbildung entnommen aus Schunk et al. *Kidney Int* 2021.

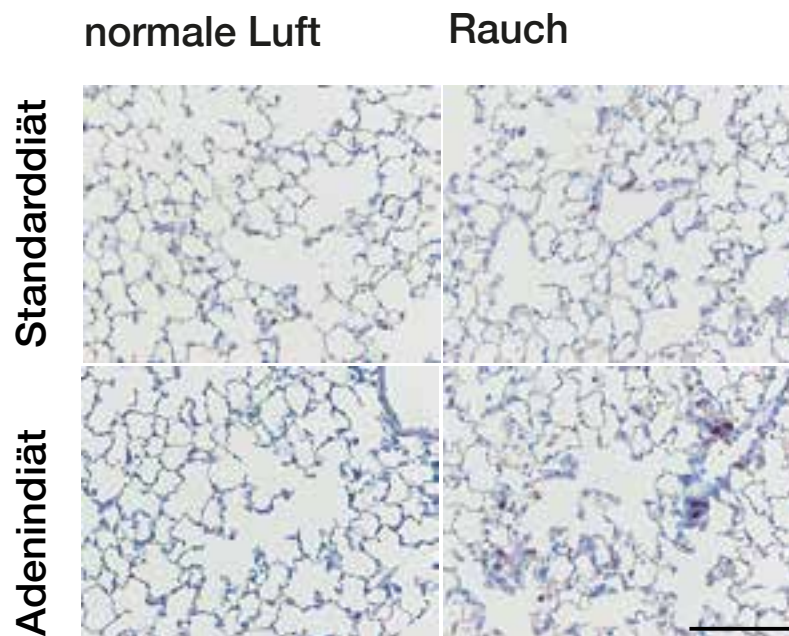


Abbildung 14: CD3-Färbung Zellen im Lungengewebe in der Lunge. Auswertung nach drei Wochen Zigarettenrauchexposition, Adenindiät oder beidem gleichzeitig verglichen mit einer Kontrollgruppe. Abbildung entnommen aus Schunk et al. *Kidney Int* 2021.

8.1.5 Harnstoff und Kreatinin im Serum

Aus der alleinigen Exposition gegenüber Zigarettenrauch resultierte kein Anstieg der Kreatinin- und Harnstoffkonzentration im Serum (Abbildung 15; Abbildung 16). Bei Adenindiät induzierter Nierenschädigung bestand ein deutlicher Anstieg der Harnstoff- und Kreatininkonzentration im Serum. Allerdings zeigte sich kein additiver Effekt, wenn die niereninsuffizienten Tiere gleichzeitig Zigarettenrauch exponiert waren. Ebenfalls wurde keine signifikante Erhöhung der Serumkreatininwerte durch den Einfluss von Zigarettenrauch, weder isoliert noch bei bestehender Nierenschädigung durch Adenindiät, beobachtet.

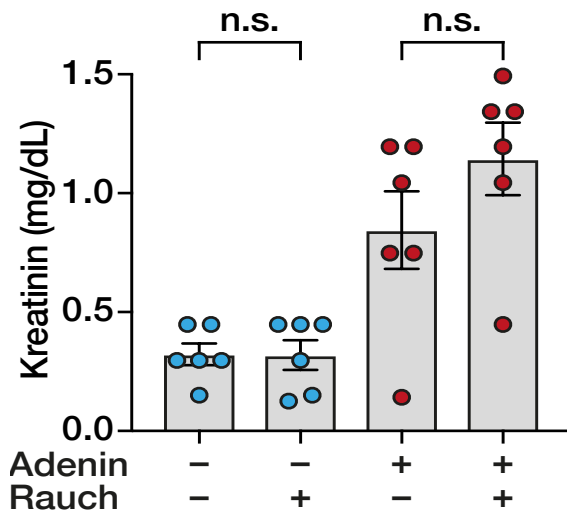


Abbildung 15: Quantifizierung von Kreatinin im Serum.

Auswertung nach drei Wochen Zigarettenrauchexposition, Adenindiät oder beidem gleichzeitig verglichen mit einer Kontrollgruppe. Jeder Punkt entspricht einem Tier. Abbildung entnommen aus Schunk et al. *Kidney Int* 2021.

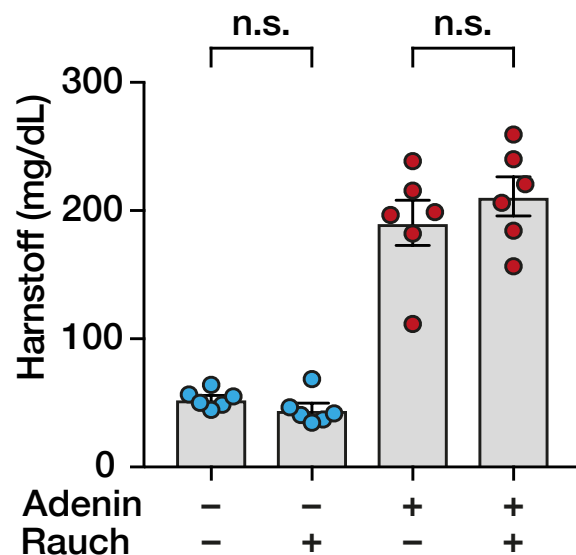


Abbildung 16: Quantifizierung von Harnstoff im Serum.

Auswertung nach drei Wochen Zigarettenrauchexposition, Adenindiät oder beidem gleichzeitig verglichen mit einer Kontrollgruppe. Jeder Punkt entspricht einem Tier. Abbildung entnommen aus Schunk et al. *Kidney Int* 2021.

8.1.6 Nierenfibrose

Zigarettenrauch isoliert hatte keinen Einfluss auf die Entstehung einer Nierenfibrose. Allerdings zeigte sich bei Mäusen, die einer kombinierten Organschädigung unterlagen, eine signifikante schwerere Fibrose, welche noch zunahm im Vergleich zu alleiniger Nierenschädigung (Abbildung 17; Abbildung 18).

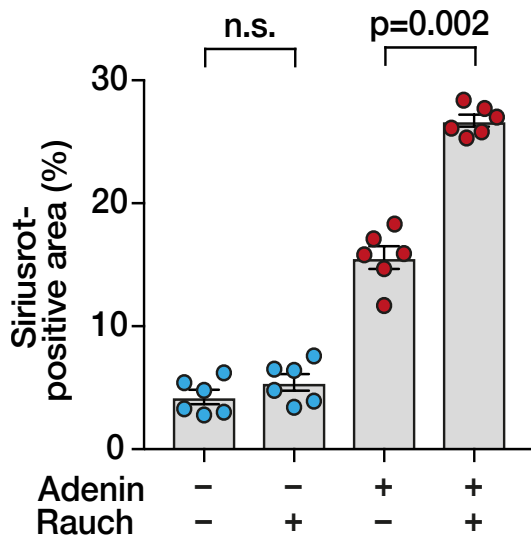


Abbildung 17: Auswertung Siriusrot gefärbter Areale. Auswertung nach drei Wochen Zigarettenrauchexposition, Adenindiät oder beidem gleichzeitig verglichen mit einer Kontrollgruppe. Jeder Punkt entspricht einem Tier. Abbildung entnommen aus Schunk et al. Kidney Int 2021.

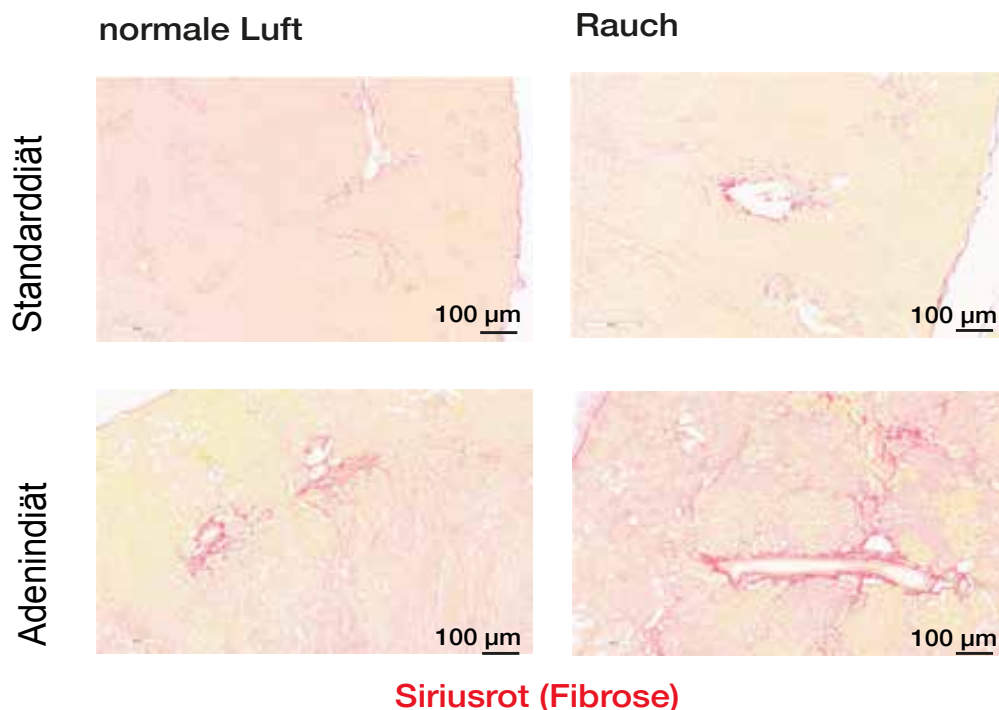


Abbildung 18: Histologische Darstellung der Nierenfibrose in der Siriusrotfärbung. Auswertung nach drei Wochen Zigarettenrauchexposition, Adenindiät oder beidem gleichzeitig verglichen mit einer Kontrollgruppe. Abbildung entnommen aus Schunk et al. Kidney Int 2021.

8.1.7 Renale Neutrophilen-Akkumulation

Wie in Abbildung 15, Abbildung 16 und Abbildung 17 dargestellt, hatte Zigarettenrauch alleine weder Einfluss auf die Harnstoff- und Kreatininkonzentrationen noch auf renale Fibrose, allerdings zeigte sich in der Ly6G Immunfluoreszenzfärbung des Nierengewebes eine signifikante Akkumulation Ly6G-positiver neutrophiler Granulozyten bei Mäusen, die alleiniger Rauchexposition unterlagen, was für die Ausbildung eines proinflammatorischen Mikromilieus spricht. Bei Tieren mit kombinierten Schädigungsmodell stellte sich eine deutliche Zunahme der Ly6-positiven neutrophilen Granulozyten im Nierengewebe dar, was auf einen additiven Effekt von Zigarettenrauch bei bestehender CKD hinweist (Abbildung 19; Abbildung 20).

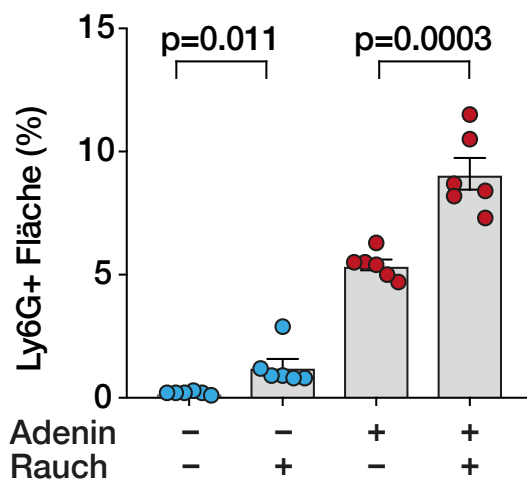


Abbildung 19: Auswertung der Ly6G Expression im Nierengewebe. Auswertung nach 3 Wochen Zigarettenrauchexposition, Adenindiät oder beidem gleichzeitig verglichen mit einer Kontrollgruppe. Jeder Punkt entspricht einem Tier. Abbildung entnommen aus Schunk et al. Kidney Int 2021.

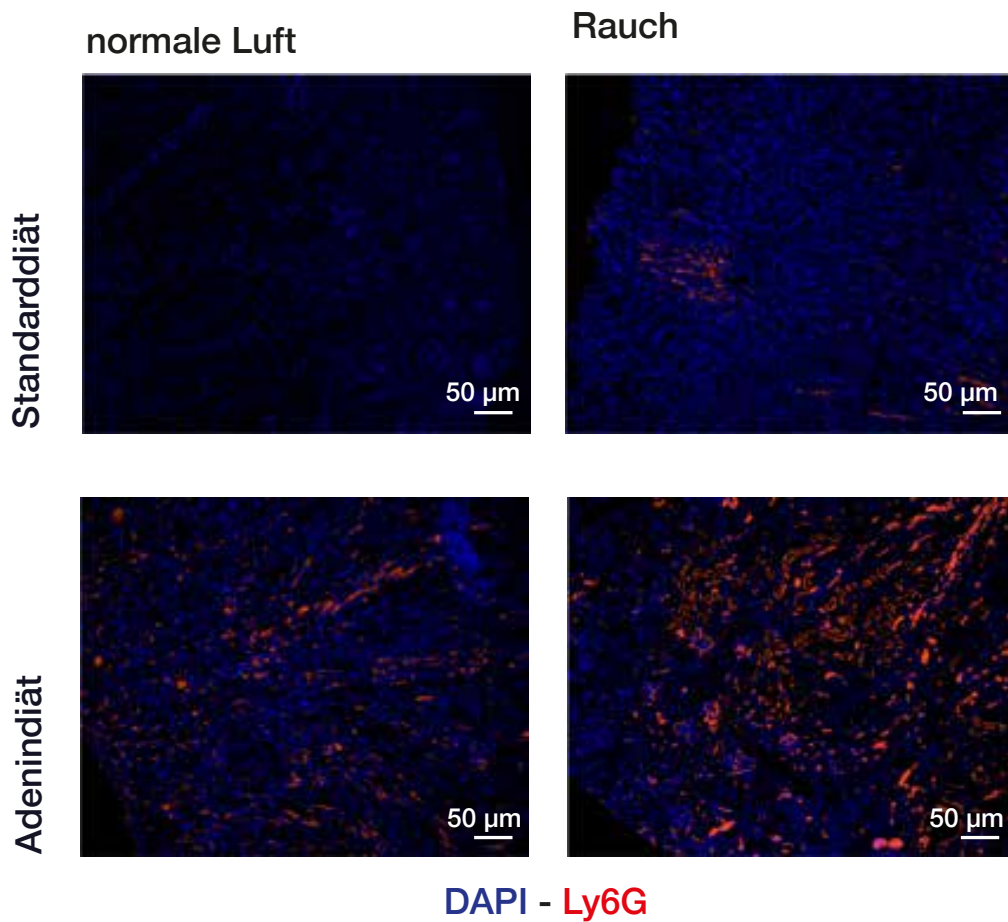


Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung der Ly6G Expression im Nierengewebe. Auswertung nach 3 Wochen Zigarettenrauchexposition, Adenindiät oder beidem gleichzeitig verglichen mit einer Kontrollgruppe. Abbildung entnommen aus Schunk et al. *Kidney Int* 2021.

8.1.8 Renale DKK3-Expression

Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass Zigarettenrauch allein einen signifikanten Einfluss auf die Expression von DKK3 im Nierengewebe hatte. Hierbei war die DKK3 Expression ausschließlich in apikalen Bereichen der Nierentubuli sichtbar. Bei Tieren, die gleichzeitig einer Adenindiät unterzogen wurden, war der Einfluss auf die Expression von DKK3 noch stärker ausgeprägt und die Expression von DKK3 erstreckte sich vom Epithelgewebe über das Interstitium des Nierengewebes. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der DKK3-Expression bei Tieren mit kombinierter Organschädigung (Abbildung 21; Abbildung 22).

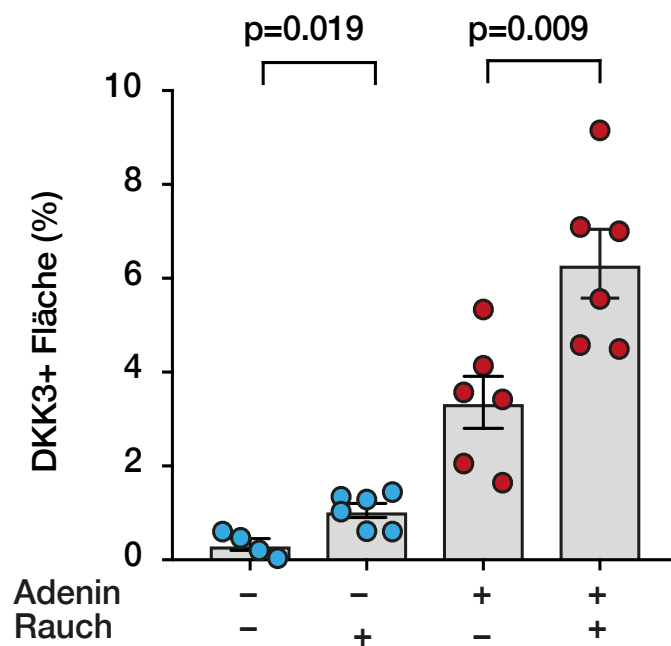


Abbildung 21: Auswertung der DKK3 Expression im Nierengewebe. Auswertung nach 3 Wochen Zigarettenrauchexposition, Adenindiät oder beidem gleichzeitig verglichen mit einer Kontrollgruppe. Jeder Punkt entspricht einem Tier. Abbildung entnommen aus Schunk et al. Kidney Int 2021.

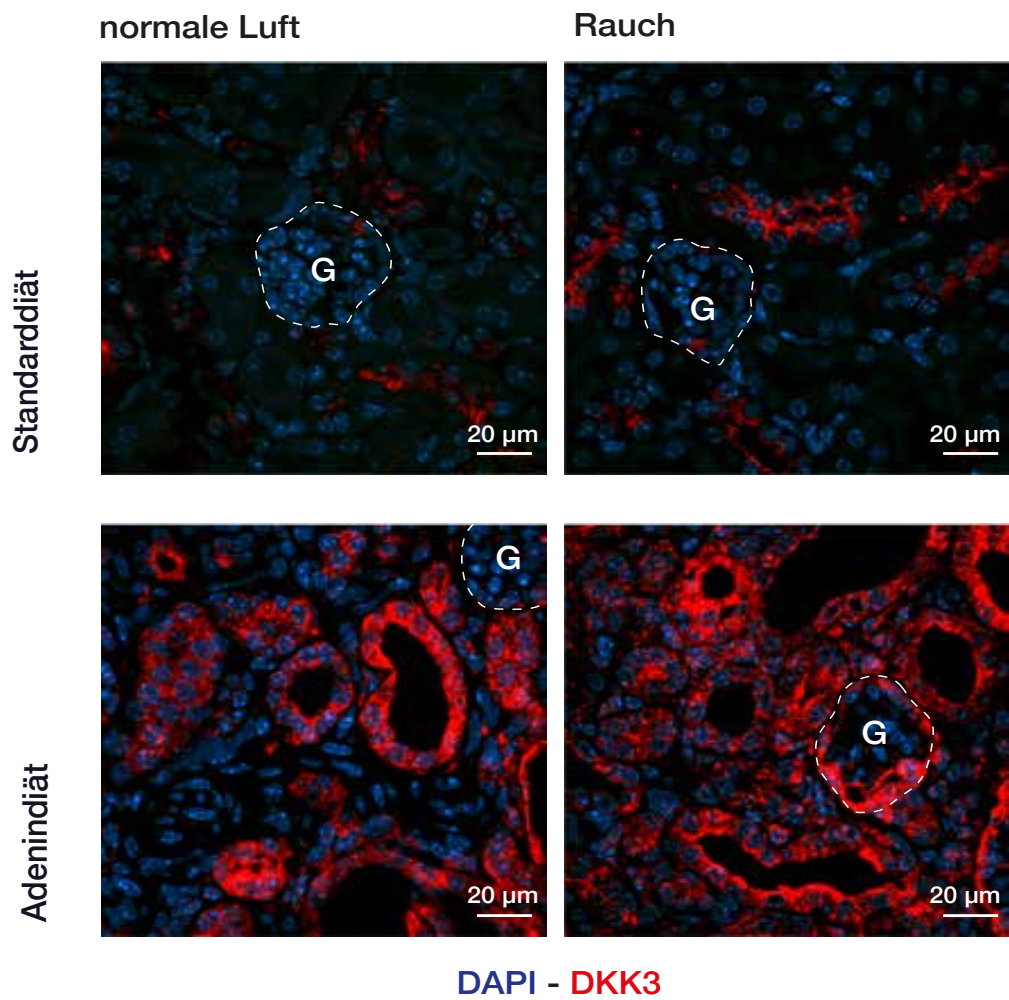


Abbildung 22: Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung der DKK3 Expression im Nierengewebe. G = Glomerulus. Auswertung nach 3 Wochen Zigarettenrauchexposition, Adenindiät oder beidem gleichzeitig verglichen mit einer Kontrollgruppe. Abbildung entnommen aus Schunk et al. *Kidney Int* 2021.

8.1.9 Einfluss von DKK3 auf die Entstehung von Mikroinflammation und Nierenfibrose

Um die Relevanz von DKK3 bei der Induktion und Progredienz eines mikroinflammatorischen Milieus sowie einer Nierenfibrose und konsekutiver Schädigung von Lungen und Nieren weiter zu untersuchen, wurde bei *Dkk3*-defizienten Mäusen eine kombinierte Lungen- und Nierenschädigung induziert.

8.1.9.1 Zellzahl und proinflammatorische Zytokine in BALF und Serum

Zur Darstellung des Einflusses von DKK3 auf die Verstärkung der Inflammation in der Lunge, wurden sowohl die Zytokine als auch die gesamte Zellzahl, neutrophile Granulozyten und Lymphozyten in BALF und Serum von *Dkk3*^{-/-} Mäusen quantifiziert und mit einer Wildtyp Kontrollgruppe verglichen.

8.1.9.2 Immunzellen in der BALF

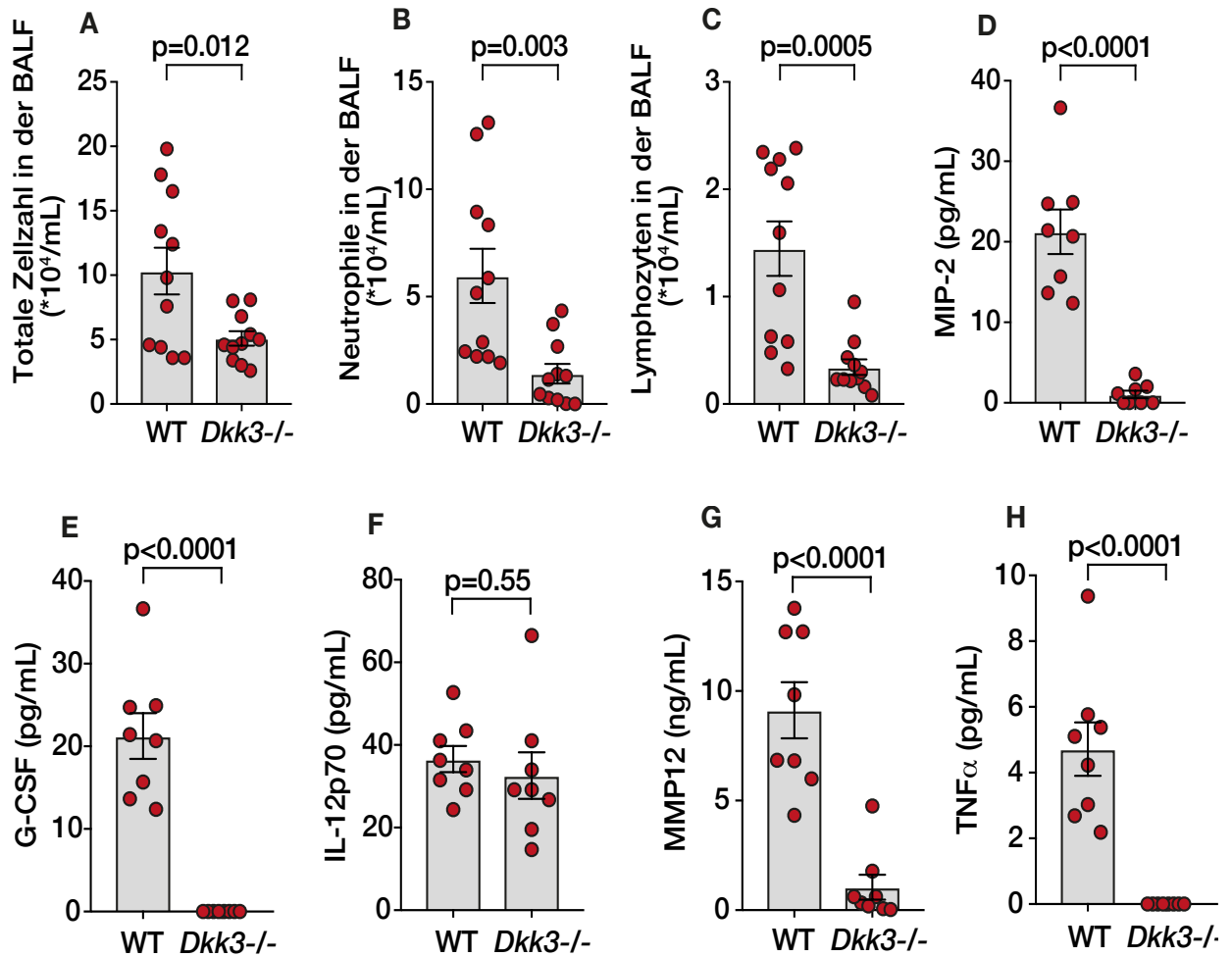


Abbildung 23: Quantifizierung von Immunzellen in der BALF *Dkk3*-defizienter Mäusen und korrespondierender Wildtypmäusen drei Wochen nach kombinierter Zigarettenrauchinhalation und Adenindiät. Jeder Punkt entspricht einem Tier. Abbildung entnommen aus Schunk et al. *Kidney Int* 2021

Wie Abbildung 23A zeigt, konnte bei *Dkk3*-Knockout Tieren eine signifikant geringere totale Zellzahl in der Lavage ermittelt werden. Dementsprechend war auch die Anzahl neutrophiler Granulozyten und Lymphozyten in der BALF bei den Knock-out Tieren signifikant geringer (Abb. Abbildung 23 B und C).

Betrachtet man die Konzentration der proinflammatorischen Zytokine, so sieht man hier auch deutlich den Effekt, den DKK3 auf die Konzentration der Zytokine in der Bronchiallavage hat. Sowohl die Konzentration von MIP-2 (Abbildung 23-D), G-CSF (Abbildung 23-E), MMP12 (Abbildung 23-G) und TNF- α (Abbildung 23-H) sind in der BALF von *Dkk3*^{-/-} Mäusen signifikant erniedrigt im Vergleich zu Wildtypmäusen.

8.1.9.3 Kreatinin und Harnstoff

In *Dkk3* Knock-out Mäusen konnten im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle signifikant geringere Konzentrationen von Kreatinin (Abbildung 24) und Harnstoff (Abbildung 25) quantifiziert werden. Dies zeigt, dass DKK3 bei der Entstehung einer Niereninsuffizienz von Relevanz ist.

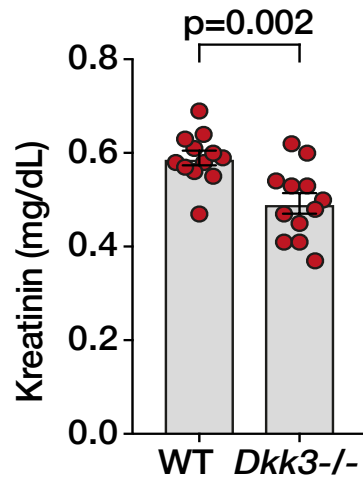


Abbildung 24: Quantifizierung von Serum-Kreatinin.

Auswertung nach drei Wochen kombinierter Organschädigung bei *Dkk3*-defizienten Mäusen verglichen mit einer Wildtyp-Kontrollgruppe. Jeder Punkt entspricht einem Tier. Abbildung entnommen aus Schunk et al. *Kidney Int* 2021.

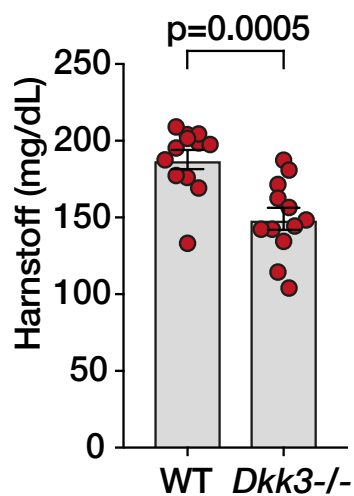


Abbildung 25: Quantifizierung von Serum-Harnstoff.

Auswertung nach drei Wochen kombinierter Organschädigung bei *Dkk3*-defizienten Mäusen verglichen mit einer Wildtyp-Kontrollgruppe. Jeder Punkt entspricht einem Tier. Abbildung entnommen aus Schunk et al. *Kidney Int* 2021

8.1.9.4 Nierenfibrose

Die Auswertung der Siriusrot-positiven Fläche ergab eine signifikante Verminderung der Fibrose bei *Dkk3*^{-/-} Mäusen verglichen mit einer Wildtypkontrolle bei Exposition zu Zigarettenrauch und gleichzeitiger Adenin-Diät (Abbildung 26; Abbildung 27).

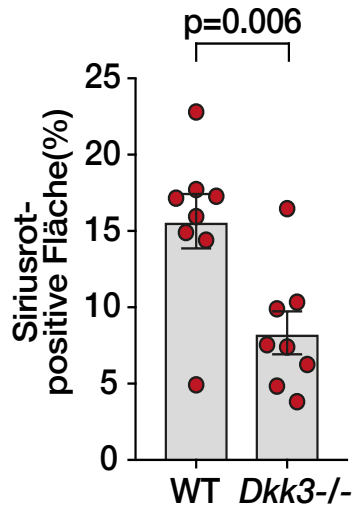


Abbildung 26: Quantifizierung der Fibrose anhand der Siriusrotfärbung. Auswertung nach drei Wochen kombinierter Organschädigung bei *Dkk3* defizienten Mäusen verglichen mit einer Wildtyp-Kontrollgruppe. Jeder Punkt entspricht einem Tier. Abbildung entnommen aus Schunk et al. *Kidney Int* 2021.

Siriusrot (Fibrose)

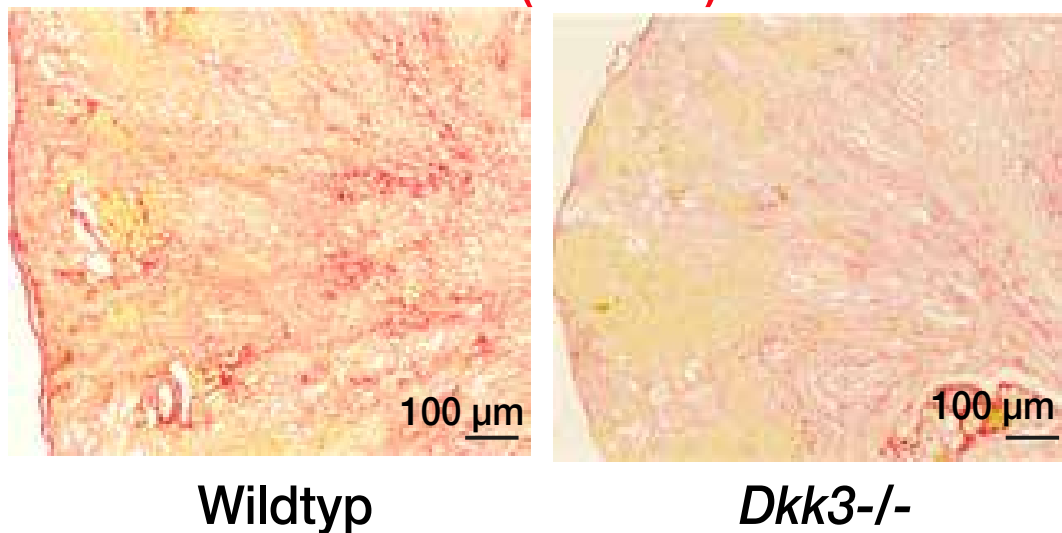


Abbildung 27: Histologische Darstellung der Nierenfibrose in der Siriusrotfärbung. Auswertung nach drei Wochen kombinierter Organschädigung bei *Dkk3* defizienten Mäusen verglichen mit einer Wildtyp-Kontrollgruppe. Abbildung entnommen aus Schunk et al. *Kidney Int* 2021.

8.2 Klinische Studie

8.2.1 Outline der Analysen in COSYCONET

Um eine Verknüpfung zwischen den tierexperimentell erhobenen Daten und klinischer Relevanz bei Patienten zu überprüfen, wurde der Zusammenhang zwischen Nierenschädigung und der Lungenfunktion an Probanden der COSYCONET Kohorte erfasst. In dieser Studie wurde die DKK3- Konzentration im Urin zu Beginn der Studie gemessen und dessen Zusammenhang im Verlauf mit den Funktionsparametern für eine Nierenschädigung (eGFR) und Lungendysfunktion (FEV₁) untersucht (Abbildung 28).

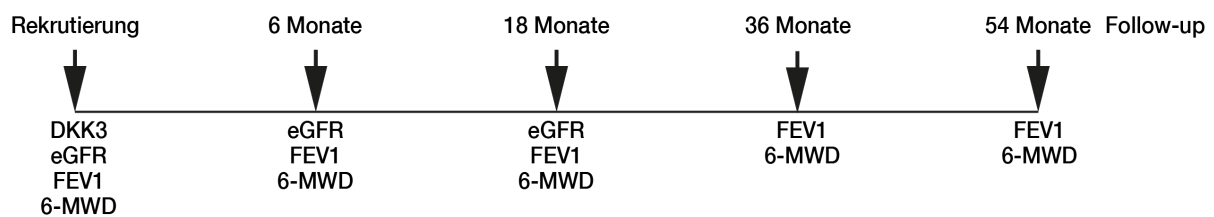


Abbildung 28: Outline der Studie.
Abbildung entnommen aus Schunk et al. Kidney Int 2021.

8.2.2 Baseline-Charakteristika

Tabelle 5 zeigt die Baseline-Charakteristika der Probanden in der COSYCONET Studie. Hier wurden die DKK3 Konzentrationen im Urin zu Beginn der Studie gemessen und in zwei Gruppen eingeteilt (≤ 200 pg/mg Kreatinin bzw. > 200 pg/mg Kreatinin). Im Verlauf wurden Baseline-DKK3-Konzentrationen von ≤ 200 pg/mg Kreatinin als Referenzwert betrachtet. Die Baseline-Werte für die eGFR und die FEV₁ unterschieden sich hierbei nicht zwischen den verschiedenen DKK3 Gruppen.

	Komplette Kohorte	Urin-DKK3 ≤ 200 pg/mg Kreatinin (n=1048)	Urin-DKK3 > 200 pg/mg Kreatinin (n=1266)	P
Alter (Jahre)	65 \pm 8,6	64,2 \pm 8,5	65,3 \pm 8,7	0,001
Geschlecht (% ♂)	59,1	60,2	58,2	0,328
BMI (kg/m²)	27, \pm 5,4	27,5 \pm 5,4	26,8 \pm 5,4	0,001
GOLD 0 (%)	15	16,3	13,9	0,047
GOLD 1 (%)	10,4	10,7	10,1	
GOLD 2 (%)	37,8	36,8	38,7	
GOLD 3 (%)	29,6	27,7	31,1	
GOLD 4 (%)	7,2	8,4	6,1	
FEV₁ (% vorhergesagt)	55 (30)	55 (32)	55 (29)	0,469
TLCO (% vorhergesagt)	53,7 (29,7)	55,2 (29,1)	53,5 (29,5)	0,235
Raucher (%)	92,4	92,6	92,2	0,915
Packyears (-)	42 (42,5)	43 (41,5)	42,5 (44,3)	0,824
Serum Kreatinin (mg/dl)	0,9 \pm 0,2	0,9 \pm 0,2	0,9 \pm 0,2	0,991

eGFR (ml/min/1,73m²)	82 ± 16,4	82,5 ± 16	81,3 ± 16,7	0,119
Urin-DKK3 (pg/mg Kreatinin)	227 (414)	77 (119)	467 (493)	<0,00 1
Proteinurie (mg/g Kreatinin)	5 (6)	4 (4)	5 (7)	<0,00 1

Tabelle 5: Baseline-Charakteristika der Probanden in der COSYCONET Kohorte.
Tabelle zeigt Mittelwert ± Standardabweichung oder Median (Interquartilsbereich).
Abbildung entnommen aus Schunk et al. Kidney Int 2021.

8.2.3 Assoziation zwischen Urin-DKK3 und Änderung der FEV₁

Zur Darstellung des Einflusses einer Nierenschädigung auf die Funktion der Lungen wurden Trajekturen der Lungenfunktionsänderung anhand der Änderung der FEV₁ über die Zeit generiert. Hierdurch konnten die Probanden in 3 Gruppen eingeteilt werden. Gruppe A: steigende FEV₁, Gruppe B: stabile FEV₁ und Gruppe C: sinkende FEV₁. 2,5% der Probanden zeigten eine Verbesserung der Lungenfunktion (Gruppe A). Bei 58,1% war die FEV₁ konstant (Gruppe B) und bei 39,4% konnte ein Abfall der FEV₁ beobachtet werden (Gruppe C) (Abbildung 29).

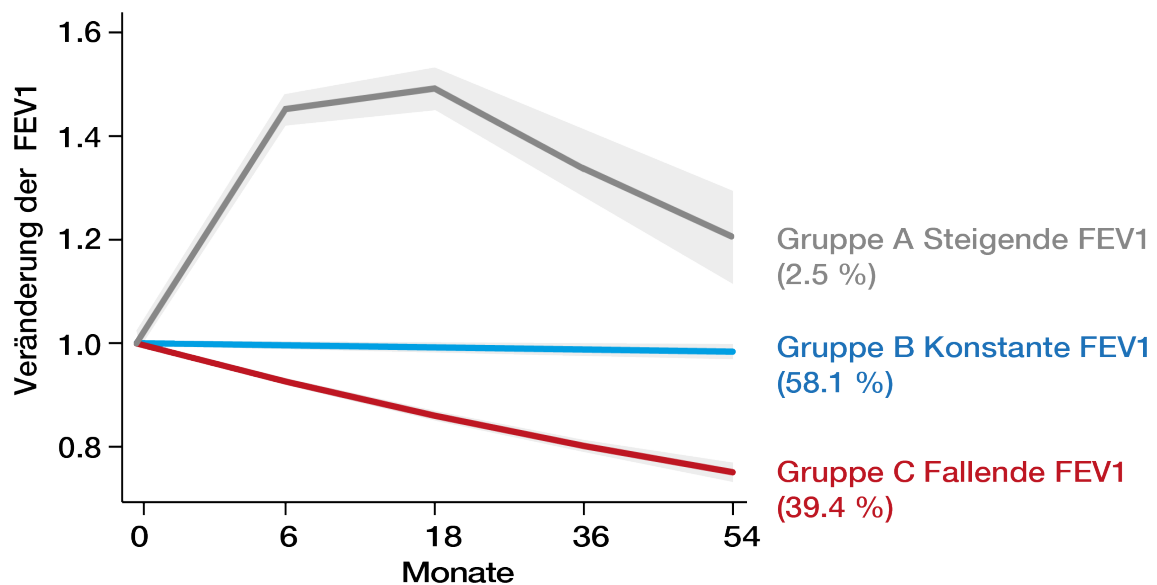


Abbildung 29: Einteilung der der FEV₁ mittels Trajekturen in 3 Gruppen. Die farbig dargestellten Linien visualisieren den Verlauf der FEV₁ in den einzelnen Gruppen. Abgeblasste Ränder stellen das 95% KI dar. Abbildung entnommen aus Schunk et al. Kidney Int 2021.

Probanden, die initial erhöhte Urin-DKK3 Konzentrationen aufwiesen, hatten im Follow-up ein signifikant erhöhtes Risiko der Gruppe C (Fallende FEV₁) zugeordnet zu werden (OR 3,36 bei 95% KI 2,22-5,08, P<0,001, Abbildung 30).

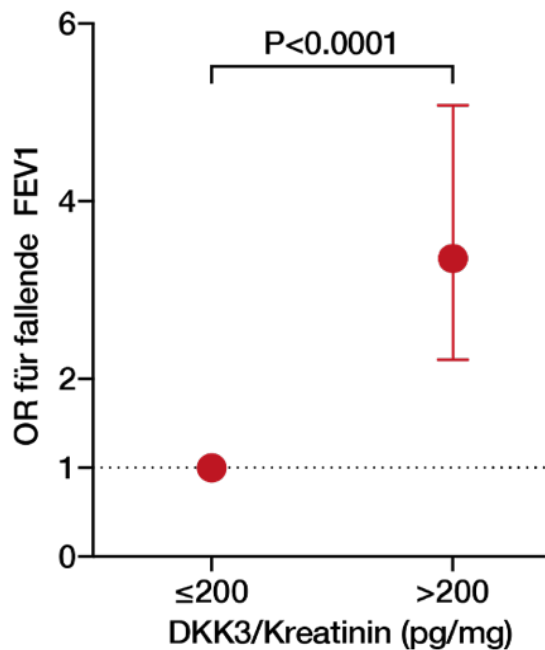


Abbildung 30: Zusammenhang zwischen Urin-DKK3 und dem Risiko für die Zuordnung in die Trajektorengruppe C FEV₁. Dargestellt ist die Odds ratio (OR) mit den entsprechenden 95% Konfidenzintervallen. Adjustiert für Alter, Geschlecht, GOLD-Stadium, Raucherstatus, BMI, initiale Nierenfunktion (eGFR) und Proteinurie. Abbildung entnommen aus Schunk et al. Kidney Int 2021.

Diese Assoziation bestand sowohl in der univariaten Analyse als auch nach Adjustierung für verschiedene Parameter (Alter, Geschlecht, GOLD-Stadium, Raucherstatus, BMI, initiale Nierenfunktion (eGFR) und Proteinurie) (Tabelle 6).

Modell	Urin-DKK3 Kategorie (pg/mg Kreatinin)	OR (95% KI)	P
Unadjustiert	≤200	Referenz	
	>200	3,36 (2,22 - 5,02)	<0,001
Adjustiert	≤200	Referenz	
	>200	3,36 (2,22 - 5,08)	<0,001

Tabelle 6: Logistische Regressionsanalyse zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen der Urin-DKK3-Konzentration und der Zuordnung zur FEV₁ Trajektorengruppe C (abfallende FEV₁). Adjustiert für Alter, Geschlecht, GOLD-Stadium, Raucherstatus, BMI, initiale Nierenfunktion (eGFR) und Proteinurie. Abbildung entnommen aus Schunk et al. Kidney Int 2021.

Um hier den Effekt anderer Marker einer Nierenschädigung (eGFR und Proteinurie) zu untersuchen, wurde eine multivariate Regressionsanalyse durchgeführt. Hier bestand kein statistischer Zusammenhang zwischen eGFR oder Proteinurie mit einem erhöhten Risiko für einen Verlust der FEV₁ im Verlauf (Tabelle 7).

Modell	Variable	OR	95% KI	P
Unadjustiert	eGFR	1,00	0,99 -1,01	0,130
	Proteinurie	0,99	0,99 -10,1	0,955
Adjustiert	eGFR	1,00	0,99 -1,01	0,531
	Proteinurie	0,99	0,99 -0,01	0,955

Tabelle 7: Zusammenhang zwischen eGFR und Proteinurie und dem Risiko für eine abfallende FEV₁. Adjustiert für Alter, Geschlecht, GOLD-Stadium, Raucherstatus, BMI, initiale Nierenfunktion (eGFR) und Proteinurie. Abbildung entnommen aus Schunk et al. Kidney Int 2021.

8.2.4 Assoziation zwischen Urin-DKK3 und dem Exazerbationsrisiko

Patienten mit initial erhöhten Urin DKK3-Konzentrationen wiesen im Follow-up ein 1,24-fach erhöhtes Risiko auf, eine Exazerbation ihrer COPD zu erleiden (Tabelle 8). Dieser Zusammenhang blieb nach Adjustieren der Daten weiterhin bestehen.

Modell	Urin-DKK3 Kategorie (pg/mg Kreatinin)	HR	95% KI	P
Unadjustiert	≤200	Referenz		
	>200	1,19	1,00 - 1,43	0,055
Adjustiert	≤200	Referenz		
	>200	1,24	1,03 - 1,50	0,026

Tabelle 8: Zusammenhang zwischen Urin-DKK3 und dem Risiko einer Exazerbation der COPD im Follow-up. Adjustiert für Alter, Geschlecht, GOLD-Stadium, Raucherstatus, BMI, initiale Nierenfunktion (eGFR) und Proteinurie. Abbildung entnommen aus Schunk et al. Kidney Int 2021.

8.2.5 Assoziation zwischen Urin-DKK3 und der körperlichen Leistungsfähigkeit

Weiterhin waren erhöhte DKK3-Konzentrationen im Urin mit signifikant niedriger körperlicher Leistungsfähigkeit, quantifiziert durch die 6-Minuten Gehstrecke, assoziiert. Dieser Zusammenhang bestand auch nach Adjustierung für verschiedene Kovariaten. (Tabelle 9).

6-Minuten Gehstrecke nach 1 Jahr				
Modell	Urin-DKK3 Kategorie (pg/mg Kreatinin)	Mittelwert (m)	95% KI	P
Unadjustiert	≤200	424,6	418,1 - 431,2	Referenz
	>200	420,4	414,4 - 426,4	0,348
Adjustiert	≤200	429,8	424,3 - 435,3	Referenz
	>200	422,6	417,4 - 427,7	0,018

Tabelle 9: Zusammenhang zwischen Urin-DKK3 und der körperlichen Leistungsfähigkeit. Mittelwerte der 6-Minuten Gehstrecke entsprechen der DKK3-Urinkonzentrationen. Adjustiert für Alter, Geschlecht, GOLD-Stadium, Raucherstatus, BMI, initiale Nierenfunktion (eGFR) und Proteinurie. Abbildung entnommen aus Schunk et al. Kidney Int 2021.

8.3 DKK3 und Progression der Niereninsuffizienz

8.3.1 Assoziation zwischen Urin-DKK3 und Änderung der eGFR

Initial erhöhte Konzentrationen von DKK3 im Urin waren mit einem signifikanten Abfall der eGFR nach 6 Monaten assoziiert. Bei dem oben beschriebenen Cut-off Wert von 200pg/mg Kreatinin zeigte sich, dass Probanden, die unterhalb dieser Grenze lagen, im Verlauf eine konstante Nierenfunktion aufweisen konnten. Bei Probanden mit DKK3-Urinkonzentrationen >200pg/mg Kreatinin konnte man einen Abfall der eGFR von 0,8% (Abbildung 31; Tabelle 10) bzw. um 0,7 ml/min/1,73m² (Tabelle 11) nach 6 Monaten beobachten.

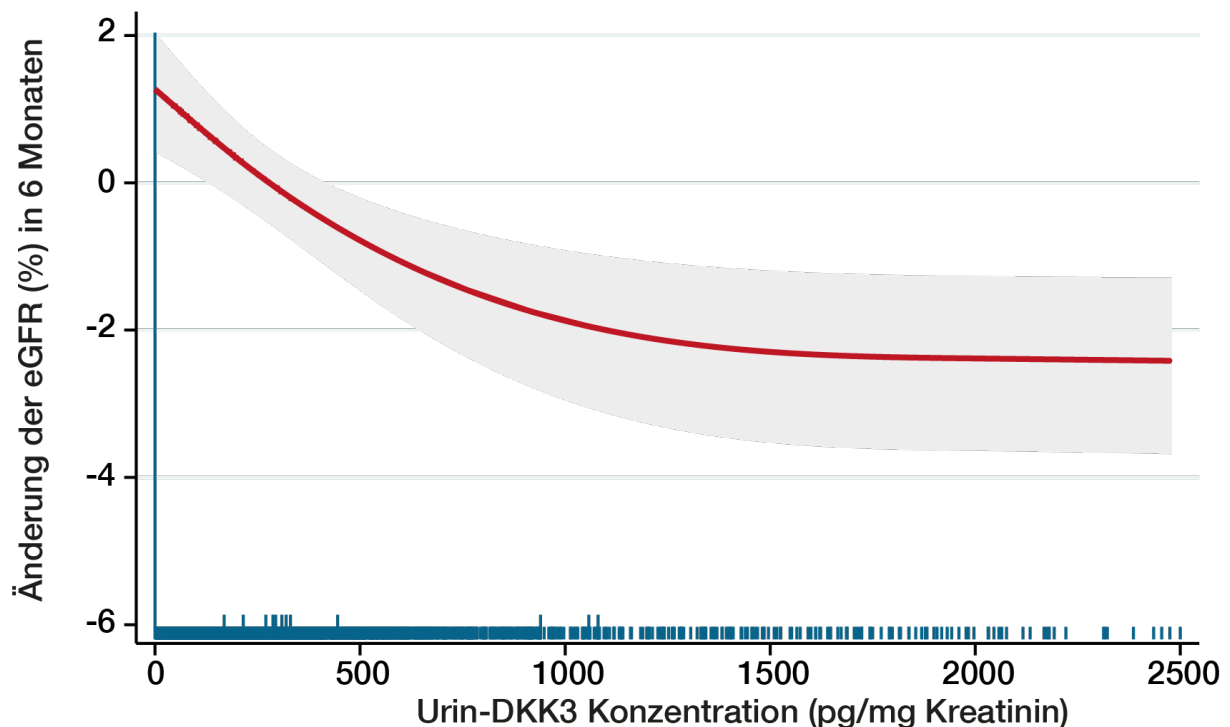


Abbildung 31: Änderung der eGFR (%) in 6 Monaten anhand der initialen DKK3 Konzentration. Die rote Linie zeigt den Abfall der eGFR über 6 Monate, der graue Randbereich stellt das 95% KI dar. Die blauen Spikes visualisieren die unterschiedlichen Verteilungen der Urin-DKK3-Konzentrationen. Adjustiert für Alter, Geschlecht, GOLD-Stadium, Raucherstatus, BMI, initiale Nierenfunktion (eGFR) und Proteinurie. Abbildung entnommen aus Schunk et al. *Kidney Int* 2021.

Änderung der eGFR nach 6 Monaten				
Modell	Urin-DKK3 Kategorie (pg/mg Kreatinin)	Mittelwert der Änderung der eGFR (%)	95% KI	P
Unadjustiert	≤200	1,2	0,4 - 1,9	Referenz
	>200	-1,1	-1,8 - -0,4	<0,0001
Adjustiert	≤200	1,7	0,7 - 2,6	Referenz
	>200	-0,8	-1,6 - 0,2	<0,0001

Tabelle 10: Prozentuale Veränderungen der eGFR nach 6 Monaten. Adjustiert für Alter, Geschlecht, GOLD-Stadium, Raucherstatus, BMI, initiale Nierenfunktion (eGFR) und Proteinurie. Abbildung entnommen aus Schunk et al. Kidney Int 2021.

Änderung der eGFR nach 6 Monaten				
Modell	Urin-DKK3 Kategorie (pg/mg Kreatinin)	Mittelwert der Änderung der eGFR (ml/min/1,73m ²)	95% KI	P
Unadjustiert	≤200	-0,4	-1,0 - 0,2	Referenz
	>200	-0,9	-1,4 - -0,4	0,205
Adjustiert	≤200	0,2	-0,6 - 0,9	Referenz
	>200	-0,7	-1,4 - 0,0	0,041

Tabelle 11: Änderung der eGFR in ml/min/1,73m² nach 6 Monaten. Adjustiert für Alter, Geschlecht, GOLD-Stadium, Raucherstatus, BMI, initiale Nierenfunktion (eGFR) und Proteinurie. Abbildung entnommen aus Schunk et al. Kidney Int 2021.

Der Zusammenhang zwischen Urin-DKK3 und der Änderung der eGFR nach 18 Monaten ist in Abbildung 32 (Tabelle 12; Tabelle 13) dargestellt.

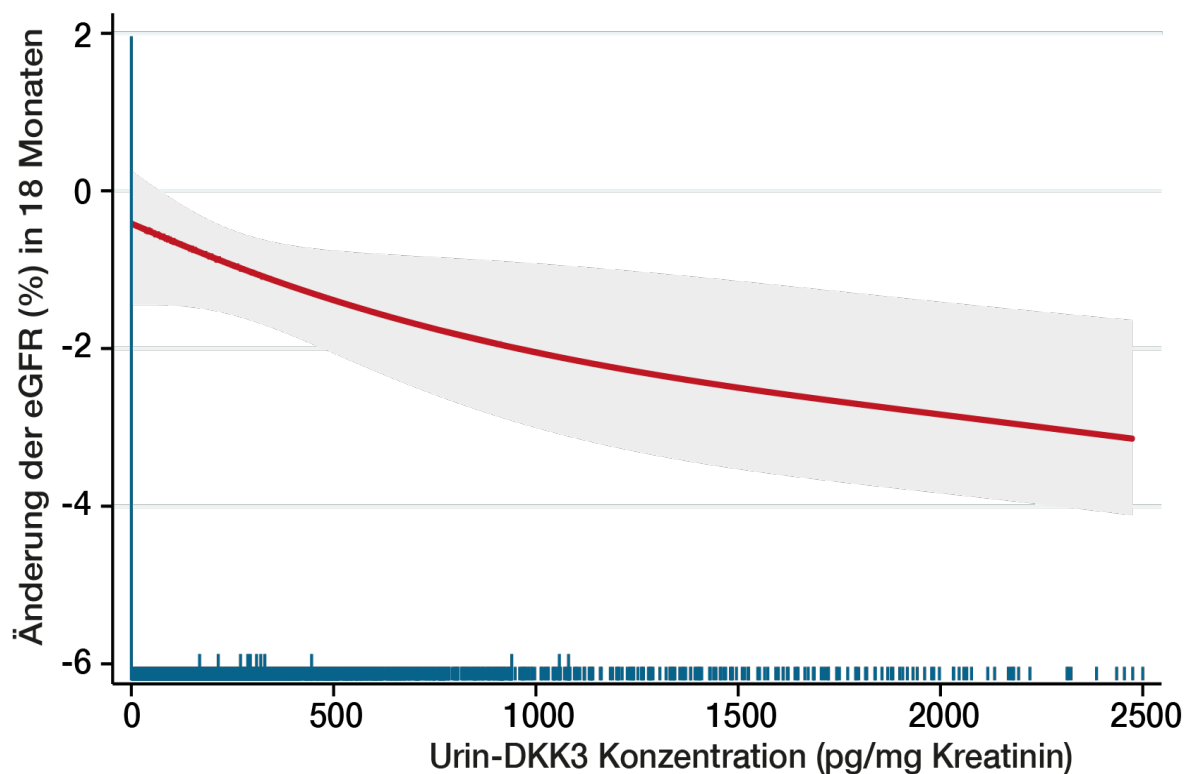


Abbildung 32: Änderung der eGFR (%) nach 18 Monaten anhand der initialen DKK3 Konzentration.

Die rote Linie zeigt den Abfall der eGFR über 6 Monate, der graue Randbereich stellt das 95% KI dar. Die blauen Spikes visualisieren die unterschiedlichen Verteilungen der Urin-DKK3 Konzentrationen. Adjustiert für Alter, Geschlecht, GOLD-Stadium, Raucherstatus, BMI, initiale Nierenfunktion (eGFR) und Proteinurie. Abbildung entnommen aus Schunk et al. *Kidney Int* 2021.

Änderung der eGFR nach 18 Monaten				
Modell	Urin-DKK3 Kategorie (pg/mg Kreatinin)	Mittelwert der Änderung der eGFR (%)	95% KI	P
Unadjustiert	≤200	-0,2	-1,1 - 0,7	Referenz
	>200	-1,9	-2,7 - -1,1	0,010
Adjustiert	≤200	0,2	-0,9 - 1,4	Referenz
	>200	-1,6	-2,6 - -0,5	0,005

Tabelle 12: Zusammenhang zwischen Urin-DKK3 und der prozentualen Veränderung der eGFR nach 18 Monaten. Adjustiert für Alter, Geschlecht, GOLD-Stadium, Raucherstatus, BMI, initiale Nierenfunktion (eGFR) und Proteinurie. Abbildung entnommen aus Schunk et al. Kidney Int 2021.

Änderung der eGFR nach 18 Monaten				
Modell	Urin-DKK3 Kategorie (pg/mg Kreatinin)	Mittelwert der Änderung der eGFR (ml/min/1,73m²)	95% KI	P
Unadjustiert	≤200	-0,7	-1,4 - 0,0	Referenz
	>200	-1,9	-2,5 - -1,3	0,012
Adjustiert	≤200	-0,4	-1,2 - 0,5	Referenz
	>200	-1,7	-2,5 - -0,9	0,005

Tabelle 13: Zusammenhang zwischen Urin-DKK3 und der Veränderung der eGFR in ml/min/1,73m² nach 18 Monaten. Adjustiert für Alter, Geschlecht, GOLD-Stadium, Raucherstatus, BMI, initiale Nierenfunktion (eGFR) und Proteinurie. Abbildung entnommen aus Schunk et al. Kidney Int 2021.

8.3.2 DKK3 und Trajekturen der eGFR

Analog der Einteilung von Probanden in 3 Gruppen zur Darstellung der verschiedenen Verläufe der FEV₁ im Follow-up wurden die Probanden zur Beurteilung der Nierenfunktion (eGFR) während des Follow-ups ebenfalls mittels Trajekturen in 3 Gruppen (A-C) unterteilt (Abbildung 33). Bei 9% der Teilnehmer konnte ein Anstieg der eGFR im Nachbeobachtungszeitraum verzeichnet werden (Gruppe A; vermutlich wegen eines AKI während der Datenerfassung mit Erholung der Nierenfunktion im Verlauf), wohingegen es bei 16,5% der Probanden zu einem Verlust der Nierenfunktion kam (Gruppe C). Der größte Anteil (74%) der Probanden zeichnete sich durch eine konstante Nierenfunktion während der Follow-ups aus (Gruppe B).

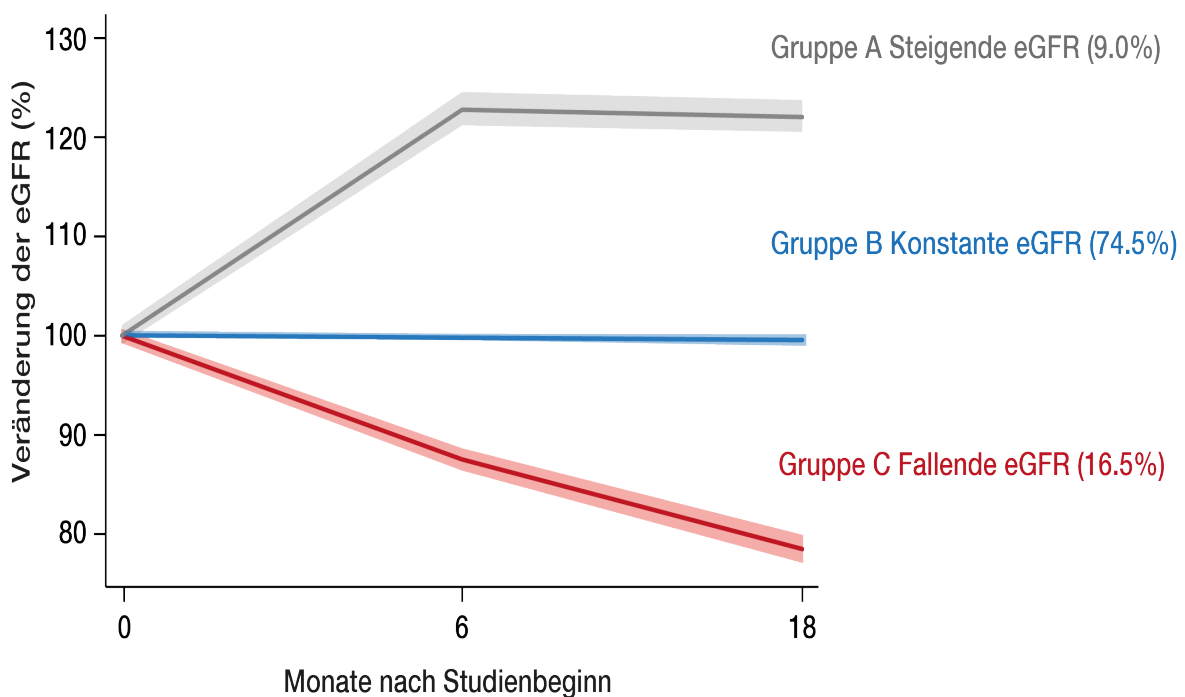


Abbildung 33: Darstellung des Verlaufes der eGFR über die Zeit mithilfe von Trajekturen. Die farbig dargestellten Linien visualisieren den Verlauf der eGFR in den einzelnen Gruppen. Abgeblasste Ränder stellen das 95% KI dar. Abbildung entnommen aus Schunk et al. *Kidney Int* 2021.

Danach wurde der Zusammenhang zwischen Urin-DKK3 und dem Risiko für die Zuordnung zur Trajekturen-Gruppe C ‚fallende eGFR‘ untersucht. Probanden mit initialen DKK3-Werten ≤ 200 pg/mg dienten als Referenz. Initial höhere DKK3-Konzentrationen waren sowohl in der univariaten als auch multivariat adjustierten Analyse mit einem erhöhten Risiko für eine abfallende eGFR im Verlauf assoziiert (Abbildung 34 und Tabelle 14).

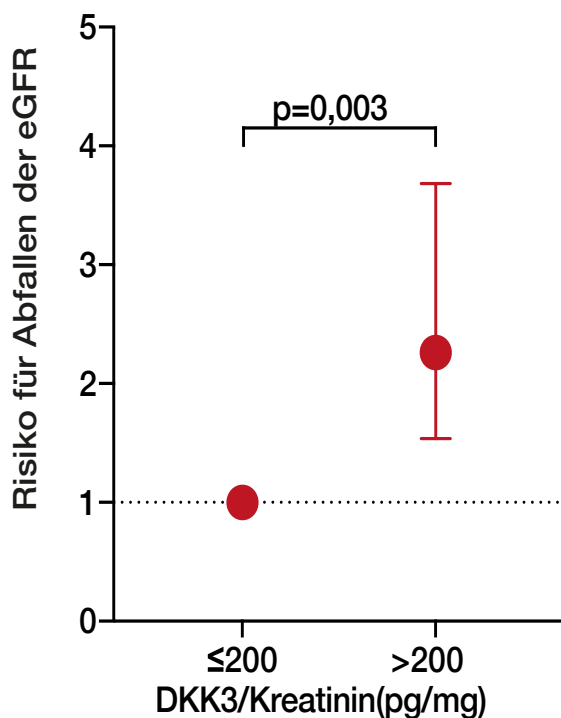


Abbildung 34: Zusammenhang zwischen der DKK3-Konzentration im Urin und dem Risiko für eine fallende eGFR im Verlauf (Trajektoengruppe C). Adjustiert für Alter, Geschlecht, GOLD-Stadium, Raucherstatus, BMI, initiale Nierenfunktion (eGFR) und Proteinurie. Abbildung entnommen aus Schunk et al. *Kidney Int* 2021.

Modell	Urin-DKK3 Kategorie (pg/mg Kreatinin)	OR	95% KI	P
Unadjustiert	≤200	Referenz		
	>200	1,46	1,11 - 1,93	0,007
Adjustiert	≤200	Referenz		
	>200	1,54	1,13 - 2,08	0,003

Tabelle 14: Logistische Regressionsanalyse für den Zusammenhang zwischen der Urin DKK3-Konzentration und dem Risiko für eine abfallende eGFR im Verlauf (Trajektoengruppe C). Adjustiert für Alter, Geschlecht, GOLD-Stadium, Raucherstatus, BMI, initiale Nierenfunktion (eGFR) und Proteinurie. Abbildung entnommen aus Schunk et al. *Kidney Int* 2021.

8.3.3 Initiale Proteinurie, eGFR und Trajekturen der eGFR

Im Gegensatz zu Urin-DKK3 zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der initialen Proteinurie oder der initialen eGFR und dem Risiko für eine abfallende eGFR im Verlauf (Tabelle 15; Tabelle 16).

Modell	Baseline-Proteinurie-Kategorie (mg/g Kreatinin)	OR	95% KI	P
Unadjustiert	<30	Referenz		
	≥30	1,44	0,62 - 2,41	0,296
Adjustiert	<30	Referenz		
	≥30	1,16	0,50 - 2,09	0,697

Tabelle 15: Logistische Regressionsanalyse für den Zusammenhang zwischen Baseline-Proteinurie der eGFR Gruppe C (fallende eGFR).

Adjustiert für Alter, Geschlecht, GOLD-Stadium, Raucherstatus, BMI, initiale Nierenfunktion (eGFR). Abbildung entnommen aus Schunk et al. Kidney Int 2021.

Modell	Baseline-eGFR Kategorie (ml/min/1,73m ²)	OR	95% KI	P
Unadjustiert	≥90	Referenz		
	60-89	0,94	0,69 - 1,27	0,704
	<60	1,03	0,59 - 1,54	0,912
Adjustiert	≥90	Referenz		
	60-89	0,95	0,63 - 1,47	0,824
	<60	0,98	0,52 - 1,65	0,950

Tabelle 16: Logistische Regressionsanalyse für den Zusammenhang zwischen logarithmierter Baseline-eGFR und der eGFR Gruppe C (fallende eGFR).

Adjustiert für Alter, Geschlecht, GOLD-Stadium, Raucherstatus, BMI, Proteinurie. Abbildung entnommen aus Schunk et al. Kidney Int 2021.

8.4 Urin-DKK3 und Mortalität

Während des medianen Follow-up von 37,1 Monaten (IQR 33,4) verstarben 191 Patienten der COSYCONET Kohorte. Hier waren initial erhöhte DKK3-Konzentrationen im Urin mit einem 1,49-fach höheren Risiko zu versterben assoziiert (Abbildung 35 und Tabelle 17).

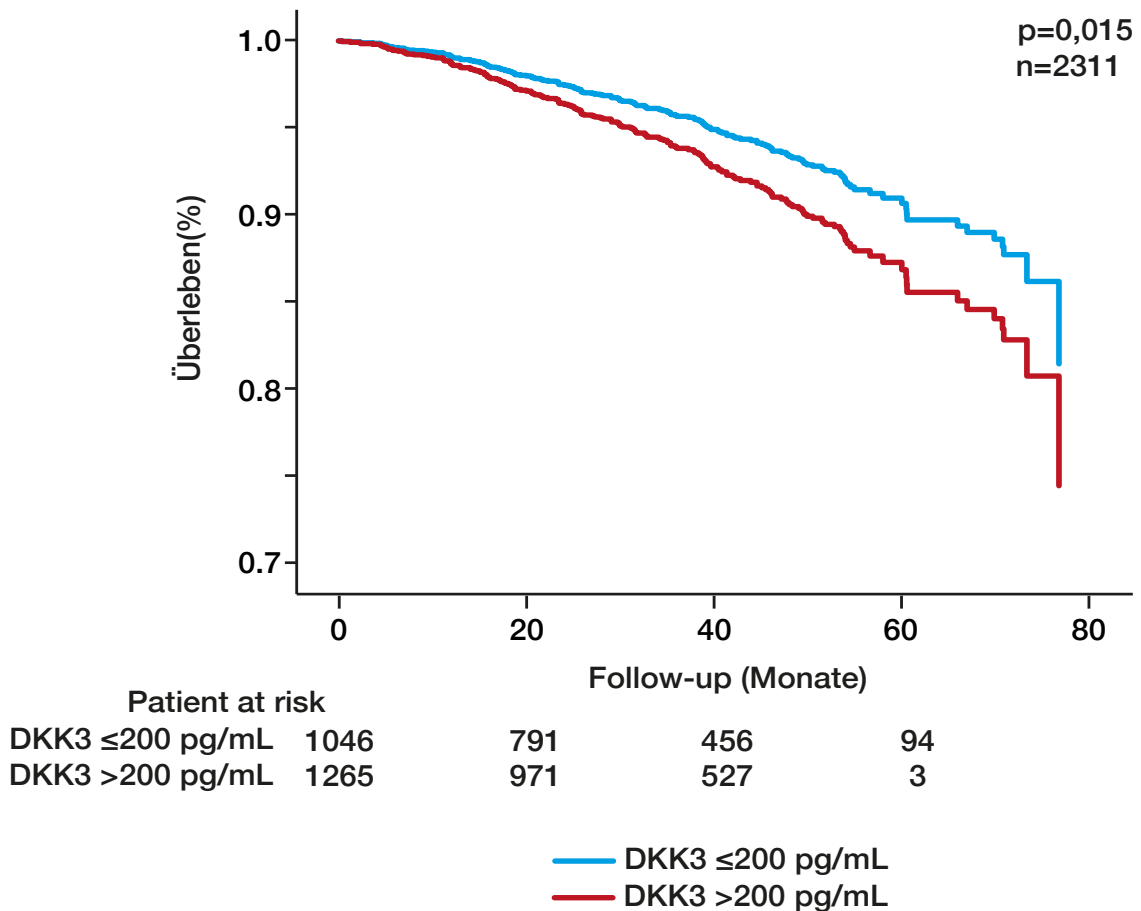


Abbildung 35: Kaplan-Meier Kurve für das prozentuale Überleben anhand der initialen DKK3-Konzentration. Adjustiert für Alter, Geschlecht, GOLD-Stadium, Raucherstatus, BMI, initiale Nierenfunktion (eGFR) und Proteinurie. Abbildung entnommen aus Schunk et al. *Kidney Int* 2021.

Auch dieser Zusammenhang bestand sowohl in der univariaten als auch in der multivariat adjustierten Cox-Regressionsanalyse (Tabelle 17).

Modell	Urin-DKK3 Kategorie (pg/mg Kreatinin)	HR	95% KI	P
Unadjustiert	≤200	Referenz		
	>200	1,47	1,08 - 2,01	0,015
Adjustiert	≤200	Referenz		
	>200	1,49	1,08 - 2,05	0,015

Tabelle 17: Cox Regressionsanalyse zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen der DKK3-Konzentration im Urin und der Mortalität.

Adjustiert für Alter, Geschlecht, GOLD-Stadium, Raucherstatus, BMI, initiale Nierenfunktion (eGFR) und Proteinurie. Abbildung entnommen aus Schunk et al. Kidney Int 2021.

9 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnten wir nachweisen, dass das Vorliegen einer Niereninsuffizienz den Verlauf einer COPD beeinflusst. Eine Nierenschädigung verstärkt die COPD-induzierte pulmonale Inflammation. Gleichsam ist die COPD mit einer stärkeren Nierenschädigung bei Niereninsuffizienz assoziiert. DKK3 wurde als zentraler Mediator dieser reziproken Organschädigung identifiziert. In einer klinischen Studie an primär nierengesunden Patienten mit stabiler COPD zeigte sich, dass erhöhte Urin DKK3-Konzentrationen zum Studieneinschluss mit einem erhöhten Risiko für den Abfall der eGFR als auch der FEV₁ assoziiert waren. Dieser Zusammenhang war unabhängig von der Proteinurie und der eGFR, also bisher etablierten klassischen Markern einer Nierenschädigung. Die Ergebnisse etablieren Urin-DKK3 als Biomarker für eine klinisch inapparente Nierenschädigung, dessen Bestimmung es möglicherweise erlaubt, gezielte nephroprotektive Therapiestrategien bei Patienten mit erhöhten Urin DKK3-Konzentrationen zu initiieren.

9.1.1 Mechanismen der Fibroseentstehung bei CKD

Fibrose ist definiert als übermäßiges Wachstum, Verfestigung oder Vernarbung von Geweben mit Ablagerung von Komponenten der extrazellulären Matrix. Sie gilt als Endstufe der chronischen Entzündung und ist das histomorphologische Korrelat der CKD. Hierbei ist die Ursache der CKD (Glomerulonephritis, diabetische Nephropathie usw.) nicht relevant. Man nimmt an, dass die Fibrose der Niere auf einer falschen, pathologisch verlängerten Wundheilung, die bei anhaltender Schädigung des Organs auftritt, basiert. [32][28]

Grundsätzlich differenziert man fibrotische Veränderungen der Nieren nach dem Ort ihres Auftretens im Organ. Zum einen kommt es zur Glomerulosklerose, welche noch weiter unterteilt werden kann in nodulär oder fokal-segmentale Glomerulosklerose, zum anderen unterscheidet man eine tubulo-interstitielle Fibrose und die Fibrose der renalen Blutgefäße [16].

Während extrazelluläre fibrotische Ablagerungen nach leichten Nierenschädigungen der Regeneration des Nierengewebes dienlich sind und resorbiert werden, ist die dauerhafte Ablagerung im Interstitium verbunden mit Tubulusatrophie und Schädigung der Organarchitektur, begleitet von konsekutiver Blutflussreduktion. Letztendlich zerstört die Fibrose so die Architektur und Funktion der Niere und führt schließlich zum Nierenversagen (ESRD). Es sind insgesamt vier Zellarten und vier Phasen primär an der Entstehung und Progression der Fibrose beteiligt. Hierbei handelt es sich um Epithel- und Endothelzellen als auch Immunzellen und (Myo)Fibroblasten. Die vier Phasen gliedern sich in eine zelluläre Aktivierungs- und Verletzungsphase, eine fibrotische Aktivierungsphase, die fibrotische Phase und letztlich die Zerstörungsphase oder Progression. Schlüsselmediator der Organfibrose ist der (Myo)Fibroblast. Der (Myo)Fibroblast kann verschiedenen Zelllinien entspringen; eine

spezifische Zuordnung zu einer Zellreihe ist nicht möglich. So kann er durch direkte Differenzierung aus mesenchymalen Stammzellen aber auch als Differenzierung von Fibroblasten-ähnlichen Zellen aus dem Knochenmark oder aus Perizyten entstehen. Aktuelle Studien jedoch legen nahe, dass die wahrscheinlichsten Quellen der Myofibroblasten bei CKD ortsständige Stromazellen sind. [56] [68] [16][6][13][58]

Die Aktivierung der Myofibroblasten ist auf verschiedenen Wegen möglich. Parakrine als auch autokrine Regulation durch Entzündungszellen wie Makrophagen oder durch Pathogene bzw. PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) sind beschrieben. Eine Aktivierung kann auch über Entzündungsmediatoren, wie Interleukine (IL-13, IL-21), TGF- β und PDGF (Platelet derived growth factor) 6-8, Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) oder auch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) erfolgen [11][12][36][75][128][62][106].

Eine besondere Rolle in der Entstehung der Fibrose wird hierbei TGF- β zugesprochen [49][14]. Die aktivierten Fibroblasten transformieren schließlich zu α -SMA exprimierenden Myofibroblasten, welche sogenannte Stressfasern bilden. Diese Stressfasern verbinden den Myofibroblasten mit der extrazellulären Matrix (EZM) und bei Kontraktion der Zelle wird über mechanischen Zug eine Reorganisation der EZM als auch die Wundadaptation bewirkt. Hier kann eine chronische Entzündungsreaktion zu einer Anhäufung von Komponenten der EZM führen, unter anderem Kollagen. Kollagen I ist hierbei das Protein, welches am häufigsten in der EZM anzutreffen ist, aber auch die Kollagene III, IV, V, VII, XV als auch Fibronectin sind an der Entstehung der Fibrose beteiligt. Fibronectin lagert sich als erstes Protein in der EZM ab, aktiviert Integrine und lockt Fibroblasten chemotaktisch an [39] [29].

Eine wichtige Rolle bei der Fibrose der Niere spielen tubulo-epitheliale Zellen (TECs). Sie reagieren sensibel auf Schädigungen und sind beteiligt in Entstehung und Progression der Fibrose. Wiederholte Schädigungen führen zu einer Hochregulation Zyklin-abhängiger Kinase-(CDK) Inhibitoren, welche einen Zellzyklusarrest hervorrufen. Dies wiederum mündet in einer fortschreitenden Zellseneszenz, was sich auszeichnet durch eine prolongierte Sekretion proinflammatorischer und profibrotischer Agenzien, wie z.B. TGF- β und verschiedener anderer Zytokine.[47]

Über diese verschiedenen Mediatoren kommunizieren sie mit anderen Zellen. TECs sind ebenfalls Quelle vieler Wnt-Proteine in der Niere. Somit sind sie ebenfalls über den Wnt/ β -Catenin Signalweg an der Entstehung der Nierenfibrose beteiligt, da die Aktivierung von Fibroblasten durch Wnt-Liganden möglich ist [131].

9.1.2 Die Rolle des Wnt/ β -Catenin Signalwegs bei der Entstehung einer Nierenfibrose

TECs betreiben epithelial-mesenchymalen Crosstalk mit ortsständigen Fibroblasten und sind in der Lage, Fibroblasten mittels Wnt-Liganden parakrin oder autokrin zu aktivieren und damit die Differenzierung zu Myofibroblasten anzustoßen. Wie oben beschrieben, sind Myofibroblasten durch Sekretion von α -SMA und Fibronectin in der Lage, eine Fibroseentstehung einzuleiten. Eine Studie von *Zhou et al.* beschreibt diesen Zusammenhang. Hierbei wurden zwei verschiedene Wntless (Wls) Knock-out Mausmodelle etabliert. Wntless ist ein Chaperon, welches eine essentielle Rolle im zellulären Transport und der Sekretion von Wnt-Proteinen spielt. Bei der einen Mauspopulation wurde dieses Protein in den TECs ausgeschaltet, bei der anderen in den interstitiellen Fibroblasten selbst. Beiden Mauspopulationen wurden Nierenschäden mittels UO oder IRI zugefügt und die dadurch entstandenen Nierenfibrosen miteinander verglichen. Interessanterweise konnte man beobachten, dass nur Tiere, bei denen Wntless in den TECs ausgeschaltet wurde, eine signifikant geringere Ausprägung der Fibrose aufwiesen. Die Tiere, welche Wntless-defiziente Fibroblasten hatten, zeigten kaum Veränderungen im Grad der Fibrose. Dies lässt nicht nur darauf schließen, dass Wnt-Liganden, welche von TECs sezerniert werden, eine tragende Rolle in der Entstehung der Nierenfibrose spielen, sondern auch, dass ortsständige renale Fibroblasten Effektorzellen der von TECs sezernierten Wnt-Liganden sind. TECs scheinen als Reaktion auf eine Schädigung einen Wechsel ihres Phänotyps hin zu einer sekretorischen Variante aufzuweisen, welche vermehrt profibrotische Agenzien exprimieren und auch sezernieren [131].

Eine Studie von *DiRocco et al.* untersuchte den Einfluss der Interaktion des Wnt-Liganden Wnt4 mit dem Wnt/ β -Catenin Signalweg. Hier konnte festgestellt werden, dass die dauerhafte Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin Signalwegs in Perizyten und Fibroblasten auch ohne Schädigung der Niere zu einer Differenzierung von Myofibroblasten führt [26]. Erstaunlicherweise konnte kein Effekt einer TEC spezifischen β -Catenin-Depletion auf das Ausmaß der Nierenfibrose festgestellt werden [130]. Allerdings beobachtete man eine verringerte Apoptose- und eine erhöhte Regenerationsrate der TECs, begleitet von einer geringeren Inflammation des Gewebes nach einer Schädigung, wenn β -Catenin gezielt in Fibroblasten ausgeschaltet wurde [132].

Zudem begrenzt sich der epithelial-mesenchymale Crosstalk zwischen TECs und Fibroblasten nicht nur auf die Aktivierung von Fibroblasten mittels Wnt-Liganden, sondern es gibt auch Feedback Mechanismen der Fibroblasten, welche von β -Catenin abhängig zu sein scheinen [102][20].

Dieser Hypothese ist jedenfalls bei Erkrankungen der Haut und der dermalen Wundheilung nachgegangen worden [65][43][103][5].

Hier ist also erkennbar, dass der Wnt/ β -Catenin Signalweg eine essentielle Rolle in der Genese der Fibrose spielt. Besonders hervorzuheben sind in diesem Zusammenhang die Interaktionen mit TECs und Fibroblasten.

Als Auswirkung einer Nierenschädigung wandern auch Makrophagen in das Nierengewebe ein. Sie haben hier mehrere Funktionen: M1-Makrophagen kontrollieren die proinflammatorische Immunantwort auf bakterielle, virale oder auch kanzerogene Reize, während hingegen M2-Makrophagen versuchen, eine überschießende Inflammation zu kontrollieren. Weiterhin sind sie bei der Wundheilung und auch bei der Fibroseentstehung beteiligt. Auch Makrophagen sind über verschiedene Wege in der Lage, sich zu Myofibroblasten zu differenzieren. Hierbei handelt es sich um M2-Makrophagen, welche auch eine Rolle in der Ausbildung einer Fibrose spielen [107].

Die Akkumulation von Makrophagen durch Proliferation oder Infiltration aus dem Knochenmark in der geschädigten Niere ist assoziiert mit einer stärkeren Progression der Fibrose bei CKD [92] [18]. Bei der CKD sind es vor allem die M2-Makrophagen, welche vermehrt in geschädigten Nieren vorkommen und dort als eine der Hauptquellen für TGF- β die Fibrose vorantreiben [51] [52]. Makrophagen werden also sowohl für die Immunantwort als auch für die Wundheilung und Gewebemöostase gebraucht. *Lin et al.* konnten zeigen, dass Makrophagen den Wnt-Liganden Wnt7b nicht nur als Reaktion auf eine Schädigung selbst exprimieren, sondern auch im Rahmen von Reparaturmechanismen durch ihn selbst stimuliert werden können [64].

Eine andere Studie konnte zeigen, dass der Wnt-Ligand Wnt3a die TGF- β 1 oder IL-4 induzierte Polarisation der Makrophagen zum Phänotyp M2 fördert [34]. Gleichzeitig können TECs während einer bestehenden Fibrose Wnt-Liganden exprimieren, welche wiederum zu einer proinflammatorischen Aktivierung von Makrophagen führen [69].

Auch M1-Makrophagen können über die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- α und IL-1 β , an der Entstehung einer renalen Fibrose beteiligt sein [129]. Somit besteht hier auch ein indirekter Zusammenhang zwischen der Fibrogenese der Nieren und der Aktivität vom Wnt/ β -Catenin Signalweg über die Aktivierung von Makrophagen.

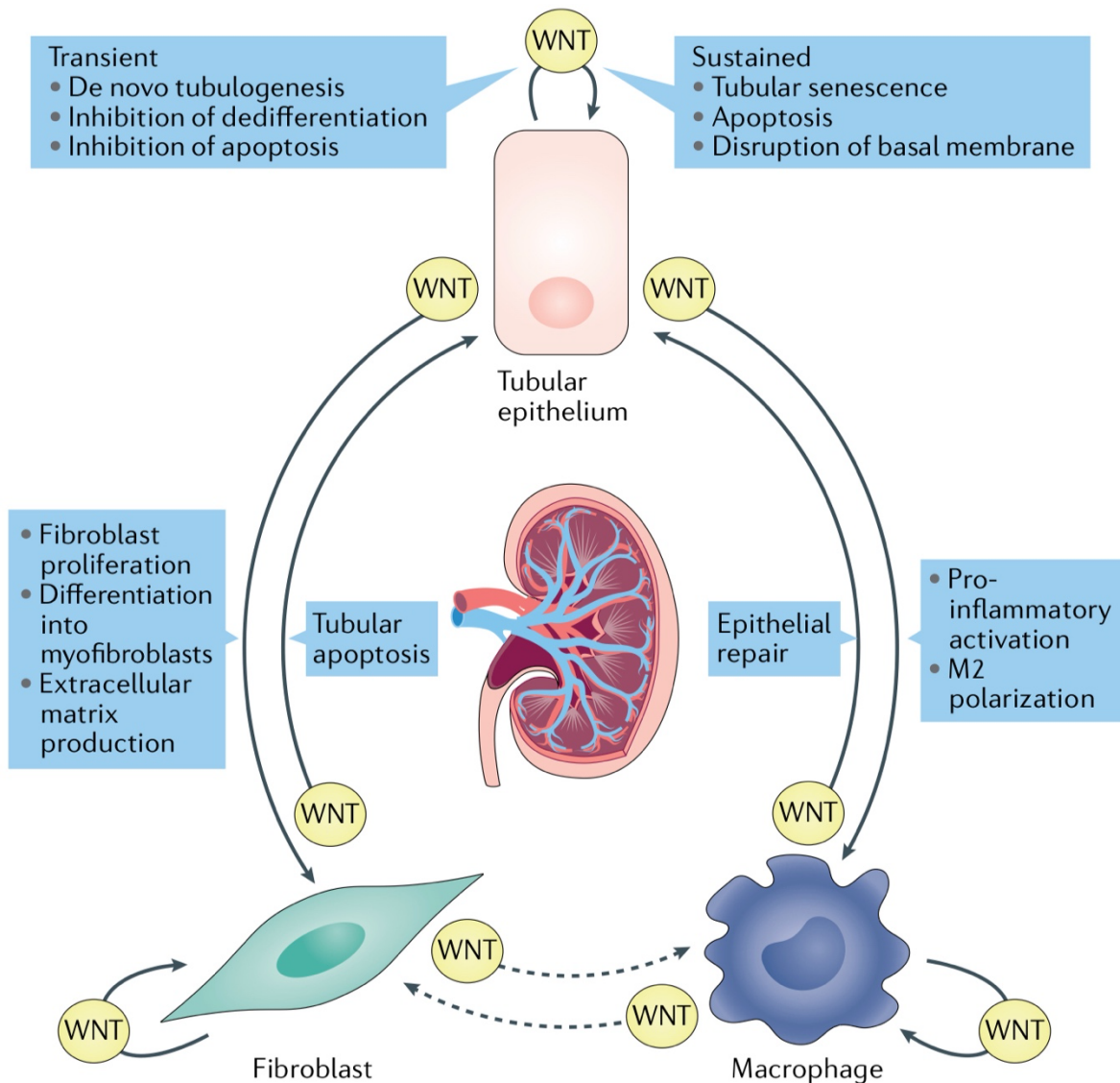


Abbildung 36: Darstellung der unterschiedlichen Einflüsse des Wnt/β-Catenin Signalwegs auf die Mechanismen der Entstehung einer Nierenfibrose. Entnommen aus Schunk SJ, Floege J, Fliser D, Speer T (2020) WNT-β-catenin signalling — a versatile player in kidney injury and repair. Nat Rev Nephrol [99].

Die Wirkung des Wnt/β-Catenin Signalwegs scheint interessanterweise von der Dauer der Aktivierung abzuhängen. Man kann zwischen der dauerhaften und der transienten Aktivierung unterscheiden. Hierbei nimmt der zeitliche Verlauf einen großen Einfluss auf den Übergang zwischen Reparaturmechanismen und Fibroseentstehung. Abbildung 36 und Abbildung 37 zeigen diesen Zusammenhang.

Die *in vitro* transiente kanonische Aktivierung des Wnt/β-Catenin Signalwegs in TECs mittels Wnt6 führte zu einer *de novo* Synthese und Regeneration von Tubuluszellen. Außerdem kann die transiente Aktivierung mit Wnt6 eine TGF-β induzierte epitheliale Dedifferenzierung verhindern. [7]

Nlandu-Khodo et al. zeigten, dass die *in vitro* Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalwegs in proximalen Tubuluszellen durch eine Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor FoxO3 und die damit verbundene verstärkte Aktivierung der Cystathion γ -Lyase zu einer Reduktion der Apoptose führte [85].

Im Gegensatz dazu hat die dauerhafte Aktivierung von TECs durch Wnt9A in einer Studie von *Luo et al.* die zellulären Seneszens zur Folge, indem es die Expression der Seneszenz-induzierenden Proteine p16, p19, p21 und p53 hochreguliert [71]. *Li et al.* beobachteten bei dauerhafter Aktivierung des Signalwegs eine Akkumulation der Proteinase MMP2 in TECs, was zur Zerstörung der Basalmembran führte [63]. Abbildung 37 visualisiert den Einfluss von DKK3 via Wnt/ β -Catenin auf die Nieren und illustriert die zeitliche Komponente der Wnt/ β -Catenin Aktivierung. Wie im Ergebnisteil beschrieben, scheinen erhöhte Konzentrationen von DKK3 im Urin auf eine dauerhafte Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalwegs in TECs hinzuweisen. Dieser Zusammenhang deutet darauf hin, dass höhere DKK3-Konzentrationen im Urin als Marker für eine Nierenschädigung gelten könnten und somit einen prädiktiven Wert haben.

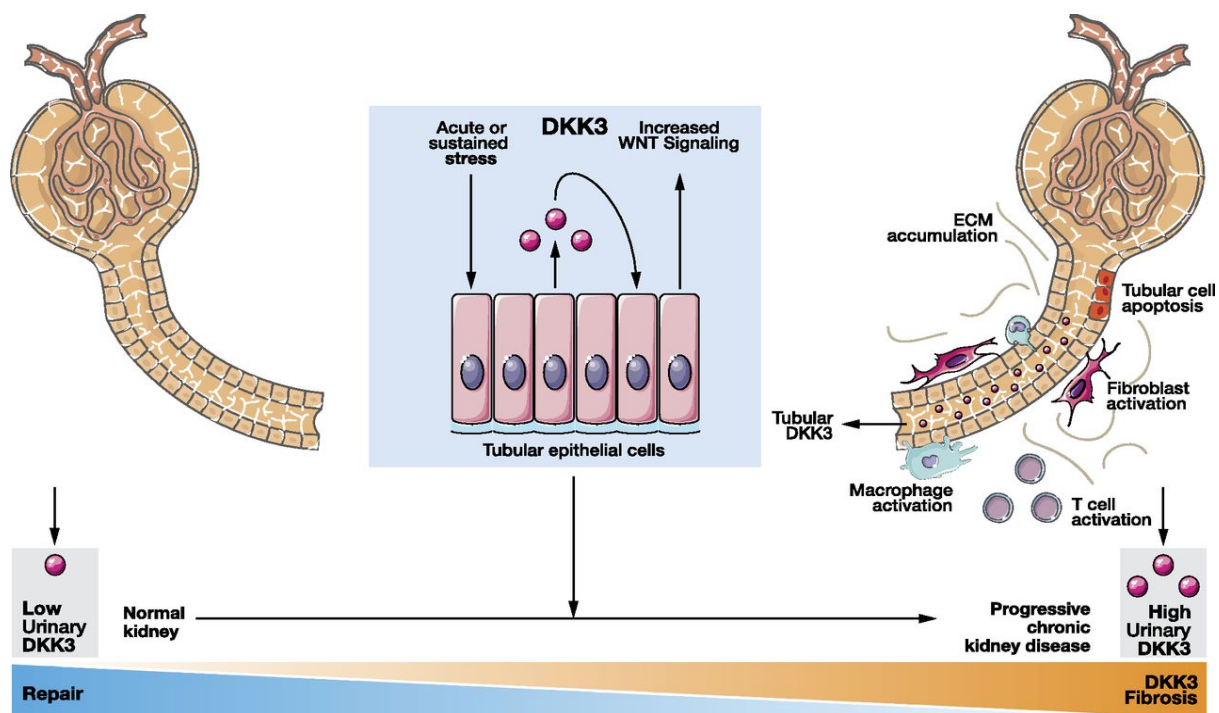


Abbildung 37: Effekte von DKK3 als Stressmediator auf Entstehung und Progression der Nierenfibrose. Entnommen aus: Dickkopf 3—a novel biomarker of the 'kidney injury continuum' *Nephrology Dialysis Transplantation*, Volume 36, Issue 5, May 2021, Pages 761–767 [98].

9.1.3 Rolle von DKK3 im Wnt/ β -Catenin Signalweg

Die meisten Studien zu DKK3 und dessen Interaktion mit dem Wnt/ β -Catenin Signalweg beschäftigen sich mit der Tumorgenese [114][124][123][61]. Generell entsteht der Eindruck, dass DKK3, abhängig vom Kontext, den Signalweg sowohl als Aktivator als auch als Inhibitor beeinflussen kann. Die Effekte von DKK3 auf den Signalweg in Bezug auf Nierenerkrankungen sind bislang kaum untersucht.

DKK3 ist ein von renalen Tubulusepithelzellen sezerniertes Stressprotein, das relevanten Einfluss auf die Entstehung und Progredienz chronisch-tubulointerstitieller Erkrankungen hat. Die Rolle von DKK3 in der Aktivierung oder Inhibierung des Wnt- β -Catenin Signalwegs und damit der Einfluss auf Entstehung und Entwicklung von Tubulusatrophie und Fibrose sowie die Regulation der adaptiven Immunantwort scheint abhängig vom renalen Mikromilieu und dem Kontext als auch der Dauer der Sekretion zu sein [113] [32] [83] [126].

Federico et al. konnten nachweisen, dass DKK3 als Agonist des Wnt- β -Catenin Signalwegs bei CKD zu wirken ist. Die gezielte Inhibition von Dkk3 durch Knock-out oder Antikörperapplikation in unterschiedlichen Nierschädigungsmodellen führte zu einer signifikanten Reduktion der Fibrose als auch interessanterweise einer erhöhten Zahl CD3⁺-T-Zellen, die in der geschädigten Niere akkumulierten. Dadurch kann DKK3 eine immunsuppressive und gleichzeitige profibrotische Wirkung über Aktivierung des Wnt- β -Catenin Signalwegs zugesprochen werden. Zur weiteren Differenzierung des Einflusses von DKK3 auf den Wnt-Signalweg wurden Reporter-mäuse benutzt, welche β -Catenin Aktivität durch nukleäre GFP-Expression in der regulatorischen Sequenz des Transkriptionsfaktors T-Cell-Factor/Lymphoid-enhancer-factor (TCF/LEF) aufweisen. Interessanterweise konnte sieben Tage nach UUO eine starke eGFP Fluoreszenz in TECs der Reportermäuse beobachtet werden. Um die genaue Interaktion von DKK3 im Signalweg nachvollziehen zu können, wurde ein Proximity-Ligation-Assay durchgeführt. Hierbei wurde eine direkte Interaktion des Frizzled-Rezeptors (FZD) mit dem zyttoplasmatischen Dishevelled (dvl) Protein, welche bei Aktivierung durch Wnt-Liganden vorkommt, beobachtet. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass der siRNA-vermittelte Dkk3 Knockdown in TEC-HK2 Zellen zu einer signifikant verminderten Interaktion der Proteine FZD/DVL führte. Außerdem wurde untersucht, inwieweit die angenommene Wirkung von Dkk3 Knock-out einen Effekt auf Zytokinexpression von TECs zeigt. Hierbei wurden HK2 (human embryonic kidney cells) Zellen mit Kontroll- und Dkk3-siRNA behandelt und verschiedenen Stressinduktoren (IFN- γ , H₂O₂) ausgesetzt. Im Überstand der Zellen konnten erhöhte Konzentrationen von IL-6 und IL-8 festgestellt werden, die mit Dkk3-siRNA behandelt wurden. Dies kann als starker Hinweis auf die Funktion von DKK3 hinsichtlich der Expression von Zytokinen und Immunmodulatoren in geschädigten TECs gewertet werden. Letztendlich ist der genaue Ablauf der intrazellulären Signalkaskade

durch DKK3 noch nicht vollständig verstanden und weitere Studien sind notwendig, um die genaue Interaktion von DKK3 mit dem Wnt/ β -Catenin Pathway zu ergründen. [32] [41]

9.1.4 Rolle von DKK3 bei der Nierenschädigung

Studien unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass DKK3 in Bezug auf Nierenschädigungen einem tubuloepithelialen Stressmarker gleichkommt [33][96][126].

Es wird, egal ob eine akute oder eine chronische Schädigung der Nieren vorliegt, von TECs exprimiert und in den Urin sezerniert, wo es quantifiziert werden kann. Wie bereits erwähnt, wurde DKK3 als wichtiger Verursacher einer Nierenfibrose und Tubulusatrophie in verschiedenen Mausmodellen identifiziert. In diesen Studien wurde beobachtet, dass die genetische Ablation oder auch die Blockade des Proteins mittels Antikörper die Fibrose der Niere signifikant reduziert. Gleichzeitig zeigte sich, dass bei Tieren, die einer *Dkk3*-Defizienz oder Antikörpertherapie unterlagen, eine deutliche, antifibrotische T-Zell Immunreaktion stattfand. Des Weiteren wurde festgestellt, dass das Fehlen von DKK3 eine verringerte kanonische Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalwegs zur Folge hatte. Somit kann man DKK3 nicht nur eine fibrotische, sondern auch eine immunsuppressive Wirkung über den Wnt/ β -Catenin Signalweg zusprechen. [32][126]

DKK3 wird in der Niere gesunder Personen nicht exprimiert, während die renale Expression bei unterschiedlicher Nierenschädigung signifikant zunimmt. Beispielsweise vermutet man eine Beteiligung von DKK3 in der Progression der ADPKD. Es wird angenommen, dass DKK3 über den Wnt/ β -Catenin Signalweg das Wachstum der Zysten mitbestimmen könnte. Ferner scheinen verschiedene *Dkk3* SNPs den Verlauf und Schweregrad der ADPKD mitzubestimmen, da diese Einfluss auf Mutationen im PKD1-Gen haben könnten. [66]

Zewinger et al. konnten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der Urin-DKK3 Konzentration und dem Grad der tubulointerstitiellen Fibrose bei Patienten nach Nierenbiopsie beobachten. In dieser Studie zeigte sich auch, dass bei Patienten mit CKD hohe Konzentrationen von DKK3 im Urin mit einer schnelleren Progression der CKD assoziiert waren. Auch in der STOP IgAN Studie konnten hohe Urin-DKK3 Konzentrationen mit einem schnelleren Verlust der eGFR in Verbindung gebracht werden. DKK3 kann, unabhängig von der Art der Nierenerkrankung, Patienten, die eine Verschlechterung der Nierenfunktion zu erwarten haben, identifizieren. [126]

In einer weiteren Studie der AG *Schunk/Speer* wurde das Risiko für das Auftreten von akuten Nierenversagen bei Patienten mit bevorstehenden kardiochirurgischen Eingriffen anhand der präoperativ gemessenen Urin DKK3-Konzentration eruiert. Bei Patienten mit erhöhten präoperativen Konzentrationen von DKK3 trat ein AKI häufiger auf als bei Patienten, die keine initial höheren DKK3 Werte im Urin aufwiesen. Auch im Langzeit Follow-up von 820 Tagen

zeigte sich, dass die Patienten mit höheren Ausgangskonzentrationen von DKK3 im Urin ein erhöhtes Risiko für die Transition des AKI in eine CKD aufweisen [96].

9.1.5 Rolle des Wnt/ β -Catenin Signalwegs bei COPD

Der Wnt/ β -Catenin Signalweg spielt bereits eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Lungen. Goss *et. al* konnten zeigen, dass Wnt2/2b defiziente Mausembryos eine komplette Lungenagenese aufwiesen, was die Relevanz des Signalwegs in der Embryogenese nochmals unterstreicht. Generell scheint der Wnt/ β -Catenin Signalweg auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung chronischer Lungenerkrankungen, wie Lungenfibrose [17] und COPD [59], zu besitzen.

Es gibt Hinweise darauf, dass die Aktivierung und/oder Inhibierung des Wnt/ β -Catenin Signalweges in den Lungen bei der Zerstörung der Alveolen und damit bei der COPD eine wichtige Rolle spielt [101]. Bereits bekannt ist die Beziehung zwischen der kanonischen Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalwegs und der Entstehung der idiopathischen Lungenfibrose (IPF) [101] [22] [55].

Dahingegen scheint es bei der COPD genau entgegengesetzt zu sein, weil dort die Zerstörung des Lungenparenchyms und die damit verbundene Entwicklung von Emphysemen mit einer anscheinend geringeren Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalwegs assoziiert ist.[54]

In einer Studie von *Kneidinger et al.* konnten keine signifikanten Unterschiede in der mRNA Expression der Wnt-Liganden Wnt2, 3a und 7b im Lungengewebe von COPD (GOLD IV)-Patienten und Lungenspendern festgestellt werden. Einzig Wnt10b war bei COPD-Patienten stärker exprimiert. Bei der Analyse von Wnt-(Ko)Rezeptoren fiel auf, dass bei den am häufigsten vorkommenden Rezeptoren FZD 1 und 4 und dem Korezeptor LRP6 kaum quantitative Unterschiede in den Geweben zu sehen waren. Auch bei intrazellulären Bestandteilen des Wnt/ β -Catenin Signalwegs, wie GSK-3 β und β -Catenin, waren keine Unterschiede zwischen den COPD-Lungen und den Spenderlungen zu sehen. Zur weiteren Beurteilung der Aktivität des Signalwegs wurden Phosphorylierungsanalysen via Western Blot von LRP6 [9] und GSK-3 β [37] durchgeführt und wiesen darauf hin, dass es keinen Unterschied in der Aktivität zwischen den COPD-Lungen und den Spenderlungen gab. Immunfluoreszenzfärbungen der Gewebe zeigten, dass COPD-Lungen kaum β -Catenin exprimierten, wohingegen die Positivkontrollen aus fibrotischen Lungengewebe mit signifikant vermehrter β -Catenin Expression aufwarten konnten, was die Assoziation zwischen hochregulierten Wnt/ β -Catenin Signaling und der Idiopathischen pulmonalen Fibrose nochmals bekräftigt. Interessanterweise war die Lokalisation des β -Catenins in Zellen von COPD-Lungen am häufigsten basolateral, was darauf hinweist, dass der Signalweg inaktiv ist. Tatsächlich zeigte der Vergleich in den Spenderlungen eine vermehrt nukleäre Lokalisation von β -Catenin, welches eine auf erhöhte Aktivität hindeutet. Zur weiteren Abklärung und

Aufklärung der Wirkung des Wnt/ β -Catenin Signalwegs in der Entwicklung emphysematischer Lungen wurden zwei Mausmodelle (CS und Elastase) zur Induktion einer Lungenschädigung etabliert. Hier wurde beobachtet, dass es in beiden Lungenschädigungsmodellen schon nach einem Tag zu einer verringerten Expression sowohl der oben beschriebenen Liganden als auch der (Ko)Rezeptoren kam. Die Expression von Zielgenen des Signalwegs, wie der Fibroblasten growth factor (FGFR) oder Axin1 und 2, waren bei den emphysematischen Mäusen ebenfalls herunterreguliert. Begleitend konnte man eine Zunahme des Lungenemphysems und eine Abnahme der Lungenfunktion beobachten. Letztlich konnte im induzierten Lungenschädigungsmodell durch Verwendung des Wnt/ β -Catenin Agonisten LiCl festgestellt werden, dass nicht nur eine Verbesserung der Lungenfunktionsparameter auftrat, sondern auch ein Rückgang der emphysembedingten distalen Luftschlüsse. [54]

In einer weiteren Studie von *Hoek et al.* bezüglich des Einflusses des Wnt/ β -Catenin Signalings auf die Entstehung der COPD wird vermutet, dass ein Wechsel von kanonischer zu nicht-kanonischer Aktivierung des Signalwegs in den zellulären Crosstalk eingreift und dadurch die Regenerationsfähigkeit der Alveolarzellen beeinträchtigt, was zur Emphysembildung führt. Hierbei wurde die nicht-kanonische Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalwegs durch den Wnt-Liganden Wnt5a induziert und die Auswirkungen auf das Lungengewebe im Mausmodell beobachtet. Wnt5a scheint hierbei in der Entstehung der COPD insoweit relevant zu sein, als dass es die kanonische Aktivierung des Signalwegs, welche Reparaturmechanismen in den Alveolarepithelzellen als auch die Differenzierung von Alveolarzellen Typ II zu Typ I [35] anstößt, minimiert und so zur Emphysementstehung in den distalen Lungenabschnitten beiträgt. Dementsprechend führte die vermehrte Expression von Wnt5a zu einem Fortschreiten des Emphysems und die verminderte Sekretion zu einer Verbesserung. [4]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Einfluss des Wnt/ β -Catenin auf die Entwicklung der Lungen als auch bei der Entwicklung von chronischen Lungenerkrankungen einen großen Stellenwert hat. Interessanterweise gibt es auch hier Unterschiede in der Art der Aktivierung des Signalwegs. So hat eine übermäßige Inhibition (nicht-kanonische Aktivierung) eine verminderte Regenerationsfähigkeit und Emphysembildung zur Folge, wohingegen die kanonische Aktivierung, ähnlich wie bei der Nierenfibrose, zu überschießenden Reparaturmechanismen und der Entstehung einer Fibrose führt. [54][4][22][101]

9.1.6 Zusammenhang zwischen COPD und CKD

Die COPD und die CKD sind sich in ihrer pathophysiologischen Beziehung sehr ähnlich und weisen auch eine große Anzahl gemeinsamer Komorbiditäten auf. Diabetes Mellitus und arterielle Hypertonie sind häufige Ursachen einer CKD [79] und werden ebenfalls bei vielen

Patienten mit COPD [27] diagnostiziert. Beide Erkrankungen haben unabhängig voneinander Einfluss auf den Gefäßstatus und die Ausbildung (kardio)vaskulärer Folgeerkrankungen [21]. Erkrankungen des Gefäßsystems, wie KHK und pAVK, sind hierbei häufig zu finden. Weiterhin sind sowohl COPD als auch CKD mit der Ausbildung eines proinflammatorischen Mikromilieus assoziiert, welches die Progression beider Krankheiten weiter verstärkt [127][125].

Eine bereits etwas ältere Studie aus dem Jahr 1992 beschreibt den Zusammenhang zwischen COPD und einer peripheren Ödembildung. Hierbei wurden neun Patienten mit COPD assoziierten Ödemen und 6 Patienten nach Erholung untersucht. Alle Patienten waren hypoxisch und hyperkapnisch. Es zeigte sich, dass bei normalem Herzzeitvolumen (HZV) und erhöhten rechtsatrialen als auch pulmonalarteriellen Drücken sowie erniedrigten Gesamtgefäßwiderständen eine signifikante Zunahme des Gesamtkörperwassers, des extrazellulären Volumens, des Plasmavolumens und des Blutvolumens vorlagen. Die renale Perfusion war signifikant erniedrigt, aber die eGFR noch normal oder nur mäßig reduziert. Die Konzentrationen von Norepinephrin, Renin, Vasopressin, ANP (atriales natriuretisches Peptid) als auch Cortisol waren allesamt signifikant erhöht. Nach Rekompensation normalisierten sich die rechtsatrialen und pulmonalarteriellen Drücke, der Gefäßwiderstand normalisierte sich und die Ödeme waren rückläufig. Hier zeigt sich ein erster Zusammenhang zwischen einer bestehenden COPD und der Nierenfunktion. [2]

Dabei stellt sich die Frage, ob die sekundäre Ausbildung eines pulmonalen Hypertonus Auswirkungen auf die Nierenfunktion hat. Die oben beschriebene Studie zeigte, dass die Patienten eine neurohumorale Aktivierung aufwiesen, welche konsekutiv durch Flüssigkeitsretention zu einem pulmonalen Hypertonus führte und damit ebenfalls für eine Verschlechterung der Nierenfunktion verantwortlich sein könnte.

Wie oben bereits beschrieben, reagieren die renalen TECs sehr sensibel auf eine Sauerstoffunterversorgung. Es spielt dabei keine Rolle, ob die Hypoxämie durch eine renale Minderperfusion oder durch ein generell vermindertes Sauerstoffangebot, wie es bei chronischer Hypoxie der Fall ist, bedingt ist. Ferner ist das Auftreten einer Hypoxie bei COPD assoziiert mit der vermehrten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine [105], welche ebenfalls im Verdacht stehen, bei der Entstehung vieler Krankheiten (Kachexie, Anämie) beteiligt zu sein [122] [108].

In einer Studie von *van Gestel et al.* wurde untersucht, inwieweit die COPD bei gefäßchirurgischen Patienten zur Ausbildung einer CKD beiträgt. Beobachtet wurden 3358 Patienten mit diagnostizierter COPD, die sich einem gefäßchirurgischen Eingriff im Zeitraum von 01/1990-12/2006 unterzogen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die COPD mit einem moderaten Risiko für das Auftreten einer CKD assoziiert war. Außerdem wurden moderate und schwere Fälle von COPD unabhängig voneinander mit einem höheren

Mortalitätsrisiko im Langzeit Follow-up bei Patienten mit pAVK und CKD in Verbindung gebracht. Die Autoren der Studien mutmaßen, dass die bereits bekannte systemische Inflammation bei COPD nicht nur Auswirkungen auf die Progression der Erkrankung selbst hat, sondern auch Einfluss auf das kardiovaskuläre System nimmt. Eine der Überlegungen bezieht sich auf eine Studie von *Iwamoto et al.*, wo ein Zusammenhang zwischen einer Atemwegsobstruktion (Atemflussreduktion) und einer zunehmenden Dicke der Intima der A. carotis bei Rauchern im Vergleich zu Kontrollrauchern ohne Atemwegsobstruktion und Nichtrauchern gefunden wurde [50].

Dadurch ergibt sich die Frage, ob die stärkere Expression proinflammatorischer Zytokine bei COPD, wie TNF- α , IL-6, IL8 und IL-1 β , auch bei der Schädigung von Blutgefäßen eine Rolle spielt. Dies könnte zu atherosklerotischen Veränderungen und damit auch zu einer renalen Minderperfusion und der Ausbildung einer CKD führen. [111]

Eine Akkumulation proinflammatorischer Zytokine ist ebenfalls bei der CKD beschrieben [125], sodass sich die Gegenfrage ergibt, ob die Inflammation bei COPD Patienten durch die COPD verstärkt wird. Diese Überlegung deckt sich mit den Ergebnissen dieser Dissertation, wo in den Tierexperimenten das gleichzeitige Auftreten von COPD und CKD mit einer stärkeren proinflammatorischen Reaktion einherging als dies bei isolierter Organschädigung der Fall war.

9.1.7 Therapeutische Ansatzpunkte durch Modulation des Wnt/ β -Catenin Signalwegs

Seit der Entdeckung der Wnt-Familie im Jahre 1982 durch *Nusse et al.* nimmt das Interesse der Forschung am Wnt/ β -Catenin Signalweg kontinuierlich zu. Die Wichtigkeit und das Ausmaß des Einflusses des Wnt/ β -Catenin Signalwegs auf die Entstehung und Progression von Erkrankungen ist groß und deswegen ist der Signalweg auch ein attraktives Ziel für eine medikamentöse Therapie. Die meisten aktuellen Therapieansätze zur Modulation des Signalwegs werden bei Krebserkrankungen erforscht [86], da sich auch die meisten Forschungen auf die Entstehung von Krebs im Zusammenhang mit dem Wnt-Signaling konzentrieren. Durch die beschriebenen vielfältigen Interaktionen des Signalwegs bei der Entstehung von Krankheiten sowie die unterschiedlichen Aktivitätsmuster bei verschiedenen Entitäten wäre es vermutlich nicht sinnvoll, eine generelle Inhibition/Aktivierung des Signalwegs anzustreben, da so auch potentiell positive Effekte durch das Wnt-Signaling verhindert werden würden. Es existiert eine Vielzahl von Molekülen, welche die Aktivität des Wnt/ β -Catenin Signalwegs beeinflussen können und es gibt zu Forschungszwecken mehrere Möglichkeiten einer zielgerichteten pharmakologischen Intervention [99].

Porcupine-Inhibitoren	LGK974, Wnt974, ETC-159
Wnt5a-Mimetika	Foxy5
Anti-FZD-Antikörper	OTSA101, OMP-18R5
sFZD Decoy Rezeptor	OMP54F28
DVL-Inhibitoren	3289-8625, PEN-N3, FJ), NSC668036
GSK3 β -Inhibitoren	Lithium, CT99021, BIO
Axin-Inhibitoren	SKL2000
C1-Inhibitoren	IC261, Pyrvinium
TCF-LEF-Inhibitoren	PRI-774, NC043, BC2, PNU-7465431, PFK115-584, CGP049090, PFK118-310, ICG-001
β -Catenin-Inhibitoren	COX-Inhibitoren
LRP5/6-Inhibitoren	Salinomycin, Niclosamid, Silibinin, Rottlerin
Anti-Sklerostin-Antikörper	Romosozumab

Tabelle 18: Medikamentöse Effektoren des Wnt/ β -Catenin Signalwegs.

Entnommen aus: Schunk SJ, Floege J, Fliser D, Speer T (2020) WNT- β -catenin signalling — a versatile player in kidney injury and repair. *Nat Rev Nephrol* [99].

Derzeit ist für den klinischen Gebrauch nur der Sklerostin-Antikörper Romosozumab zugelassen. Hierbei handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, welcher zur Therapie der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen eingesetzt wird. [24]

Die Vielfältigkeit der Wirkungen des Signalweges machen es insgesamt kompliziert, eine pharmakologische Therapie zu etablieren, allerdings sind die Möglichkeiten einer partiellen Beeinflussung des Signalwegs durch die Aktivierung oder Inhibition einzelner Signalmoleküle möglich und ein vielversprechender Ansatz. [99]

Hier laufen aktuell einige klinische Studien, deren Ergebnisse neue Erkenntnisse über die Modulation des Wnt/ β -Catenin Signalweges liefern werden.

9.1.8 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass ein pathophysiologischer Zusammenhang zwischen Entstehung und Progression von Lungen- und Nierenerkrankungen besteht. Durch die Etablierung des kombinierten Rauch-CKD Modells können die pathophysiologischen Einflüsse der Lunge auf die Niere und umgekehrt in weiteren Studien untersucht und aufgeklärt werden. Bei dieser reziproken Organschädigung scheint DKK3 eine wichtige Rolle zu spielen.

Die Identifikation von COPD Patienten, die gefährdet sind, eine Exazerbation ihrer COPD als auch eine Verschlechterung der Nierenfunktion zu erleiden, mittels DKK3 als prädiktiven Marker, ist möglicherweise ein erster Schritt, um eventuelle präventive Maßnahmen einzuleiten und eine Verschlechterung der Lungen- und/oder Nierenfunktion zu verhindern. Weiterhin sind mehr Studien notwendig, um die genauen Funktionen des Wnt/ β -Catenin Signalweges in Bezug auf die Entstehung von Fibrose der Lungen und Nieren zu untersuchen. In diesem Zusammenhang ist auch seine Modulation durch z.B. Proteine der Dickkopffamilie, auch im pharmakologischen Sinne, von großem Interesse.

10 Publikation

Stefan J. Schunk, Christoph Beisswenger, Felix Ritzmann, Christian Herr, Martina Wagner, Sarah Triem, **Gregor Hütter**, David Schmit, Stephen Zewinger, Tamim Sarakpi, Anja Honecker, Peer Mahadevan, Peter Boor, Stefan Wagenpfeil, Rudolf Jörres, Henrik Watz, Tobias Welte, Claus F. Vogelmeier, Hermann-Josef Gröne, Danilo Fliser, Thimoteus Speer, Robert Bals,

Measurement of urinary Dickkopf-3 uncovered silent progressive kidney injury in patients with chronic obstructive pulmonary disease,

Kidney International,

Volume 100, Issue 5,

2021,

Pages 1081-1091,

ISSN 0085-2538,

<https://doi.org/10.1016/j.kint.2021.06.029>. [100]

11 Danksagung

Zuletzt möchte ich mich bei all jenen bedanken, die es mir ermöglicht haben, diese Dissertation zu verfassen. Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Univ.-Prof. Dr. Dr. Thimoteus Speer für die großzügige und freundliche Bereitstellung dieses spannenden Themas. Ohne seine Hilfe, Unterstützung und Motivation wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Seine herausragende Betreuung ist der Hauptgrund für das gute Gelingen dieser Arbeit.

Ebenso möchte ich meinem Betreuer Dr. Stefan Schunk danken, der jederzeit ein offenes Ohr für meine Probleme hatte und mich bei der Anfertigung der Arbeit motiviert und unterstützt hat. Beiden zusammen möchte ich für die Hilfe bei der statistischen Beurteilung und die insgesamt hervorragende Betreuung während meiner Zeit im nephrologischen Labor danken.

Weiterhin gilt mein aufrichtiger Dank den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des nephrologischen Forschungslabors; Frau Ellen Becker, Frau Claudia Noll, Frau Martina Wagner, Frau Sarah Triem, Frau Caroline Abbosh und Herrn Andreas Hauck. Sie alle haben mir die Grundlagen der Laborarbeit vermittelt, mich jederzeit unterstützt und meine vielen Fragen beantwortet. Dafür bin ich ihnen allen sehr dankbar.

Auch möchte ich mich bedanken bei Felix Ritzmann und PD Dr. Christoph Beißwenger aus dem pulmologischen Forschungslabor für die Bereitstellung der Daten der Multiplex-Cytokin-Arrays Analyse und für die Anleitung zur Durchführung sowie der exzellenten Kooperation bei der gemeinsamen Durchführung der Tierexperimente. Auch danken möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. Robert Bals für die Möglichkeit zur Kooperation bei der Analyse der Daten aus COSYCONET.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie; meinen Eltern Antje und Klemens und meinem Bruder Thorsten, meinen Mitbewohnern Jan und Kevin und meinen Freunden bedanken, die mich alle immer unterstützt haben. In diesem Zusammenhang gilt ein besonderer Dank meiner Lebensgefährtin Laura, die mich jederzeit unterstützt hat.

12 Literaturverzeichnis

1. Agusti A, Calverley PMA, Celli B, Coxson HO, Edwards LD, Lomas DA, MacNee W, Miller BE, Rennard S, Silverman EK, Tal-Singer R, Wouters E, Yates JC, Vestbo J (2010) Characterisation of COPD heterogeneity in the ECLIPSE cohort. *Respir Res* 11:122
2. Anand IS, Chandrashekhar Y, Ferrari R, Sarma R, Guleria R, Jindal SK, Wahi PL, Poole-Wilson PA, Harris P (1992) Pathogenesis of congestive state in chronic obstructive pulmonary disease: Studies of body water and sodium, renal function, hemodynamics, and plasma hormones during edema and after recovery. *Circulation* 86:12–21
3. Astor BC, Matsushita K, Gansevoort RT, Van Der Velde M, Woodward M, Levey AS, Jong PED, Coresh J, El-Nahas M, Eckardt KU, Kasiske BL, Wright J, Appel L, Greene T, Levin A, Djurdjev O, Wheeler DC, Landray MJ, Townend JN, Emberson J, Clark LE, MacLeod A, Marks A, Ali T, Fluck N, Prescott G, Smith DH, Weinstein JR, Johnson ES, Thorp ML, Wetzels JF, Blankestijn PJ, Van Zuilen AD, Menon V, Sarnak M, Beck G, Kronenberg F, Kollerits B, Froissart M, Stengel B, Metzger M, Remuzzi G, Ruggenenti P, Perna A, Heerspink HJL, Brenner B, De Zeeuw D, Rossing P, Parving HH, Auguste P, Veldhuis K, Wang Y, Camarata L, Thomas B, Manley T (2011) Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with mortality and end-stage renal disease. A collaborative meta-analysis of kidney disease population cohorts. *Kidney Int* 79:1331–1340
4. Baarsma HA, Skronska-Wasek W, Mutze K, Ciolek F, Wagner DE, John-Schuster G, Heinzelmann K, Günther A, Bracke KR, Dagouassat M, Boczkowski J, Brusselle GG, Smits R, Eickelberg O, Yildirim A, Königshoff M (2017) Noncanonical WNT-5A signaling impairs endogenous lung repair in COPD. *J Exp Med* 214:143–163
5. Bai J, Liu Z, Xu Z, Ke F, Zhang L, Zhu H, Lou F, Wang H, Fei Y, Shi Y-L, Wang H (2015) Epigenetic Downregulation of SFRP4 Contributes to Epidermal Hyperplasia in Psoriasis. *J Immunol* 194:4185–4198
6. Barnes JL, Glass WF (2011) Renal interstitial fibrosis: a critical evaluation of the origin of myofibroblasts. *Contrib Nephrol* 169:73–93
7. Beaton H, Andrews D, Parsons M, Murphy M, Gaffney A, Kavanagh D, McKay GJ, Maxwell AP, Taylor CT, Cummins EP, Godson C, Higgins DF, Murphy P, Crean J (2016) Wnt6 regulates epithelial cell differentiation and is dysregulated in renal fibrosis. *Am J Physiol Physiol* 311:F35–F45
8. Bikbov B, Purcell CA, Levey AS, Smith M, Abdoli A, Abebe M, Adebayo OM, Afarideh

M, Agarwal SK, Agudelo-Botero M, Ahmadian E, Al-Aly Z, Alipour V, Almasi-Hashiani A, Al-Raddadi RM, Alvis-Guzman N, Amini S, Andrei T, Andrei CL, Anduaalem Z, Anjomshoa M, Arabloo J, Ashagre AF, Asmelash D, Ataro Z, Atout MM d. W, Ayanore MA, Badawi A, Bakhtiari A, Ballew SH, Balouchi A, Banach M, Barquera S, Basu S, Bayih MT, Bedi N, Bello AK, Bensenor IM, Bijani A, Bolor A, Borzi AM, Cámara LA, Carrero JJ, Carvalho F, Castro F, Catalá-López F, Chang AR, Chin KL, Chung SC, Cirillo M, Cousin E, Dandona L, Dandona R, Daryani A, Das Gupta R, Demeke FM, Demoz GT, Desta DM, Do HP, Duncan BB, Eftekhari A, Esteghamati A, Fatima SS, Fernandes JC, Fernandes E, Fischer F, Freitas M, Gad MM, Gebremeskel GG, Gebresillassie BM, Geta B, Ghafourifard M, Ghajar A, Ghith N, Gill PS, Ginawi IA, Gupta R, Hafezi-Nejad N, Haj-Mirzaian AA, Haj-Mirzaian AA, Hariyani N, Hasan M, Hasankhani M, Hasanzadeh A, Hassen HY, Hay SI, Heidari B, Herteliu C, Hoang CL, Hosseini M, Hostiuc M, Irvani SSN, Islam SMS, Jafari Balalami N, James SL, Jassal SK, Jha V, Jonas JB, Joukar F, Jozwiak JJ, Kabir A, Kahsay A, Kasaeian A, Kassa TD, Kassaye HG, Khader YS, Khalilov R, Khan EA, Khan MS, Khang YH, Kisa A, Kovesdy CP, Kuate Defo B, Kumar GA, Larsson AO, Lim LL, Lopez AD, Lotufo PA, Majeed A, Malekzadeh R, März W, Masaka A, Meheretu HAA, Miazgowski T, Mirica A, Mirrakhimov EM, Mithra P, Moazen B, Mohammad DK, Mohammadpourhodki R, Mohammed S, Mokdad AH, Morales L, Moreno Velasquez I, Mousavi SM, Mukhopadhyay S, Nachega JB, Nadkarni GN, Nansseu JR, Natarajan G, Nazari J, Neal B, Negoi RI, Nguyen CT, Nikbakhsh R, Noubiap JJ, Nowak C, Olagunju AT, Ortiz A, Owolabi MO, Palladino R, Pathak M, Poustchi H, Prakash S, Prasad N, Rafiei A, Raju SB, Ramezanzadeh K, Rawaf S, Rawaf DL, Rawal L, Reiner RC, Rezapour A, Ribeiro DC, Roeber L, Rothenbacher D, Rwegerera GM, Saadatagah S, Safari S, Sahle BW, Salem H, Sanabria J, Santos IS, Sarveazad A, Sawhney M, Schaeffner E, Schmidt MI, Schutte AE, Sepanlou SG, Shaikh MA, Sharafi Z, Sharif M, Sharifi A, Silva DAS, Singh JA, Singh NP, Sisay MMM, Soheili A, Sutradhar I, Teklehaimanot BF, Tesfay B etsyay, Teshome GF, Thakur JS, Tonelli M, Tran KB, Tran BX, Tran Ngoc C, Ullah I, Valdez PR, Varughese S, Vos T, Vu LG, Waheed Y, Werdecker A, Wolde HF, Wondmienen AB, Wulf Hanson S, Yamada T, Yeshaw Y, Yonemoto N, Yusefzadeh H, Zaidi Z, Zaki L, Zaman S Bin, Zamora N, Zarghi A, Zewdie KA, Ärnlöv J, Coresh J, Perico N, Remuzzi G, Murray CJL (2020) Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 395:709–733

9. Bilić J, Huang YL, Davidson G, Zimmermann T, Cruciat CM, Bienz M, Niehrs C (2007) Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science* (80-) 316:1619–1622

10. Blanc PD, Torén K (2007) Occupation in chronic obstructive pulmonary disease and chronic bronchitis: An update. *Int J Tuberc Lung Dis* 11:251–257
11. Boor P, Konieczny A, Villa L, Kunter U, van Roeyen CRC, LaRochelle WJ, Smithson G, Arrol S, Ostendorf T, Floege J (2007) PDGF-D inhibition by CR002 ameliorates tubulointerstitial fibrosis following experimental glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 22:1323–1331
12. Boor P, Floege J (2011) Chronic kidney disease growth factors in renal fibrosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 38:441–450
13. Boor P, Floege J (2012) The renal (myo-)fibroblast: a heterogeneous group of cells. *Nephrol Dial Transplant* 27:3027–3036
14. Böttinger EP (2007) TGF- β in Renal Injury and Disease. *Semin Nephrol* 27:309–320
15. Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, Menezes AM, Sullivan SD, Lee TA, Weiss KB, Jensen RL, Marks GB, Gulsvik A, Nizankowska-Mogilnicka E (2007) International variation in the prevalence of COPD (The BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet* 370:741–750
16. Bülow RD, Boor P (2019) Extracellular Matrix in Kidney Fibrosis: More Than Just a Scaffold. *J Histochem Cytochem* 67:643
17. C. CM. PV. ZA. LM. ML. PP. PS. BM. SA. MB. CA. MR. SG. D (2003) Aberrant Wnt/beta-catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis. URL: <https://iris.unito.it/handle/2318/1656578#.YEoQ8V1Kj0o>
18. Cao Q, Wang Y, Harris DCH (2014) Macrophage heterogeneity, phenotypes, and roles in renal fibrosis. *Kidney Int Suppl* 4:16–19
19. Celli BR, Cote CG, Marin JM, Casanova C, Montes De Oca M, Mendez RA, Plata VP, Cabral HJ (2004) The Body-Mass Index, Airflow Obstruction, Dyspnea, and Exercise Capacity Index in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* 350:1005–1012
20. Charbonney E, Speight P, Masszi A, Nakano H, Kapus A (2011) β -Catenin and Smad3 regulate the activity and stability of myocardin-related transcription factor during epithelial-myofibroblast transition. *Mol Biol Cell* 22:4472–4485
21. Chen W, Thomas J, Sadatsafavi M, FitzGerald JM (2015) Risk of cardiovascular comorbidity in patients with chronic obstructive pulmonary disease: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Respir Med* 3:631–639
22. Chilosi M, Poletti V, Zamò A, Lestani M, Montagna L, Piccoli P, Pedron S, Bertaso M, Scarpa A, Murer B, Cancellier A, Maestro R, Semenzato G, Doglioni C (2003)

- Aberrant Wnt/ β -catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 162:1495–1502
23. Clevers H, Nusse R (2012) Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell* 149:1192–1205
 24. Cosman F, Crittenden DB, Adachi JD, Binkley N, Czerwinski E, Ferrari S, Hofbauer LC, Lau E, Lewiecki EM, Miyauchi A, Zerbin CAF, Milmont CE, Chen L, Maddox J, Meisner PD, Libanati C, Grauer A (2016) Romosozumab Treatment in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *N Engl J Med* 375:1532–1543
 25. Crapo RO, Casaburi R, Coates AL, Enright PL, MacIntyre NR, McKay RT, Johnson D, Wanger JS, Zeballos RJ, Bittner V, Mottram C (2002) ATS statement: Guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med* 166:111–117
 26. DiRocco DP, Kobayashi A, Taketo MM, McMahon AP, Humphreys BD (2013) Wnt4/ β -catenin signaling in medullary kidney myofibroblasts. *J Am Soc Nephrol* 24:1399–1412
 27. Divo M, Cote C, De Torres JP, Casanova C, Marin JM, Pinto-Plata V, Zulueta J, Cabrera C, Zagaceta J, Hunninghake G, Celli B (2012) Comorbidities and risk of mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 186:155–161
 28. Djurdjaj S, Boor P (2019) Cellular and molecular mechanisms of kidney fibrosis. *Mol Aspects Med* 65:16–36
 29. Eddy AA (1996) Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 7:
 30. Evans M, Fryzek JP, Elinder CG, Cohen SS, McLaughlin JK, Nyrén O, Foreb CM (2005) The natural history of chronic renal failure: Results from an unselected, population-based, inception cohort in Sweden. *Am J Kidney Dis* 46:863–870
 31. Evans PD, Taal MW (2011) Epidemiology and causes of chronic kidney disease. *Medicine (Baltimore)* 39:402–406
 32. Federico G, Meister M, Mathow D, Heine GH, Moldenhauer G, Popovic Z V., Nordström V, Kopp-Schneider A, Hielscher T, Nelson PJ, Schaefer F, Porubsky S, Fliser D, Arnold B, Gröne H-J (2016) Tubular Dickkopf-3 promotes the development of renal atrophy and fibrosis. *JCI Insight* 1:84916
 33. Federico G, Meister M, Mathow D, Heine GH, Moldenhauer G, Popovic Z V., Nordström V, Kopp-Schneider A, Hielscher T, Nelson PJ, Schaefer F, Porubsky S, Fliser D, Arnold B, Gröne H-J (2016) Tubular Dickkopf-3 promotes the development of renal atrophy and fibrosis. *JCI Insight* 1:
 34. Feng Y, Ren J, Gui Y, Wei W, Shu B, Lu Q, Xue X, Sun X, He W, Yang J, Dai C

- (2018) Wnt/b-Catenin-Promoted Macrophage Alternative Activation Contributes to Kidney Fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 29:182–193
35. Flozak AS, Lam AP, Russell S, Jain M, Peled ON, Sheppard KA, Beri R, Mutlu GM, Budinger GRS, Gottardi CJ (2010) β -Catenin/T-cell factor signaling is activated during lung injury and promotes the survival and migration of alveolar epithelial cells. *J Biol Chem* 285:3157–3167
 36. Fogo AB (2003) Renal fibrosis: not just PAI-1 in the sky. *J Clin Invest* 112:326
 37. Forde JE, Dale TC (2007) Glycogen synthase kinase 3: A key regulator of cellular fate. *Cell Mol Life Sci* 64:1930–1944
 38. Gansevoort RT, Correa-Rotter R, Hemmelgarn BR, Jafar TH, Heerspink HJL, Mann JF, Matsushita K, Wen CP (2013) Chronic kidney disease and cardiovascular risk: Epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet* 382:339–352
 39. Genovese F, Manresa AA, Leeming DJ, Karsdal MA, Boor P (2014) The extracellular matrix in the kidney: A source of novel non-invasive biomarkers of kidney fibrosis? *Fibrogenes Tissue Repair* 7:1–14
 40. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (2020) GOLD Report 2020. *Glob Initiat Chronic Obstr Lung Dis* 141
 41. Gröne EF, Federico G, Nelson PJ, Arnold B, Gröne HJ (2017) The hormetic functions of Wnt pathways in tubular injury. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 469:899–906
 42. Guerra B, Haile SR, Lamprecht B, Ramírez AS, Martínez-Cambor P, Kaiser B, Alfageme I, Almagro P, Casanova C, Esteban-González C, Soler-Cataluña JJ, de-Torres JP, Miravittles M, Celli BR, Marin JM, ter Riet G, Sobradillo P, Lange P, Garcia-Aymerich J, Antó JM, Turner AM, Han MK, Langhammer A, Leivseth L, Bakke P, Johannessen A, Oga T, Cosio B, Ancochea-Bermúdez J, Echazarreta A, Roche N, Burgel PR, Sin DD, Soriano JB, Puhan MA (2018) Large-scale external validation and comparison of prognostic models: An application to chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Med* 16:1–13
 43. Gurung A, Uddin F, Hill RP, Ferguson PC, Alman BA (2009) β -Catenin Is a Mediator of the Response of Fibroblasts to Irradiation. *Am J Pathol* 174:248
 44. Halbert RJ, Isonaka S, George D, Iqbal A (2003) Interpreting COPD prevalence estimates: What is the true burden of disease? *Chest* 123:1684–1692
 45. Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, Badamgarav E, Buist AS, Mannino DM (2006) Global burden of COPD: Systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 28:523–532
 46. Hancox RJ, Poulton R, Greene JM, McLachlan CR, Pearce MS, Sears MR (2009)

- Associations between birth weight, early childhood weight gain and adult lung function. *Thorax* 64:228–232
47. Humphreys BD (2018) Mechanisms of Renal Fibrosis. *Annu Rev Physiol* is online 80:309–335
 48. Iimori S, Naito S, Noda Y, Sato H, Nomura N, Sohara E, Okado T, Sasaki S, Uchida S, Rai T (2018) Prognosis of chronic kidney disease with normal-range proteinuria: The CKD-ROUTE study. *PLoS One* 13:
 49. Isaka Y (2018) Targeting TGF- β Signaling in Kidney Fibrosis. *Int J Mol Sci* 19:
 50. Iwamoto H, Yokoyama A, Kitahara Y, Ishikawa N, Haruta Y, Yamane K, Hattori N, Hara H, Kohno N (2009) Airflow limitation in smokers is associated with subclinical atherosclerosis. *Am J Respir Crit Care Med* 179:35–40
 51. Kim M-G, Kim SC, Ko YS, Lee HY, Jo S-K, Cho W (2015) The Role of M2 Macrophages in the Progression of Chronic Kidney Disease following Acute Kidney Injury. *PLoS One* 10:e0143961
 52. Kitamoto K, Machida Y, Uchida J, Izumi Y, Shiota M, Nakao T, Iwao H, Yukimura T, Nakatani T, Miura K (2009) Effects of Liposome Clodronate on Renal Leukocyte Populations and Renal Fibrosis in Murine Obstructive Nephropathy. *J Pharmacol Sci J Pharmacol Sci* 111:3
 53. Kléber M, Sommer L (2004) Wnt signaling and the regulation of stem cell function. *Curr Opin Cell Biol* 16:681–687
 54. Kneidinger N, Yildirim AÖ, Callegari J, Takenaka S, Stein MM, Dumitrascu R, Bohla A, Bracke KR, Morty RE, Brusselle GG, Schermuly RT, Eickelberg O, Königshoff M (2011) Activation of the WNT/ β -catenin pathway attenuates experimental emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 183:723–733
 55. Königshoff M, Kramer M, Balsara N, Wilhelm J, Amarie OV, Jahn A, Rose F, Fink L, Seeger W, Schaefer L, Günther A, Eickelberg O (2009) WNT1-inducible signaling protein-1 mediates pulmonary fibrosis in mice and is upregulated in humans with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 119:772–787
 56. Kramann R, DiRocco DP, Humphreys BD (2013) Understanding the origin, activation and regulation of matrix-producing myofibroblasts for treatment of fibrotic disease. *J Pathol J Pathol* 231:273–289
 57. Krupnik VE, Sharp JD, Jiang C, Robison K, Chickering TW, Amaravadi L, Brown DE, Guyot D, Mays G, Leiby K, Chang B, Duong T, Goodearl ADJ, Gearing DP, Sokol SY, McCarthy SA (1999) Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene

- family. *Gene* 238:301–313
58. Lebleu VS, Taduri G, O’Connell J, Teng Y, Cooke VG, Woda C, Sugimoto H, Kalluri R (2013) Origin and Function of Myofibroblasts in Kidney Fibrosis. *Nat Med* 19:1047
 59. Lehmann M, Baarsma HA, Königshoff M (2016) WNT signaling in lung aging and disease. *American Thoracic Society* URL: www.atsjournals.org
 60. Levin A, Stevens PE, Bilous RW, Coresh J, De Francisco ALM, De Jong PE, Griffith KE, Hemmelgarn BR, Iseki K, Lamb EJ, Levey AS, Riella MC, Shlipak MG, Wang H, White CT, Winearls CG (2013) 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* 3:1–150
 61. Li Q, Shen K, Zhao Y, Ma C, Liu J, Ma J (2013) MiR-92b inhibitor promoted glioma cell apoptosis via targeting DKK3 and blocking the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *J Transl Med* 11:1–9
 62. Li SS, Sun Q, Hua MR, Suo P, Chen JR, Yu XY, Zhao YY (2021) Targeting the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway as a Potential Therapeutic Strategy in Renal Tubulointerstitial Fibrosis. *Front Pharmacol* 12:2112
 63. Li X, Yamagata K, Nishita M, Endo M, Arfian N, Rikitake Y, Emoto N, Hirata K ichi, Tanaka Y, Minami Y (2013) Activation of Wnt5a-Ror2 signaling associated with epithelial-to-mesenchymal transition of tubular epithelial cells during renal fibrosis. *Genes to Cells* 18:608–619
 64. Lin SL, Li B, Rao S, Yeo EJ, Hudson TE, Nowlin BT, Pei H, Chen L, Zheng JJ, Carroll TJ, Pollard JW, McMahon AP, Lang RA, Duffield JS (2010) Macrophage Wnt7b is critical for kidney repair and regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:4194–4199
 65. Liu J, Wang Y, Pan Q, Su Y, Zhang Z, Han J, Zhu X, Tang C, Hu D (2012) Wnt/ β -catenin pathway forms a negative feedback loop during TGF- β 1 induced human normal skin fibroblast-to-myofibroblast transition. *J Dermatol Sci* 65:38–49
 66. Liu M, Shi S, Senthilnathan S, Yu J, Wu E, Bergmann C, Zerres K, Bogdanova N, Coto E, Deltas C, Pierides A, Demetriou K, Devuyst O, Gitomer B, Laakso M, Lumiaho A, Lamnissou K, Magistroni R, Parfrey P, Breuning M, Peters DJM, Torra R, Winearls CG, Torres VE, Harris PC, Paterson AD, Pei Y (2010) Genetic variation of DKK3 may modify renal disease severity in ADPKD. *J Am Soc Nephrol* 21:1510–1520
 67. Lopez AD, Shibuya K, Rao C, Mathers CD, Hansell AL, Held LS, Schmid V, Buist S (2006) Chronic obstructive pulmonary disease: Current burden and future projections. *Eur Respir J* 27:397–412

68. Lovisa S, Zeisberg M, Kalluri R (2016) Partial Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Other New Mechanisms of Kidney Fibrosis. *Trends Endocrinol Metab* 27:681–695
69. Lu X, Rudemiller NP, Ren J, Wen Y, Yang B, Griffiths R, Privratsky JR, Madan B, Virshup DM, Crowley SD (2019) Opposing actions of renal tubular- and myeloid-derived porcupine in obstruction-induced kidney fibrosis. *Kidney Int* 96:1308–1319
70. Luke GN, Castro LFC, McLay K, Bird C, Coulson A, Holland PWH (2003) Dispersal of NK homeobox gene clusters in amphioxus and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5292–5295
71. Luo C, Zhou S, Zhou Z, Liu Y, Yang L, Liu J, Zhang Y, Li H, Liu Y, Hou FF, Zhou L (2018) Wnt9a promotes renal fibrosis by accelerating cellular senescence in tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 29:1238–1256
72. Lv J, Ehteshami P, Sarnak MJ, Tighiouart H, Jun M, Ninomiya T, Foote C, Rodgers A, Zhang H, Wang H, Strippoli GFM, Perkovic V (2013) Effects of intensive blood pressure lowering on the progression of chronic kidney disease: A systematic review and meta-analysis. *CMAJ* 185:949–957
73. Ma L, Wang HY (2007) Mitogen-activated protein kinase p38 regulates the Wnt/cyclic GMP/Ca²⁺ non-canonical pathway. *J Biol Chem* 282:28980–28990
74. MacDonald BT, Tamai K, He X (2009) Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Dev Cell* 17:9–26
75. Małgorzewicz S, Skrzypczak-Jankun E, Jankun J (2013) Plasminogen activator inhibitor-1 in kidney pathology (Review). *Int J Mol Med* 31:503–510
76. Mannino DM, Buist AS (2007) Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet* 370:765–773
77. Mao B, Wu W, Li Y, Hoppe D, Stannek P, Glinka A, Niehrs C (2001) LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* 411:321–325
78. Matissek, Reinhard, Fischer, Markus, Steiner G (2018) *Lebensmittelanalytik*.
79. Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, Woodward M, Levey AS, de Jong PE, Coresh J, Gansevoort RT, El-Nahas M, Eckardt KU, Kasiske BL, Tonelli M, Hemmelgarn B, Wang Y, Atkins RC, Polkinghorne KR, Chadban SJ, Shankar A, Klein R, Klein BEK, Wang H, Wang F, Zhang L, Liu L, Shlipak M, Sarnak MJ, Katz R, Fried LP, Jafar T, Islam M, Hatcher J, Poulter N, Chaturvedi N, Rothenbacher D, Brenner H, Raum E, Koenig W, Fox CS, Hwang SJ, Meigs JB, Cirillo M, Hallan S, Lydersen S, Holmen J, Shlipak M, Sarnak MJ, Katz R, Fried LP, Roderick P, Nitsch D, Fletcher A, Bulpitt C, Ohkubo T, Metoki H, Nakayama M, Kikuya M, Imai Y, Jassal SK, Barrett-

- Connor E, Bergstrom J, Warnock DG, Muntner P, Judd S, McClellan WM, Cushman M, Howard G, McClure LA, Jee SH, Kimm H, Yun JE, Wen CP, Wen SF, Tsao CK, Tsai MK, Ärnlöv J, Auguste P, Veldhuis K, Camarata L, Thomas B, Manley T (2010) Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet* 375:2073–2081
80. Miller J, Edwards LD, Agustí A, Bakke P, Calverley PMA, Celli B, Coxson HO, Crim C, Lomas DA, Miller BE, Rennard S, Silverman EK, Tal-Singer R, Vestbo J, Wouters E, Yates JC, Macnee W (2013) Comorbidity, systemic inflammation and outcomes in the ECLIPSE cohort. *Respir Med* 107:1376–1384
 81. Monaghan AP, Kioschis P, Wu W, Zuniga A, Bock D, Poustka A, Delius H, Niehrs C (1999) Dickkopf genes are co-ordinately expressed in mesodermal lineages. *Mech Dev* 87:45–56
 82. Nagasawa Y, Yamamoto R, Rakugi H, Isaka Y (2012) Cigarette smoking and chronic kidney diseases. *Hypertens Res* 35:261–265
 83. Nakamura REI, Hackam AS (2010) Analysis of Dickkopf3 interactions with Wnt signaling receptors. *Growth Factors* 28:232–242
 84. Nelson WJ, Nusse R (2004) Convergence of Wnt, β -Catenin, and Cadherin pathways. *Science* (80-) 303:1483–1487
 85. Nlandu-Khodo S, Osaki Y, Scarfe L, Yang H, Phillips-Mignemi M, Tonello J, Saito-Diaz K, Neelisetty S, Ivanova A, Huffstater T, McMahon R, Taketo MM, De Caestecker M, Kasinath B, Harris RC, Lee E, Gewin LS (2020) Tubular β -catenin and FoxO3 interactions protect in chronic kidney disease. *JCI Insight* 5:
 86. Nusse R, Clevers H (2017) Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* 169:985–999
 87. Patel AR, Hurst JR (2011) Extrapulmonary comorbidities in chronic obstructive pulmonary disease: state of the art. *Expert Rev Respir Med* 5:647–662
 88. Perazella MA, Khan S (2006) Increased mortality in chronic kidney disease: A call to action. *Am J Med Sci* 331:150–153
 89. Pollard SL, Holland PWH (2000) Evidence for 14 homeobox gene clusters in human genome ancestry. *Curr Biol* 10:1059–1062
 90. Rabe KF, Watz H (2017) Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 389:1931–1940
 91. Rauen T, Eitner F, Fitzner C, Sommerer C, Zeier M, Otte B, Panzer U, Peters H,

- Benck U, Mertens PR, Kuhlmann U, Witzke O, Gross O, Vielhauer V, Mann JFE, Hilgers R-D, Floege J (2015) Intensive Supportive Care plus Immunosuppression in IgA Nephropathy. *N Engl J Med* 373:2225–2236
92. Ricardo SD, Van Goor H, Eddy AA (2008) Macrophage diversity in renal injury and repair. *J Clin Invest* 118:3522–3530
93. Roth GA, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, Abbasi N, Abbastabar H, Abd-Allah F, Abdela J, Abdelalim A, Abdollahpour I, Abdulkader RS, Abebe HT, Abebe M, Abebe Z, Abeje AN, Abera SF, Abil OZ, Abraha HN, Abrham AR, Abu-Raddad LJ, Accrombessi MMK, Acharya D, Adamu AA, Adebayo OM, Adedoyin RA, Adekanmbi V, Adetokunboh OO, Adhena BM, Adib MG, Admasie A, Afshin A, Agarwal G, Agesa KM, Agrawal A, Agrawal S, Ahmadi A, Ahmadi M, Ahmed MB, Ahmed S, Aichour AN, Aichour I, Aichour MTE, Akbari ME, Akinyemi RO, Akseer N, Al-Aly Z, Al-Eyadhy A, Al-Raddadi RM, Alahdab F, Alam K, Alam T, Alebel A, Alene KA, Alijanzadeh M, Alizadeh-Navaei R, Aljunid SM, Alkerwi A, Alla F, Allebeck P, Alonso J, Altirkawi K, Alvis-Guzman N, Amare AT, Aminde LN, Amini E, Ammar W, Amoako YA, Anber NH, Andrei CL, Androudi S, Anmut MD, Anjomshoa M, Ansari H, Ansha MG, Antonio CAT, Anwari P, Aremu O, Arnlov J, Arora A, Arora M, Artaman A, Aryal KK, Asayesh H, Asfaw ET, Ataro Z, Atique S, Atre SR, Ausloos M, Avokpaho EFGA, Awasthi A, Ayala Quintanilla BP, Ayele Y, Ayer R, Azzopardi PS, Babazadeh A, Bacha U, Badali H, Badawi A, Bali AG, Ballesteros KE, Banach M, Banerjee K, Bannick MS, Banoub JAM, Barboza MA, Barker-Collo SL, Barnighausen TW, Barquera S, Barrero LH, Bassat Q, Basu S, Baune BT, Baynes HW, Bazargan-Hejazi S, Bedi N, Beghi E, Behzadifar M, Behzadifar M, Bejot Y, Bekele BB, Belachew AB, Belay E, Belay YA, Bell ML, Bello AK, Bennett DA, Bensenor IM, Berman AE, Bernabe E, Bernstein RS, Bertolacci GJ, Beuran M, Beyranvand T, Bhalla A, Bhattarai S, Bhaumik S, Bhutta ZA, Biadgo B, Biehl MH, Bijani A, Bikbov B, Bilano V, Bililign N, Bin Sayeed MS, Bisanzio D, Biswas T, Blacker BF, Basara BB, Borschmann R, Bosetti C, Bozorgmehr K, Brady OJ, Brant LC, Brayne C, Brazinova A, Breitborde NJK, Brenner H, Briant PS, Britton G, Brugha T, Busse R, Butt ZA, Callender CSKH, Campos-Nonato IR, Campuzano Rincon JC, Cano J, Car M, Cardenas R, Carreras G, Carrero JJ, Carter A, Carvalho F, Castaneda-Orjuela CA, Castillo Rivas J, Castle CD, Castro C, Castro F, Catala-Lopez F, Cerin E, Chaiah Y, Chang JC, Charlson FJ, Chaturvedi P, Chiang PPC, Chimed-Ochir O, Chisumpa VH, Chitheer A, Chowdhury R, Christensen H, Christopher DJ, Chung SC, Cicuttini FM, Ciobanu LG, Cirillo M, Cohen AJ, Cooper LT, Cortesi PA, Cortinovis M, Cousin E, Cowie BC, Criqui MH, Cromwell EA, Crowe CS, Crump JA, Cunningham M, Daba AK, Dadi AF, Dandona L, Dandona R, Dang AK, Dargan PI, Daryani A, Das SK, Gupta R Das, Neves J Das, Dasa TT, Dash AP, Davis AC, Davis

Weaver N, Davitoiu DV, Davletov K, De La Hoz FP, De Neve JW, Degefa MG, Degenhardt L, Degfie TT, Deiparine S, Demoz GT, Demtsu BB, Denova-Gutierrez E, Deribe K, Dervenis N, Des Jarlais DC, Dessie GA, Dey S, Dharmaratne SD, Dicker D, Dinberu MT, Ding EL, Dirac MA, Djalalinia S, Dokova K, Doku DT, Donnelly CA, Dorsey ER, Doshi PP, Douwes-Schultz D, Doyle KE, Driscoll TR, Dubey M, Dubljanin E, Duken EE, Duncan BB, Duraes AR, Ebrahimi H, Ebrahimpour S, Edessa D, Edvardsson D, Eggen AE, El Bcheraoui C, El Sayed Zaki M, El-Khatib Z, Elkout H, Ellingsen CL, Endres M, Endries AY, Er B, Erskine HE, Eshrati B, Eskandarieh S, Esmaeili R, Esteghamati A, Fakhar M, Fakhim H, Faramarzi M, Fareed M, Farhadi F, Farinha CSE, Faro A, Farvid MS, Farzadfar F, Farzaei MH, Feigin VL, Feigl AB, Fentahun N, Fereshtehnejad SM, Fernandes E, Fernandes JC, Ferrari AJ, Feyissa GT, Filip I, Finegold S, Fischer F, Fitzmaurice C, Foigt NA, Foreman KJ, Fornari C, Frank TD, Fukumoto T, Fuller JE, Fullman N, Furst T, Furtado JM, Futran ND, Gallus S, Garcia-Basteiro AL, Garcia-Gordillo MA, Gardner WM, Gebre AK, Gebrehiwot TT, Gebremedhin AT, Gebremichael B, Gebremichael TG, Gelano TF, Geleijnse JM, Genova-Maleras R, Geramo YCD, Gething PW, Gezae KE, Ghadami MR, Ghadimi R, Ghasemi Falavarjani K, Ghasemi-Kasman M, Ghimire M, Gibney KB, Gill PS, Gill TK, Gillum RF, Ginawi IA, Giroud M, Giussani G, Goenka S, Goldberg EM, Goli S, Gomez-Dantes H, Gona PN, Gopalani SV, Gorman TM, Goto A, Goulart AC, Gnedovskaya E V., Grada A, Grosso G, Gugnani HC, Guimaraes ALS, Guo Y, Gupta PC, Gupta R, Gupta R, Gupta T, Gutierrez RA, Gyawali B, Haagsma JA, Hafezi-Nejad N, Hagos TB, Hailegiyorgis TT, Hailu GB, Haj-Mirzaian A, Haj-Mirzaian A, Hamadeh RR, Hamidi S, Handal AJ, Hankey GJ, Harb HL, Harikrishnan S, Haro JM, Hasan M, Hassankhani H, Hassen HY, Havmoeller R, Hay RJ, Hay SI, He Y, Hedayatizadeh-Omran A, Hegazy MI, Heibati B, Heidari M, Hendrie D, Henok A, Henry NJ, Herteliu C, Heydarpour F, Heydarpour P, Heydarpour S, Hibstu DT, Hoek HW, Hole MK, Homaie Rad E, Hoogar P, Hosgood HD, Hosseini SM, Hosseinzadeh M, Hostiuc M, Hostiuc S, Hotez PJ, Hoy DG, Hsiao T, Hu G, Huang JJ, Hussein A, Hussen MM, Hutfless S, Idrisov B, Ilesanmi OS, Iqbal U, Irvani SSN, Irvine CMS, Islam N, Islam SMS, Islami F, Jacobsen KH, Jahangiry L, Jahanmehr N, Jain SK, Jakovljevic M, Jalu MT, James SL, Javanbakht M, Jayatilleke AU, Jeemon P, Jenkins KJ, Jha RP, Jha V, Johnson CO, Johnson SC, Jonas JB, Joshi A, Jozwiak JJ, Jungari SB, Jurisson M, Kabir Z, Kadel R, Kahsay A, Kalani R, Karami M, Karami Matin B, Karch A, Karema C, Karimi-Sari H, Kasaeian A, Kassa DH, Kassa GM, Kassa TD, Kassebaum NJ, Katikireddi SV, Kaul A, Kazemi Z, Kazemi Karyani A, Kazi DS, Kefale AT, Keiyoro PN, Kemp GR, Kengne AP, Keren A, Kesavachandran CN, Khader YS, Khafaei B, Khafaie MA, Khajavi A, Khalid N, Khalil IA, Khan EA, Khan MS, Khan MA, Khang YH, Khater MM, Khoja AT, Khosravi A,

Khosravi MH, Khubchandani J, Kiadaliri AA, Kibret GD, Kidanemariam ZT, Kiirithio DN, Kim D, Kim YE, Kim YJ, Kimokoti RW, Kinfu Y, Kisa A, Kissimova-Skarbek K, Kivimaki M, Knudsen AKS, Kocarnik JM, Kochhar S, Kokubo Y, Kolola T, Kopec JA, Koul PA, Koyanagi A, Kravchenko MA, Krishan K, Kuate Defo B, Kucuk Bicer B, Kumar GA, Kumar M, Kumar P, Kutz MJ, Kuzin I, Kyu HH, Lad DP, Lad SD, Lafranconi A, Lal DK, Laloo R, Lallukka T, Lam JO, Lami FH, Lansingh VC, Lansky S, Larson HJ, Latifi A, Lau KMM, Lazarus J V., Lebedev G, Lee PH, Leigh J, Leili M, Leshargie CT, Li S, Li Y, Liang J, Lim LL, Lim SS, Limenih MA, Linn S, Liu S, Liu Y, Lodha R, Lonsdale C, Lopez AD, Lorkowski S, Lotufo PA, Lozano R, Lunevicius R, Ma S, Macarayan ERK, Mackay MT, MacLachlan JH, Maddison ER, Madotto F, Magdy Abd El Razek H, Magdy Abd El Razek M, Maghavani DP, Majdan M, Majdzadeh R, Majeed A, Malekzadeh R, Malta DC, Manda AL, Mandarano-Filho LG, Manguerra H, Mansournia MA, Mapoma CC, Marami D, Maravilla JC, Marcenes W, Marczak L, Marks A, Marks GB, Martinez G, Martins-Melo FR, Martopullo I, Marz W, Marzan MB, Masci JR, Massenburg BB, Mathur MR, Mathur P, Matzopoulos R, Maulik PK, Mazidi M, McAlinden C, McGrath JJ, McKee M, McMahan BJ, Mehata S, Mehndiratta MM, Mehrotra R, Mehta KM, Mehta V, Mekonnen TC, Melese A, Melku M, Memiah PTN, Memish ZA, Mendoza W, Mengistu DT, Mengistu G, Mensah GA, Mereta ST, Meretoja A, Meretoja TJ, Mestrovic T, Mezgebe HB, Miazgowski B, Miazgowski T, Milllear AI, Miller TR, Miller-Petrie MK, Mini GK, Mirabi P, Mirarefin M, Mirica A, Mirrakhimov EM, Misganaw AT, Mitiku H, Moazen B, Mohammad KA, Mohammadi M, Mohammadifard N, Mohammed MA, Mohammed S, Mohan V, Mokdad AH, Molokhia M, Monasta L, Moradi G, Moradi-Lakeh M, Moradinazar M, Moraga P, Morawska L, Velasquez IM, Morgado-Da-Costa J, Morrison SD, Moschos MM, Mouodi S, Mousavi SM, Muchie KF, Mueller UO, Mukhopadhyay S, Muller K, Mumford JE, Musa J, Musa KI, Mustafa G, Muthupandian S, Nachega JB, Nagel G, Naheed A, Nahvijou A, Naik G, Nair S, Najafi F, Naldi L, Nam HS, Nangia V, Nansseu JR, Nascimento BR, Natarajan G, Neamati N, Negoii I, Negoii RI, Neupane S, Newton CRJ, Ngalesoni FN, Ngunjiri JW, Nguyen AQ, Nguyen G, Nguyen HT, Nguyen HT, Nguyen LH, Nguyen M, Nguyen TH, Nichols E, Ningrum DNA, Nirayo YL, Nixon MR, Nolutshungu N, Nomura S, Norheim OF, Noroozi M, Norrving B, Noubiap JJ, Nouri HR, Shiadeh MN, Nowroozi MR, Nyasulu PS, Odell CM, Ofori-Asenso R, Ogbo FA, Oh IH, Oladimeji O, Olagunju AT, Olivares PR, Olsen HE, Olusanya BO, Olusanya JO, Ong KL, Ong SKS, Oren E, Orpana HM, Ortiz A, Ortiz JR, Otstavnov SS, Overland S, Owolabi MO, Ozdemir R, Mahesh PA, Pacella R, Pakhale S, Pakhare AP, Pakpour AH, Pana A, Panda-Jonas S, Pandian JD, Parisi A, Park EK, Parry CDH, Parsian H, Patel S, Pati S, Patton GC, Paturi VR, Paulson KR, Pereira A, Pereira DM,

Perico N, Pesudovs K, Petzold M, Phillips MR, Piel FB, Pigott DM, Pillay JD, Pirsahab M, Pishgar F, Polinder S, Postma MJ, Pourshams A, Poustchi H, Pujar A, Prakash S, Prasad N, Purcell CA, Qorbani M, Quintana H, Quistberg DA, Rade KW, Anwar Rafay AR, Rahim F, Rahimi K, Rahimi-Movaghar A, Rahman M, Rahman MHU, Rahman MA, Rai RK, Rajsic S, Ram U, Ranabhat CL, Ranjan P, Rao PC, Rawaf DL, Rawaf S, Razo-Garcia C, Reddy KS, Reiner RC, Reitsma MB, Remuzzi G, Renzaho AMN, Resnikoff S, Rezaei S, Rezaeian S, Rezai MS, Riahi SM, Ribeiro ALP, Rios-Blancas MJ, Roba KT, Roberts NLS, Robinson SR, Roever L, Ronfani L, Roshandel G, Rostami A, Rothenbacher D, Roy A, Rubagotti E, Sachdev PS, Saddik B, Sadeghi E, Safari H, Safdarian M, Safi S, Safiri S, Sagar R, Sahebkar A, Sahraian MA, Salam N, Salama JS, Salamati P, De Freitas Saldanha R, Saleem Z, Salimi Y, Salvi SS, Salz I, Sambala EZ, Samy AM, Sanabria J, Dolores Sanchez-Nino M, Santomauro DF, Santos IS, Santos JV, Santric Milicevic MM, Jose BPS, Sarker AR, Sarmiento-Suarez R, Sarrafzadegan N, Sartorius B, Sarvi S, Sathian B, Satpathy M, Sawant AR, Sawhney M, Saxena S, Sayyah M, Schaeffner E, Schmidt MI, Schneider IJC, Schottker B, Schutte AE, Schwebel DC, Schwendicke F, Scott JG, Sekerija M, Sepanlou SG, Servan-Mori E, Seyedmousavi S, Shabaninejad H, Shackelford KA, Shafieesabet A, Shahbazi M, Shaheen AA, Shaikh MA, Shams-Beyranvand M, Shamsi M, Shamsizadeh M, Sharafi K, Sharif M, Sharif-Alhoseini M, Sharma R, She J, Sheikh A, Shi P, Shiferaw MS, Shigematsu M, Shiri R, Shirkoobi R, Shiue I, Shokraneh F, Shrimel MG, Si S, Siabani S, Siddiqi TJ, Sigfusdottir ID, Sigurvinsdottir R, Silberberg DH, Santos Silva DA, Silva JP, Da Silva NT, Silveira DGA, Singh JA, Singh NP, Singh PK, Singh V, Sinha DN, Sliwa K, Smith M, Sobaih BH, Sobhani S, Sobngwi E, Soneji SS, Soofi M, Sorensen RJD, Soriano JB, Soyiri IN, Sposato LA, Sreeramareddy CT, Srinivasan V, Stanaway JD, Starodubov VI, Stathopoulou V, Stein DJ, Steiner C, Stewart LG, Stokes MA, Subart ML, Sudaryanto A, Sufiyan MB, Sur PJ, Sutradhar I, Sykes BL, Sylaja PN, Sylte DO, Szoeki CEI, Tabares-Seisdedos R, Tabuchi T, Tadakamadla SK, Takahashi K, Tandon N, Tassew SG, Taveira N, Tehrani-Banihashemi A, Tekalign TG, Tekle MG, Temsah MH, Temsah O, Terkawi AS, Teshale MY, Tessema B, Tessema GA, Thankappan KR, Thirunavukkarasu S, Thomas N, Thrift AG, Thurston GD, Tilahun B, To QG, Tobe-Gai R, Tonelli M, Topor-Madry R, Torre AE, Tortajada-Girbes M, Touvier M, Tovani-Palone MR, Tran BX, Tran KB, Tripathi S, Troeger CE, Truelsen TC, Truong NT, Tsadik AG, Tsoi D, Tudor Car L, Murat Tuzcu E, Tyrovolas S, Ukwaja KN, Ullah I, Undurraga EA, Updike RL, Usman MS, Uthman OA, Uzun SB, Vaduganathan M, Vaezi A, Vaidya G, Valdez PR, Varavikova E, Vasankari TJ, Venketasubramanian N, Villafaina S, Violante FS, Vladimirov SK, Vlassov V, Vollset SE, Vos T, Wagner GR, Wagnew FS, Waheed Y,

- Wallin MT, Walson JL, Wang Y, Wang YP, Wassie MM, Weiderpass E, Weintraub RG, Weldegebreal F, Weldegewergs KG, Werdecker A, Werkneh AA, West TE, Westerman R, Whiteford HA, Widecka J, Wilner LB, Wilson S, Winkler AS, Wiysonge CS, Wolfe CDA, Wu S, Wu YC, Wyper GMA, Xavier D, Xu G, Yadgir S, Yadollahpour A, Yahyazadeh Jabbari SH, Yakob B, Yan LL, Yano Y, Yaseri M, Yasin YJ, Yentur GK, Yeshaneh A, Yimer EM, Yip P, Yirsaw BD, Yisma E, Yonemoto N, Yonga G, Yoon SJ, Yotebieng M, Younis MZ, Yousefifard M, Yu C, Zadnik V, Zaidi Z, Zaman S Bin, Zamani M, Zare Z, Zeleke AJ, Zenebe ZM, Zhang AL, Zhang K, Zhou M, Zodpey S, Zuhlke LJ, Naghavi M, Murray CJL (2018) Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 392:1736–1788
94. Salvi SS, Barnes PJ (2009) Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *Lancet* 374:733–743
 95. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, Hamm LL, McCullough PA, Kasiske BL, Kelepouris E, Klag MJ, Parfrey P, Pfeffer M, Raij L, Spinosa DJ, Wilson PW (2003) Kidney Disease as a Risk Factor for Development of Cardiovascular Disease. *Circulation* 108:2154–2169
 96. Schunk SJ, Zarbock A, Meersch M, Küllmar M, Kellum JA, Schmit D, Wagner M, Triem S, Wagenpfeil S, Gröne HJ, Schäfers HJ, Fliser D, Speer T, Zewinger S (2019) Association between urinary dickkopf-3, acute kidney injury, and subsequent loss of kidney function in patients undergoing cardiac surgery: an observational cohort study. *Lancet* 394:488–496
 97. Schunk SJ, Floege J, Fliser D, Speer T (2020) WNT– β -catenin signalling — a versatile player in kidney injury and repair. *Nat Rev Nephrol*
 98. Schunk SJ, Speer T, Petrakis I, Fliser D (2020) Dickkopf 3—a novel biomarker of the ‘kidney injury continuum.’ *Nephrol Dial Transplant* 1–7
 99. Schunk SJ, Floege J, Fliser D, Speer T (2020) WNT– β -catenin signalling — a versatile player in kidney injury and repair. *Nat Rev Nephrol* 17:
 100. Schunk SJ, Beisswenger C, Ritzmann F, Herr C, Wagner M, Triem S, Hütter G, Schmit D, Zewinger S, Sarakpi T, Honecker A, Mahadevan P, Boor P, Wagenpfeil S, Jörres R, Watz H, Welte T, Vogelmeier CF, Gröne HJ, Fliser D, Speer T, Bals R (2021) Measurement of urinary Dickkopf-3 uncovered silent progressive kidney injury in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Kidney Int* 100:1081–1091
 101. Shi J, Li F, Luo M, Wei J, Liu X (2017) Distinct Roles of Wnt/ β -Catenin Signaling in

the Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Mediators Inflamm* 2017:

102. Surendran K, Schiavi S, Hruska KA (2005) Wnt-Dependent β -Catenin Signaling Is Activated after Unilateral Ureteral Obstruction, and Recombinant Secreted Frizzled-Related Protein 4 Alters the Progression of Renal Fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 16:2373–2384
103. Tabib T, Huang M, Morse N, Papazoglou A, Behera R, Jia M, Bulik M, Monier DE, Benos P V., Chen W, Domsic R, Lafyatis R (2021) Myofibroblast transcriptome indicates SFRP2hi fibroblast progenitors in systemic sclerosis skin. *Nat Commun* 2021 12:1–13
104. Tager IB, Ngo L, Hanrahan JP (2012) Maternal smoking during pregnancy. Effects on lung function during the first 18 months of life. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.15237663813>
105. Takabatake N, Nakamura H, Abe S, Inoue S, Hino T, Saito H, Yuki H, Kato S, Tomoike H (2000) The relationship between chronic hypoxemia and activation of the tumor necrosis factor- α system in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1179–1184
106. Tan RJ, Zhou D, Zhou L, Liu Y (2014) Wnt/ β -catenin signaling and kidney fibrosis. *Kidney Int Suppl* 4:84–90
107. Tang PMK, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY (2019) Macrophages: versatile players in renal inflammation and fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 15:144–158
108. Tracey KJ, Wei H, Manogue KR, Fong Y, Hesse DG, Nguyen HT, Kuo GC, Beutler B, Cotran RS, Cerami A, Lowry SF (1988) Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. *J Exp Med* 167:1211–1227
109. Tsai WC, Wu HY, Peng Y Sen, Ko MJ, Wu MS, Hung KY, Wu KD, Chu TS, Chien KL (2016) Risk factors for development and progression of chronic kidney disease: A systematic review and exploratory meta-analysis. *Med (United States)* 95:1–9
110. Ug D, Geb S, Tel H ELISA für die Bestimmung von humanem Dickkopf 3 (Dkk3) in Urin Gebrauchsinformation. 3:
111. Van Gestel YRBM, Chonchol M, Hoeks SE, Welten GMJM, Stam H, Mertens FW, Van Domburg RT, Poldermans D (2009) Association between chronic obstructive pulmonary disease and chronic kidney disease in vascular surgery patients. *Nephrol Dial Transplant* 24:2763–2767
112. Vanfleteren LEGW, Spruit MA, Groenen M, Gaffron S, Van Empel VPM, Bruijnzeel

- PLB, Rutten EPA, Roodt JO t., Wouters EFM, Franssen FME (2013) Clusters of comorbidities based on validated objective measurements and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 187:728–735
113. Veeck J, Bektas N, Hartmann A, Kristiansen G, Heindricks U, Knüchel R, Dahl E (2008) Wnt signalling in human breast cancer: Expression of the putative Wnt inhibitor Dickkopf-3 (DKK3) is frequently suppressed by promoter hypermethylation in mammary tumours. *Breast Cancer Res* 10:1–11
114. Veeck J, Dahl E (2012) Targeting the Wnt pathway in cancer: The emerging role of Dickkopf-3. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* 1825:18–28
115. Vestbo J, Hurd SS, Agustí AG, Jones PW, Vogelmeier C, Anzueto A, Barnes PJ, Fabbri LM, Martinez FJ, Nishimura M, Stockley RA, Sin DD, Rodriguez-Roisin R (2013) Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 187:347–365
116. Vogelmeier AC, Buhl R, Burghuber O, med Claus Vogelmeier K Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit chronisch obstruktiver Bronchitis und Lungenemphysem (COPD) * Guideline for the Diagnosis and Treatment of COPD Patients Issued by the German Respiratory Society and the German Atemwegsliga in Cooperation with the Austrian Society of Pneumology. 12:
117. Vogelmeier CF, Criner GJ, Martinez FJ, Anzueto A, Barnes PJ, Bourbeau J, Celli BR, Chen R, Decramer M, Fabbri LM, Frith P, Halpin DMG, López Varela MV, Nishimura M, Roche N, Rodriguez-Roisin R, Sin DD, Singh D, Stockley R, Vestbo J, Wedzicha JA, Agusti A (2017) Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report: GOLD Executive Summary. *Respirology* 22:575–601
118. Wang Y, Stavem K, Dahl FA, Humerfelt S, Haugen T (2014) Factors associated with a prolonged length of stay after acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (AECOPD). *Int J COPD* 9:99–105
119. Webster AC, Nagler E V., Morton RL, Masson P (2017) Chronic Kidney Disease. *Lancet* 389:1238–1252
120. WHO The top 10 causes of death. URL: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
121. Yang Y, Mlodzik M (2015) Wnt-Frizzled/Planar Cell Polarity Signaling: Cellular Orientation by Facing the Wind (Wnt). *Annu Rev Cell Dev Biol* 31:623–646

122. Yende S, Waterer GW, Tolley EA, Newman AB, Bauer DC, Taaffe DR, Jensen R, Crapo R, Rubin S, Nevitt M, Simonsick EM, Satterfield S, Harris T, Kritchevsky SB (2006) Inflammatory markers are associated with ventilatory limitation and muscle dysfunction in obstructive lung disease in well functioning elderly subjects. *Thorax* 61:10–16
123. You A, Fokas E, Wang LF, He H, Kleb B, Niederacher D, Engenhardt-Cabillic R, An HX (2011) Expression of the Wnt antagonist DKK3 is frequently suppressed in sporadic epithelial ovarian cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 137:621–627
124. Yue W, Sun Q, Dacic S, Landreneau RJ, Siegfried JM, Yu J, Zhang L (2008) Downregulation of Dkk3 activates β -catenin/TCF-4 signaling in lung cancer. *Carcinogenesis* 29:84–92
125. Zewinger S, Schumann T, Fliser D, Speer T (2016) Innate immunity in CKD-associated vascular diseases. *Nephrol Dial Transplant* 31:1813–1821
126. Zewinger S, Rauen T, Rudnicki M, Federico G, Wagner M, Triem S, Schunk SJ, Petrakis I, Schmit D, Wagenpfeil S, Heine GH, Mayer G, Floege J, Fliser D, Gröne HJ, Speer T (2018) Dickkopf-3 (DKK3) in urine identifies patients with short-term risk of eGFR loss. *J Am Soc Nephrol* 29:2722–2733
127. Zewinger S, Reiser J, Jankowski V, Alansary D, Hahm E, Triem S, Klug M, Schunk SJ, Schmit D, Kramann R, Körbel C, Ampofo E, Laschke MW, Selejan SR, Paschen A, Herter T, Schuster S, Silbernagel G, Sester M, Sester U, Aßmann G, Bals R, Kostner G, Jahnen-Dechent W, Menger MD, Rohrer L, März W, Böhm M, Jankowski J, Kopf M, Latz E, Niemeyer BA, Fliser D, Laufs U, Speer T (2020) Apolipoprotein C3 induces inflammation and organ damage by alternative inflammasome activation. *Nat Immunol* 21:30–41
128. Zhang F, Liu H, Liu D, Liu Y, Li H, Tan X, Liu F, Peng Y, Zhang H (2017) Effects of RAAS Inhibitors in Patients with Kidney Disease. *Curr Hypertens Rep* 19:
129. Zhang JD, Patel MB, Griffiths R, Dolber PC, Ruiz P, Sparks MA, Stegbauer J, Jin H, Gomez JA, Buckley AF, Lefler WS, Chen D, Crowley SD (2014) Type 1 angiotensin receptors on macrophages ameliorate IL-1 receptor-mediated kidney fibrosis. *J Clin Invest* 124:2198–2203
130. Zhou D, Tan RJ, Zhou L, Li Y, Liu Y (2013) Kidney tubular β -catenin signaling controls interstitial fibroblast fate via epithelial-mesenchymal communication. *Sci Rep* 3:1–10
131. Zhou D, Fu H, Zhang L, Zhang K, Min Y, Xiao L, Lin L, Bastacky SI, Liu Y (2017) Tubule-derived Wnts are required for fibroblast activation and kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 28:2322–2336

132. Zhou D, Fu H, Xiao L, Mo H, Zhuo H, Tian X, Lin L, Xing J, Liu Y (2018) Fibroblast-specific β -catenin signaling dictates the outcome of AKI. *J Am Soc Nephrol* 29:1257–1271
133. Chronic obstructive pulmonary disease - ERS. URL:
<https://www.erswhitebook.org/chapters/chronic-obstructive-pulmonary-disease/>
134. American Thoracic Society statement: Occupational contribution to the burden of airway disease - ProQuest. URL:
<https://search.proquest.com/openview/cf3c5d9017e38d1261efe26b240e64e8/1?pq-origsite=gscholar&cbl=40575>
135. (2020) Beckman Coulter AU480 Instructions For Use.