



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Medizin

Die Immunparalyse bei Hämodialysepatienten

Duy- Dang Pham

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzende/r:

Prof. Dr. Marcus Makowski

Prüfende/r der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Christoph Schmaderer
2. Priv.- Doz. Dr. Matthias Heck

Die Dissertation wurde am 07.05.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.11.2021 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis	VI
1 Kurzfassung.....	1
2 Einleitung und Zielsetzung.....	2
2.1 Die chronische Niereninsuffizienz und der Dialysepatient	2
2.1.1 Allgemeines zur chronischen Niereninsuffizienz	2
2.1.2 Epidemiologie	2
2.1.3 Krankheitsverlauf.....	3
2.1.4 Prinzip der Hämodialyse.....	4
2.2 Veränderungen des Immunsystems bei der terminalen Niereninsuffizienz	6
2.2.1 Chronische Inflammation.....	6
2.2.2 Immundefizienz bei terminaler Niereninsuffizienz.....	8
2.2.3 Zusammenhang der chronischen Inflammation und Immundefizienz.....	13
2.3 Die Immunparalyse	15
2.3.1 Allgemeines zur Immunparalyse	15
2.3.2 Das systemic inflammatory response syndrome.....	15
2.3.3 Der Immunphänotyp der Immunparalyse	16
2.4 Hypothese: bei Hämodialysepatienten besteht aufgrund von chronischer Inflammation eine Immunparalyse	21
3 Materialien und Methoden	22
3.1 Patienten und gesunde Kontrollprobanden	22
3.1.1 Einschlusskriterien Citrat- Acetat- Studie	22
3.1.2 Einschlusskriterien gesunder Kontrollprobanden	22
3.2 Materialien	23
3.3 Methoden	27

3.3.1	Probenmaterialgewinnung und -verarbeitung	27
3.3.2	Durchflusszytometrie	28
3.3.3	Bead- Array	35
3.3.4	Zellkultur und Stimulations- Assay	36
3.3.5	Statistische Analyse	39
4	Ergebnisse	42
4.1	Deskriptive Kohortenstatistik	42
4.2	Ergebnisse zu Untersuchungen des Immunphänotyp bei Dialysepatienten	44
4.2.1	Monozyten von Dialysepatienten zeigen vermehrt Zeichen von Aktivierung	44
4.2.2	Monozyten von Dialysepatienten zeigen eine veränderte Expression von Rezeptoren für die Antigenpräsentation	46
4.2.3	Monozyten von Dialysepatienten exprimieren vermehrt Rezeptoren der Immunparalyse	48
4.2.4	Dialysepatienten zeigen erhöhte Serum- Konzentrationen von pro- inflammatorischen akute- Phase- Proteinen und Zytokinen	50
4.2.5	Auf Monozyten korreliert Expression von Markern der Immunparalyse mit Expression von Markern der Inflammation	52
4.2.6	T- Zellen von Dialysepatienten zeigen eine Verschiebung zu älteren T- Gedächtniszell- Generationen	54
4.2.7	Ältere T- Zell Generationen exprimieren auch in gesunden Kontrollen weniger Korezeptoren und vermehrt Marker der T- Zell- Erschöpfung	56
4.2.8	T- Zellen von Dialysepatienten zeigen vermehrt Zeichen von Aktivierung	58
4.2.9	Bei Dialysepatienten bestehen mehr CD28- negative CD4 ⁺ T- Helfer- und CD8 ⁺ T- Killerzellen	59
4.2.10	Verlust von CD28 auf T- Zellen korreliert mit zellulären und löslichen Markern der Inflammation	62
4.2.11	Dialysepatienten zeigen keine konsistente Vermehrung Exhaustionmarker- positiver T-Zellen. 64	
4.2.12	Marker der T- Zell- Erschöpfung korrelieren mit Markern der T- Zell- Aktivierung 68	
4.2.13	HD- Patienten zeigen trotz verstärkter T- Zell- Aktivierung niedrigere Serumkonzentrationen von T- Zell- typischen Zytokinen	70

4.2.14 T- Helferzellen von Dialysepatienten zeigen nach Stimulation keine Interferon-Antwort	72
4.2.15 T-Zellen von Dialyse- Patienten zeigen nach Stimulation eine Typ 2 T- Helferzell-typische Zytokinantwort.....	74
4.2.16 T- Zellen von Dialysepatienten sind auch in ihrer frühen Effektorfunktion eingeschränkt.....	76
4.2.17 Serumkonzentrationen von Interleukin-10 und -4 sind bei Dialysepatienten nicht erhöht	78
5 Diskussion	80
5.1 Monozyten von Hämodialyse- Patienten zeigen keinen reprogrammierten Phänotyp	80
5.2 T- Zellen von Hämodialysepatienten zeigen keine klassische Exhaustion.....	84
5.3 Bei Hämodialysepatienten besteht kein antiinflammatorisches Zytokinmilieu...	90
5.4 Die Zytokinproduktion natürlicher Killerzellen ist trotz verändertem Oberflächenphänotyp erhalten	91
5.5 Zusammenfassung der Ergebnisse, Studiengrenzen und Ausblick.....	93
6 Literaturverzeichnis.....	96
7 Supplementäre Daten	107
7.1 Deskriptive Kohortenstatistik zu Oberflächenphänotypisierung, T- Zell- Effektor-Funktion und Zytokinmessungen	107
8 Eidesstattliche Versicherung	112
9 Danksagung	113

Abkürzungsverzeichnis

APZ	Antigenpräsentierende Zellen	mHLA- DR	Humanes Leukozytenantigen DR
BFA	Brefeldin A	NCM	Non- klassische Monozyten
BZR	B- Zell- Rezeptor	NEV	Nierenersatzverfahren
CARS	compensatory antiinflammatory response syndrome	NLRs	Nod- like receptors
CCI	Carlson Comorbidity Index	PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
CCL	Chemokine ligand	PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
CD	Cluster of differentiation	PD	Programmed Death
CM	Klassische Monozyten	PD-L	Programmed Death- Ligand
CNI	Chronische Niereninsuffizienz, Chronische Niereninsuffizienz	PRRs	Pattern recognition receptors
CTLA	cytotoxic T- lymphocyte antigen	ROS	reaktive Sauerstoffspezies
DAMPs	damage/danger associated molecular patterns	SIPS	stress induced premature senescence
ERSD	end-stage renal disease	SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
GFR	glomeruläre Filtrationsrate	T- emra	terminally differentiated T- memory cell
HD	Hämodialyse	TCE	T- Cell Exhaustio
IL	Interleukin	T-cm	T- central memory cell
IM	intermediäre Monozyten	T-em	T- effector memory cell
Inf	Interferon	Th- Zelle	CD4 ⁺ T- Helferzelle
KIRs	Killer- cell immunoglobulin-like receptors	Th0	Naive CD4 ⁺ T- Helferzellen
LPS	Lipopolysaccharide	TIM	T cell immunoglobulin mucin
MCP	Monocyte chemoattractant protein	Tk- Zellen	CD8 ⁺ T- Killerzellen
MHC	major histocompatibility complex	TLRs	Toll- like receptors
		TNF	Tumornekrosefaktor
		Tregs	Regulatorische T- Zellen
		TZR	T- Zell- Rezeptor

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Laborgerätschaften	23
Tabelle 2: Einwegmaterialien.....	24
Tabelle 3: Chemikalien, Reagenzien, Medium	24
Tabelle 4: Antikörper, Beads	25
Tabelle 5: Deskriptive Statistik der Studienpopulation.....	43
Tabelle 6: Deskriptive Kohortenstatistik T- Zell- Oberflächenphänotyp	107
Tabelle 7: Deskriptive Statistik Monozyten und NK- Zellen Oberflächenphänotyp....	108
Tabelle 8: Deskriptive Statistik T- Zell- Effektorfunktion.....	109
Tabelle 9: Deskriptive Statistik zu Analysen innerhalb der HD- Gruppe	110
Tabelle 10: Deskriptive Statistik zu Zytokinmessungen.....	111

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Epidemiologische Verteilung der terminalen Niereninsuffizienz.....	3
Abbildung 2: T- Gedächtniszell- Alterung.....	10
Abbildung 3: Prinzip der Antigenpräsentation.....	12
Abbildung 4: Prinzip der Durchflusszytometrie.	29
Abbildung 5: Gating- Strategie für Oberflächenphänotyp der T- Zellen.....	32
Abbildung 6: Gating- Strategie für Monozyten	33
Abbildung 7: Gating- Strategie für NK- Zellen	34
Abbildung 8: Gating- Strategie für MDSCs.....	35
Abbildung 9: Prinzip des Bead Array	36
Abbildung 10: Gating- Strategie für intrazelluläre Zytokinfärbung	39
Abbildung 11: Merkmale von Monozyten Aktivierung.....	45
Abbildung 12: Expression der für die Antigenpräsentation notwendigen Rezeptoren ...	47
Abbildung 13: Marker der Immunparalyse auf Monozyten.....	49
Abbildung 14: Pro- inflammatorische Biomarker.....	51
Abbildung 15: Korrelation von Markern der Immunparalyse auf Monozyten mit Markern der Inflammation	53
Abbildung 16: Distribution der T- Gedächtniszellen.....	55
Abbildung 17: Korezeptorprofil von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen gesunder Probanden ...	57
Abbildung 18: T- Zellen zeigen Zeichen von früher und später Aktivierung.....	59
Abbildung 19: CD28- negative T- Zellen	61
Abbildung 20: Korrelation von CD28- Verlust auf CD4 ⁺ T. Helferzellen mit Markern der Inflammation	63
Abbildung 21: Marker der Immunparalyse auf CD4 ⁺ T- Helferzellen	65
Abbildung 22: Marker der Immunparalyse auf CD8 ⁺ T- Killerzellen	66
Abbildung 23: Korrelationen zwischen T- Zell- Erschöpfungsmarkern und Aktivierungsmarkern auf CD4 ⁺ T- Helferzellen	69
Abbildung 24: T- Zell- typische Zytokine IL-2 und IFN- γ	71
Abbildung 25: Interferon- γ - Antwort von CD4 ⁺ T- Helferzellen.....	73

Abbildung 26: Zytokinproduktion nach T- Zell Stimulation	75
Abbildung 27: TNF- α - Produktion stimulierter T- Zellen	77
Abbildung 28: Serumkonzentration von Interleukin- 10 und -4	79

1 Kurzfassung

Weltweit sind über 7 Millionen Menschen von der terminalen Niereninsuffizienz betroffen und abhängig von einem Nierenersatzverfahren (NEV) wie der Hämodialyse (HD) (Hill et al., 2016). Nach kardiovaskulären Ereignissen ist der Tod durch Infektion die zweithäufigste Todesursache bei HD- Patienten (Saran et al., 2018). Zwar sind in den vergangenen Jahrzehnten unterschiedliche Defekte des Immunsystems bei HD- Patienten beschrieben worden, eine sicher kausale Ursache konnte bisher aber nicht identifiziert werden (Kato et al., 2008).

Bei HD- Patienten besteht eine chronische Inflammation, die multifaktoriell bedingt ist und einen der Haupt- Risikofaktoren für das erhöhte kardiovaskuläre Risiko darstellt (Hasuike et al., 2009). Ob die chronische Inflammation eine Rolle in der Immundefizienz einnimmt, ist noch nicht untersucht worden.

Die Immunparalyse, ein Zusammenspiel verschiedener immunologischer Phänomene, die im Rahmen von akut- und chronisch- entzündlichen Erkrankungen wie der Sepsis (Hamers, Kox, & Pickkers, 2015) oder der Hepatitis B (Ye et al., 2015) auftreten, stellt eine theoretische Verbindung zwischen Inflammation und Immundefizienz her. Ziel dieser Studie war es, den Immunphänotyp der Immunparalyse im Kollektiv der HD- Patienten zu charakterisieren und damit eine mögliche Ursache der Immundefizienz zu identifizieren.

Zur Untersuchung des Immunphänotyps wurden *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) und Patientenserum durchflusszytometrisch auf Marker der Immunparalyse wie PD-1, Tim-3, HLA- DR, IL-10 und andere untersucht. Zudem führten wir *ex vivo* eine Stimulation von T- und NK- Zellen durch, um ihre Effektorfunktionen zu untersuchen.

Die Untersuchungen zu Monozyten, T- Zellen und dem Zytokinmilieu ergaben, dass klassische Merkmale der Immunparalyse bei HD- Patienten, wie der Verminderung von MHC- II- Molekülen auf Monozyten, der Koexpression mehrerer Exhaustion- Marker auf T- Zellen und erhöhter IL-10 Konzentration im Serum, nicht vorlagen. Dennoch konnten wir eine erhöhte Frequenz von PD1+ T- Zellen und Monozyten beobachten, deren klinische Relevanz bei HD- Patienten jedoch offenbleibt. Insgesamt weisen T-Zellen beim Dialysepatienten einen Rezeptorphänotyp auf, der sie anfällig gegenüber Anergie macht.

Zusammenfassend lassen unsere Ergebnisse vermuten, dass die Immundefizienz bei HD- Patienten nicht durch die Immunparalyse erklärt werden kann, wenngleich Teilaspekte der Immunparalyse im HD- Kollektiv nachweisbar sind.

2 Einleitung und Zielsetzung

2.1 Die chronische Niereninsuffizienz und der Dialysepatient

2.1.1 Allgemeines zur chronischen Niereninsuffizienz

Die Niere hat physiologisch 3 übergeordnete Funktionen: 1) Regulation des Säure- Basen-, Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushalts, 2) Ausscheidung von harnpflichtigen Substanzen und 3) die Synthese von Hormonen wie Calcitriol, Renin und Erythropoetin. Dementsprechend kann man ihre Aufgaben in exkretorische (1 und 2) und inkretorische (3) Funktionen unterteilen.

Eine irreversible Abnahme der exkretorischen und/oder inkretorischen Funktion der Niere über mindestens 3 Monate wird als chronische Niereninsuffizienz (CNI) bezeichnet. Sie kann nach unterschiedlichen Gesichtspunkten in mehrere Stadien eingeteilt werden. Die international gängigste Einteilung nach der *National Kidney Foundation* teilt die CNI entlang der glomerulären Filtrationsrate (GFR) in 5 Stadien ein ("Chapter 1: Definition and classification of CKD," 2013).

Im letzten Stadium, dem Nierenversagen bzw. der terminalen Niereninsuffizienz (Englisch end-stage renal disease, ESRD), hat die Niere irreversibel ihre inkretorische und/oder exkretorische Funktion zu großen Teilen verloren. Um ein Überleben überhaupt zu ermöglichen besteht bei diesen Patienten der Bedarf eines NEV als temporäre Substitution bis zur Möglichkeit einer Nierentransplantation. Aufgrund der niedrigen Verfügbarkeit von Organtransplantaten stellt die HD als eine Form des NEV das gängigste Therapieverfahren für Patienten mit ESRD dar (Kramer et al., 2018).

2.1.2 Epidemiologie

Zu einer CNI und damit ESRD können neben dem fortgeschrittenen Alter eine Vielzahl an Grunderkrankungen führen, wobei in den westlichen Industrienationen die häufigsten Ursachen Diabetes mellitus Typ 2 und die arterielle Hypertonie sind (Hill et al., 2016). Aufgrund den steigenden Inzidenzen dieser „Volkskrankheiten“ und der alternden Bevölkerung in den westlichen Ländern (und auch zunehmend in den Entwicklungsländern) steigt auch die Inzidenz der CNI in den letzten Jahren weltweit kontinuierlich an (Gansevoort et al., 2013). Damit einhergehend nimmt die Größe der Bevölkerungsgruppe, die auf ein NEV angewiesen ist, stetig zu. Inzwischen ist die CNI als ein globales Gesundheitsproblem anerkannt (Eckardt et al., 2013). Die globale Prävalenz der CNI (alle Stadien) lag im Jahr 2016 schätzungsweise bei 13,4% (Hill et al., 2016) und damit noch vor dem Diabetes mellitus (ca. 8,4%) (IDF, 2017).

Eine genauere Analyse zeigt, dass die globale Prävalenz der CNI in den Stadien 3- 4 ca. 8% und die ESRD ca. 0,1% beträgt (Hill et al., 2016). Bei der derzeitigen Weltbevölkerung sind damit möglicherweise über 7 Millionen Menschen weltweit von der ESRD betroffen. Aufgrund des Trends der letzten Jahre und der Tatsache, dass die CNI oftmals eine progrediente

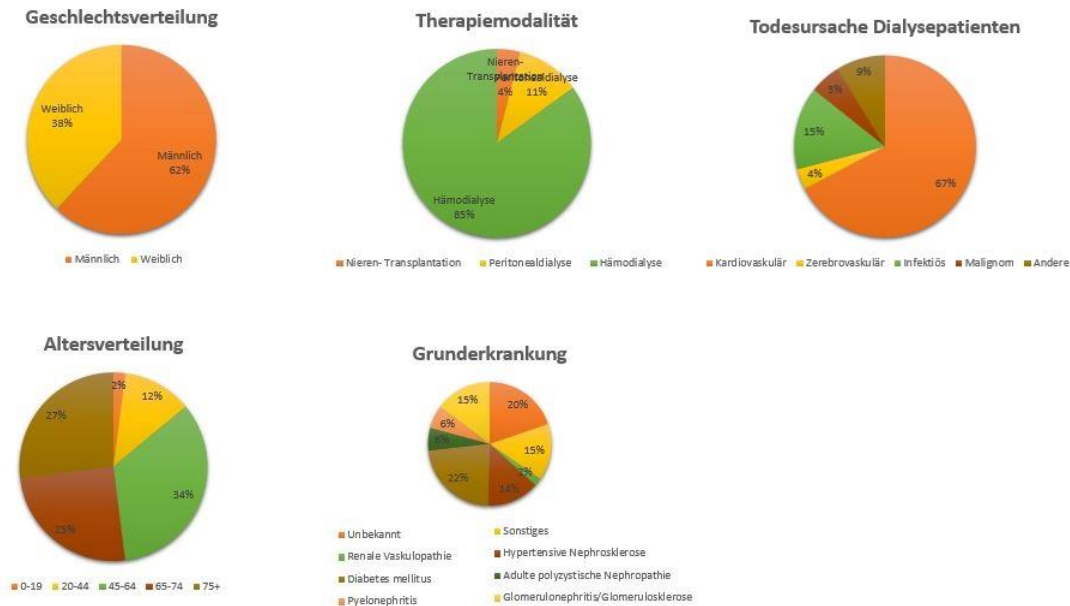


Abbildung 1: Epidemiologische Verteilung der terminalen Niereninsuffizienz in Europa nach Kramer et al., 2018 und Saran et. al., 2018

Erkrankung ist, darf man jedoch annehmen, dass auch diese Zahl in den kommenden Jahrzehnten größer werden wird. Abbildung 1 zeigt die epidemiologische Verteilung der ESRD in Europa (Kramer et al., 2018) sowie Ursachen für Mortalität bei Dialysepatienten (Saran et al., 2018).

2.1.3 Krankheitsverlauf

In den Frühstadien der CNI verläuft die Erkrankung zumeist unerkannt und verursacht erst in den fortgeschrittenen Stadien Symptome. Entsprechend der renalen Funktionen kann man die Insuffizienz in exkretorisch und inkretorisch einteilen.

Die exkretorische Insuffizienz bezeichnet die Retention harnpflichtiger Substanzen und Flüssigkeit. Folge der Retention von Harnstoff, Kreatinin und anderen Metaboliten sind urämische Symptome wie Pruritus, Enzephalopathie, Polyneuropathie und eine autonome Dysfunktion, die sich als Gastroenteropathie und kardiale Rhythmusstörungen manifestiert.

Zudem führt die verminderte Flüssigkeitsausscheidung zu einer Hypervolämie. Diese begünstigt das Entstehen von peripheren und zentralen Ödemen, im schlimmsten Falle kann es auch zu einem lebensbedrohlichen Lungenödem kommen. In fortgeschrittenen Stadien verursacht die CNI auch Verschiebungen des Säure- Base- und des Elektrolythaushalts. Insbesondere Kaliumerhöhungen und metabolische Azidosen können dabei gefährlich werden. Durch die inkretorische Insuffizienz kommt es weiterhin zu einem Mangel an Calcitriol und damit Vitamin D3. Der daraus resultierende Kalziummangel kann sekundär einen Hyperparathyreoidismus bedingen, eine häufige Begleiterkrankung der CNI. Eine verminderte Synthese von Erythropoetin führt weiterhin zur renalen Anämie (Herold, 2018).

Diese und viele andere Störungen haben weitreichende systemische Konsequenzen, die zu der Komplikationsträchtigkeit der CNI beitragen. Dabei steigt die Mortalität mit der Progression der CNI deutlich an (Tonelli et al., 2006). Bei der ESRD beträgt trotz verbesserter Therapiemöglichkeiten die jährliche Gesamtmortalität 20% (Nissenson, 2014).

Vaskuläre Degeneration aufgrund von alteriertem Mineralmetabolismus und chronischer Inflammation sowie kardiale Funktionseinschränkungen erhöhen das kardiovaskuläre Risiko erheblich. Dementsprechend ist ein kardiovaskuläres Ereignis die häufigste Todesursache bei Patienten mit CNI (Go , Chertow , Fan , McCulloch , & Hsu 2004).

Zweithäufigste Todesursache und Gegenstand dieser Arbeit ist der Tod aufgrund von Infektion (Saran et al., 2018). Mechanismen, die zu dieser Infektanfälligkeit führen, sind äußerst heterogen und nur bruchstückhaft verstanden (Kato et al., 2008). Das abnorme Immunsystem bei der CNI bzw. bei HD- Patienten wird in Abschnitt 2.2 behandelt.

2.1.4 Prinzip der Hämodialyse

Die HD stellt die häufigste Therapiemodalität der ESRD dar. Weitere Möglichkeiten sind die Peritonealdialyse sowie die Nierentransplantation (zur Verteilung siehe Abbildung 1).

Die HD ist ein extrakorporales Organersatzverfahren, bei der die exkretorischen Funktionen der Niere durch eine Maschine ersetzt werden. Prinzipiell wird das Blut dabei über einen Vorhofkatheter oder über einen arterio-venösen Shunt aus dem Körper abgeleitet, gereinigt und anschließend wieder zugeführt. Die HD funktioniert hierbei über das Diffusionsprinzip über eine semi- permeable Membran.

Extrakorporal wird das Blut in einem so genannten Dialysator an einer semi- permeablen Filtermembran vorbeigeleitet. Auf der anderen Seite der Filtermembran befindet sich das Dialysat, eine Flüssigkeit, die die angestrebte Elektrolytkonzentration enthält sowie frei von harnpflichtigen Substanzen ist. Elektrolyte und die harnpflichtigen Substanzen diffundieren

nun entlang ihres Konzentrationsgradienten aus dem Blut durch die Membran, sodass sich die Konzentration der zu eliminierenden Substanzen gegen Ende des Membrankontaktes dem des Dialysats angleicht. Durch einen transmembranen Druckgradienten ist es zudem aufgrund moderner Filterbeschaffenheiten möglich, das Blut mit Dialysat zu umströmen und hiermit eine zusätzliche konvektive Metabolitenclearance zu erreichen. Dieses Verfahren wird als Hämodiafiltration bezeichnet. (Hamilton, 2011).

Ein typisches Regime für eine HD ist eine 3-malige Dialyse pro Woche à 4 Stunden, variiert aber nach Körpergewicht und verbliebener Nierenfunktion.

2.2 Veränderungen des Immunsystems bei der terminalen Niereninsuffizienz

Bei der CNI kommt es zu deutlichen Veränderungen des Immunsystems, die mit Progression der CNI zunehmen. Zum einen kommt es bei nahezu 50% dieser Patienten zu einem Zustand der chronischen systemischen Inflammation aufgrund einer dauerhaften Aktivierung ihres Immunsystems (Jofré, Rodriguez-Benitez, López-Gómez, & Pérez-Garcia, 2006). Zum anderen präsentieren Patienten mit CNI jedoch gleichzeitig Zeichen einer Immundefizienz, deren Ursache bisher weitestgehend unbekannt ist.

Bisher wurden bei der CNI diese beiden immunologischen Phänomene als voneinander unabhängig betrachtet. Ob ein kausaler Zusammenhang besteht, ist derzeit nicht erforscht.

Wie genau sehen aber die chronische Inflammation und die Immundefizienz bei CNI- Patienten aus?

2.2.1 Chronische Inflammation

Chronische Inflammation ist ein wichtiger Risikofaktor bei ESRD- Patienten und nimmt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Komplikationen der ESRD ein. Marker für Inflammation wie das Interleukin (IL)-6 (Hasuike et al., 2009) oder das kürzlich untersuchte Chitinase like protein (YKL)- 40 (Lorenz et al., 2018; Nielsen et al., 2018) sind starke Prädiktoren für Gesamt- und kardiovaskuläre Mortalität.

Was genau ist aber Inflammation? Inflammation, also die Entzündungsreaktion, beschreibt die Reaktion des Organismus auf mikrobielle Pathogene oder Gewebeschaden. Übergeordnetes Ziel der Entzündung ist dabei die Bekämpfung des Pathogen und die Gewebeheilung.

Eine Entzündung kann sowohl infektiös als auch nicht- infektiös ausgelöst werden. Stark vereinfacht dargestellt läuft eine Entzündung folgendermaßen ab: „Pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs) wie Lipopolysaccharide (LPS) und „damage/danger associated molecular patterns“ (DAMPs) wie ATP (Adenosintriphosphat) oder andere intrazellulär vorkommende Moleküle, die bei Zelluntergang in großen Mengen freigesetzt werden, können von „Pattern- recognition receptors“ (PRRs) auf Immunzellen erkannt werden. Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt zur Initiierung der Entzündungskaskade. Klassische Vertreter der PRRs sind „Toll- like receptors“ (TLRs) auf Zelloberflächen und „Nod- like receptors“ (NLRs) im Zellinneren. Die Aktivierung der Immunzellen veranlasst diese, Zytokine auszuschütten um die Entzündungsreaktion zu verstärken und vorwärts zu treiben. Durch die freigesetzten Zytokine werden, unter anderem, weitere Immunzellen angelockt und aktiviert, die Perfusion verstärkt

und die Gerinnung aktiviert. Verschiedene Mechanismen führen nun dazu, dass der Organismus die Pathogene sowie beschädigte oder infizierte Zellen abtöten kann und anschließend wieder ausheilt (Takeda & Akira, 2015).

Bei massiver, dysregulierter oder langanhaltender Entzündung kann es jedoch zu „Kollateralschaden“ kommen: Unnötiger Gewebeschaden, Gewebeumbau und Alterationen des Immunsystems sind nur einige von vielen schädlichen Beispielen, die eine inadäquate Entzündungsreaktion verursachen kann (Baue, Durham, & Faist, 1998; Libby, Ridker, & Maseri, 2002; Ye et al., 2015).

2.2.1.1 Auslösende Faktoren der chronischen Inflammation

Die Genese der chronischen Inflammation bei der ESRD ist multifaktoriell. Folgend werden die wichtigsten Pathomechanismen nur schemenhaft erläutert, da sie nicht expliziter Gegenstand der in dieser Arbeit gesetzten Fragestellung sind. Als Auslöser der Inflammation werden vor allem oxidativer Stress, eine gestörte innere als auch äußere Barrierefunktion, die abnehmende Clearance von inflammatorischen Molekülen und Bioinkompatibilität von Fremdmaterial diskutiert.

Oxidativer Stress aktiviert durch die vermehrte Präsenz von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) das Immunsystem sowohl direkt als auch indirekt: ROS aktivieren zum einen direkt den für proinflammatorische Zytokine kodierenden Transkriptionsfaktor NF- κ B (Morgan & Liu, 2011) zum anderen können durch ROS oxidierte Endprodukte wie oxidiertes LDL Monozyten über den Scavenger Rezeptor aktivieren (van Tits et al., 2011).

Weiterhin kommt es bei HD- Patienten aufgrund von Hypervolämie zu Darmwandödemen, was wiederum zu einer geschwächten intestinalen Barriere führt und somit die Translokation von Bakterien und Bakterienbestandteilen in die Blutbahn begünstigt (Anders, Andersen, & Stecher, 2013). Dieser Prozess wird als „leaky gut“ bezeichnet. Translozierte Bakterienbestandteile wie LPS können bei HD- Patienten vermehrt nachgewiesen werden (McIntyre et al., 2011). Auch kommt es im Rahmen der Shuntpunktion für die Durchführung der Dialyse zur regelmäßigen Unterbrechung der Hautbarriere und damit häufig zu einer Infektion mit Aktivierung des Immunsystems (Nassar & Ayus, 2001).

Aggraviert werden diese Prozesse durch eine verminderte Clearance inflammatorischer Moleküle, da auch Zytokine oder Endotoxine in die Kategorie filtrierbarer Moleküle fallen. Kann die Niere diese Substanzen nicht eliminieren, ist eine unphysiologisch verlängerte Entzündung die Folge (Panichi et al., 2002; Pecoits-Filho et al., 2003).

Auch die HD selber führt zu einer Inflammation. Die Blut- Membran- Interaktion führt zu einer Aktivierung von zirkulierenden Immunzellen mit konsekutiver Erhöhung von inflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor (TNF)- α , IL-1, IL-6 und IL-8 (Rysz et al., 2006) sowie wie bereits erwähnt die Freisetzung von ROS (Himmelfarb, Lazarus, & Hakim, 1991). Der Kontakt zwischen Blut und bioinkompatiblen Material, wie die früher herkömmlich verwendeten unmodifizierten Cellulose- Membranen, führte zur Aktivierung des Komplement-Systems, Immunzellen sowie Thrombozyten (Chollet-Martin, Stamatakis, Bailly, Mery, & Gougerot-Pocidalo, 1991; Nicole Haeffner-Cavaillon et al., 1989; N. Haeffner-Cavaillon, Cavaillon, Laude, & Kazatchkine, 1987; Hakim, 1993). Zwar werden heute moderne Polysulfon- Membranen mit höherer Biokompatibilität verwendet, dennoch kommt es beim Kontakt noch immer zu einer Aktivierung von Immunzellen (Koga et al., 2018).

2.2.2 Immundysfunktion bei terminaler Niereninsuffizienz

Bei der ESRD besteht jedoch nicht nur eine chronische Inflammation, sondern gleichzeitig auch eine Immundefizienz. Ausdruck dessen ist der hohe Anteil des Todes aufgrund von Infektionen an der Gesamtmortalität. Je nach Quelle beträgt dieser zwischen 15 und 21% (Allon et al., 2003; Saran et al., 2018).

Die HD scheint die Immunschwäche zu aggravieren. So haben HD- Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung ein 14- bis 16- faches Risiko, an einer Pneumonie zu versterben, während bei Nierentransplantierten trotz medikamentöser Immunsuppression das Risiko nur 2- fach erhöht ist (M. J. Sarnak & Jaber, 2001). Bei der Sepsis zeigt sich die Infektanfälligkeit noch gravierender: HD- Patienten haben ein 200- fach erhöhtes Risiko, Nierentransplantierte hingegen ein nur 20- faches Risiko daran zu versterben (Mark J. Sarnak & Jaber). Auch im Vergleich mit CNI Patienten ohne NEV haben HD- Patienten ein erhöhtes Infektionsrisiko: Im Vergleich zur Normalbevölkerung erkrankten CNI- Patienten 3-mal so häufig an einer Pneumonie, HD- Patienten hingegen 5- mal so häufig. Selbiges trifft auch für die Sepsis zu: während CNI- Patienten 4-mal so häufig an einer Sepsis erkrankten wie die Normalbevölkerung, tun HD- Patienten dies 10- mal so häufig (Naqvi & Collins, 2006).

Ebenso zeigen ESRD- Patienten deutlich schlechtere Immunisierungsraten nach Impfungen, wie zum Beispiel gegen Hepatitis B (Cordova et al., 2017; Grzegorzewska, 2012; Stevens et al., 1984). Auch die Prävalenz von Tumorerkrankungen ist unter ESRD- Patienten außergewöhnlich hoch (Maisonneuve et al., 1999; Wong et al., 2009).

Die Gründe dafür sind vielfältig. Die regelmäßige Unterbrechung der Hautbarriere zur HD- Durchführung erhöhen das Risiko, an einer Infektion zu erkranken. Dass jedoch über 70% der

Infektionen bei HD- Patienten nicht mit einem Gefäßzugang assoziiert sind, unterstreicht die Bedeutung der Immundefizienz für das Infektionsrisiko (Allon et al., 2003). Diese Störung umfasst sowohl den angeborenen als auch adaptiven Arm des Immunsystems.

2.2.2.1 Das adaptive Immunsystem

Klinischer Ausdruck der Einschränkung des adaptiven Immunsystems sind beispielsweise die schlechten Immunisierungsraten nach Impfungen gegen Hepatitis B, Influenza (Mastalerz-Migas, Steciwko, & Brydak, 2013) Clostridium tetani (Girndt, Pietsch, & Kohler, 1995) und Corynebacterium diphtheriae (Kreft, Klouche, Kreft, Kirchner, & Sack, 1997).

Für eine erfolgreiche Immunisierung ist eine funktionierende Antigenpräsentation und -Erkennung sowie die anschließende Ausbildung von Gedächtniszellen vonnöten. An diesem Prozess sind die T- und B- Lymphozyten beteiligt. B- Lymphozyten können spezifisch ein Pathogen auf ihrem B- Zell- Rezeptor (BZR) binden und anschließend in ihr Inneres aufnehmen. Dort wird es in Peptidfragmente lysiert und schließlich als Antigen gemeinsam mit ihrem *major histocompatibility complex* (MHC)- II Molekül auf ihrer Oberfläche präsentiert. Dieses kann von einer aktivierten CD (engl.: *cluster of differentiation*) 4^+ T- Helferzellen (Th-Zelle) mit einem ebenso spezifischen T- Zell- Rezeptor (TZR) erkannt werden. Diese Interaktion bewirkt, dass sich der B- Lymphozyt in eine Plasmazelle differenziert, klonal expandiert und damit beginnt, Antikörper zu produzieren, die ihrem BZR entsprechen. Während dieses Prozesses entstehen auch Gedächtniszellen der T- und B- Lymphozyten, die eine deutlich längere Lebensspanne besitzen und im Falle einer erneuten Infektion mit demselben Pathogen schneller und effektiver reagieren.

2.2.2.1.1 T- Lymphozyten

Störungen hinsichtlich der B- Lymphozyten sind bereits vielfach beschrieben, werden hier aber nicht näher ausgeführt da sie nicht Gegenstand dieser Arbeit sind.

T- Lymphozyten sind zentraler Bestandteil der adaptiven Immunantwort. Unterschieden werden $CD4^+$ T- Helferzellen, $CD8^+$ T- Killerzellen (Tk- Zellen) und regulatorische T- Zellen (Tregs). Th- Zellen können weiter in drei funktionell distinkte Subtypen unterteilt werden, die Th1-, Th2- und Th17- Zellen. Nur Th1- und Th2- Zellen sind Gegenstand dieser Arbeit.

Zudem sind die Ausbildung und Unterhaltung des immunologischen Gedächtnisses eine wichtige Aufgabe des T- Zell- Kompartiments. Einmal ausgebildet können die langlebigen T- Gedächtniszellen auf neuerliche Infektionen desselben Antigens deutlich schneller reagieren. Bei jeder Aktivierung kommt es zur klonalen Expansion mit Ausbildung „neuer“

Gedächtniszellen, die jedoch zunehmend weniger potent sind als ihre Vorläufer. Rezidivierende Exposition der T- Zellen zum gleichen Antigen führt deshalb zur Expansion von Gedächtniszellpopulationen älterer Zell- Linien mit eingeschränkter Funktion (Farber, Yudanin, & Restifo, 2014) (Abb. 2). Es werden anhand ihrer unterschiedlichen Expression von CD45RO und CCR7 naive (T- naive), central memory (T- cm), effector memory (T- em) und terminal differenzierte (T- emra) T- Gedächtniszellen unterschieden (Boots et al., 2013)

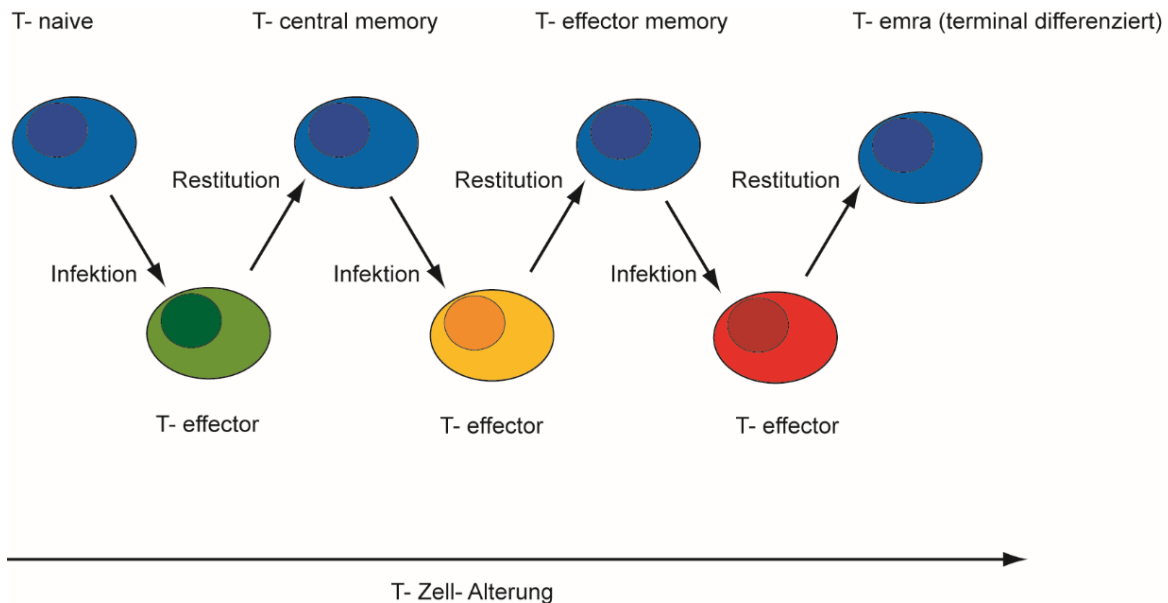


Abbildung 2: T- Gedächtniszell- Alterung: Erneuter Kontakt einer Gedächtniszelle mit einem Antigen führt zur klonalen Expansion. Nach Abklingen der Infektion verbleibt ein Teil der Klone als Gedächtniszellen, die im Vergleich zu ihren Vorgängern jedoch hinsichtlich ihrer Funktionalität eingeschränkt sind

Th- Zellen zeigen bei HD- Patienten einen veränderten Phänotyp. Zum einen kommt es zu einer Veränderung des Verhältnisses zwischen Th1- und Th2- Zellen. Diese Polarisation unterläuft in der Progression der CNI dabei einem Wandel. Während CNI- Patienten ohne HD- Therapie eine Polarisation in Richtung der Th2- Subtypen zeigen (Alvarez-Lara et al., 2004), ändert sich diese unter HD- Therapie in Richtung der Th1- Zellen (Mansouri, Nopp, Jacobson, Hylander, & Lundahl, 2017; Nitta et al., 2002; Sester et al., 2000). Mögliche Ursache ist hierbei die vermehrte monozytäre Produktion von IL-12 unter HD- Therapie, welches die Differenzierung von naiven Th- Zellen (Th0) zu Th1- Zellen fördert (Sester et al., 2000).

Gleichzeitig kommt es zu einer Verminderung der absoluten Zellzahl der T- Lymphozyten. Sowohl Th- als auch Tk- Zellen sind davon betroffen (Costa et al., 2008). Es sind nicht nur ihre naiven sondern auch ihre Gedächtniszell- Populationen vermindert (Yoon, Gollapudi, Pahl, &

Vaziri, 2006). Weiterhin zeigen Th- Zellen von HD- Patienten eine verminderte Proliferationsrate nach Aktivierung (Lisowska et al., 2012) und es besteht eine verminderte Freisetzung naiver T- Lymphozyten aus dem Thymus (Betjes, Langerak, van der Spek, de Wit, & Litjens, 2011). Folglich sind die Kompensationsmöglichkeiten der HD- Patienten auf eine T- Lymphozytopenie eingeschränkt.

T- Lymphozyten bei HD- Patienten zeigen jedoch auch Zeichen einer dauerhaften Aktivierung und tragen damit zur chronischen Inflammation bei (Costa et al., 2008; Friedrich, Janessa, Schmieder, Risler, & Alexander, 2008). Diese beginnt bereits in früheren Stadien der CNI und nimmt mit der Progression der Erkrankung zu (Litjens, van Druningen, & Betjes, 2006).

Diese prä-aktivierten T- Lymphozyten sind hinsichtlich ihrer Zytokinproduktion nach *ex-vivo* Stimulation jedoch schwächer. So produzieren sie weniger IL- 2 und Interferon (Inf)- γ (Gerez et al., 1991; Kurz, Kohler, Meuer, Hutteroth, & Meyer zum Buschenfelde, 1986). IL-2 wird von aktivierten T- Lymphozyten produziert und von ihnen selber gebunden. Es induziert in ihnen die Reifung von naiven T- Lymphozyten in T- Effektorzellen, ihre klonale Expansion und die Freisetzung weiterer Zytokine (Gaffen & Liu, 2004). Inf- γ ist hingegen wichtig zur Abtötung intrazellulärer Erreger und virusinfizierter Zellen (Newport et al., 1996). Damit übereinstimmend ist das Risiko für eine Infektion mit dem *Mycobacterium tuberculosis*, einem intrazellulären Erreger, für HD- Patienten außergewöhnlich hoch (Chia, Karim, Elwood, & FitzGerald, 1998).

Worauf diese verminderte Sekretion von IL-2 zurückzuführen ist, ist noch nicht abschließend geklärt. Für die IL-2 Synthese der T- Lymphozyten ist eine Aktivierung ihres Korezeptors CD28 vonnöten. Lisowska et al. zeigten, dass CD28 auf T- Lymphozyten von HD- Patienten vermindert exprimiert wird (Lisowska et al., 2010).

T- Lymphozyten benötigen jedoch für ihre initiale Aktivierung die Hilfe anderer Zellen, nämlich der sogenannten antigenpräsentierenden Zellen (APZ).

2.2.2.1.2 Antigenpräsentierende Zellen

Zu den APZ werden neben Monozyten auch ihre Abkommen, die Makrophagen, sowie ein Teil der dendritischen Zellen gezählt. Die Interaktion zwischen T- Lymphozyten und APZ wird als die eigentliche Antigenpräsentation bezeichnet.

APZ sind, wie B- Lymphozyten, dazu in der Lage, Antigene aufzunehmen, in ihrem Inneren zu prozessieren und sie auf ihrer Oberfläche gemeinsam mit ihrem MHC-II- Molekül zu präsentieren. Die Aufnahme und Prozessierung läuft im infizierten Gewebe oder in der Blutbahn ab, woraufhin die APZ zu den sekundären lymphatischen Organen wandern und ihr

Antigen dort den Lymphozyten präsentieren. Ein Lymphozyt mit spezifisch passendem TZR wird dadurch aktiviert, es kommt zur klonalen Expansion und zum Beginn der lymphozytären Immunantwort. Wie läuft nun diese wichtige Interaktion zwischen APZ und T- Lymphozyten ab?

Um eine reife naive Th- Zelle zu aktivieren, sind mindestens 2 Signale vonnöten: Signal 1 entsteht durch die Interaktion vom Antigen-MHC- II-Komplex auf der APZ mit dem TZR der Th- Zelle. Die Interaktion von Korezeptoren, die sich auf der Oberfläche beider Zellen befinden, vermittelt zudem Signal 2. Bleibt Signal 2 jedoch aus, wird die T- Zelle nach Interaktion zwischen TZR und MHC *anerg* und kann nicht mehr aktiviert werden (Murphy K, 2009). Ein drittes Signal über weitere Korezeptoren kann die T- Zell- Aktivität schließlich noch zusätzlich regulieren. Abbildung 3 zeigt diese komplexe Interaktion schematisch.

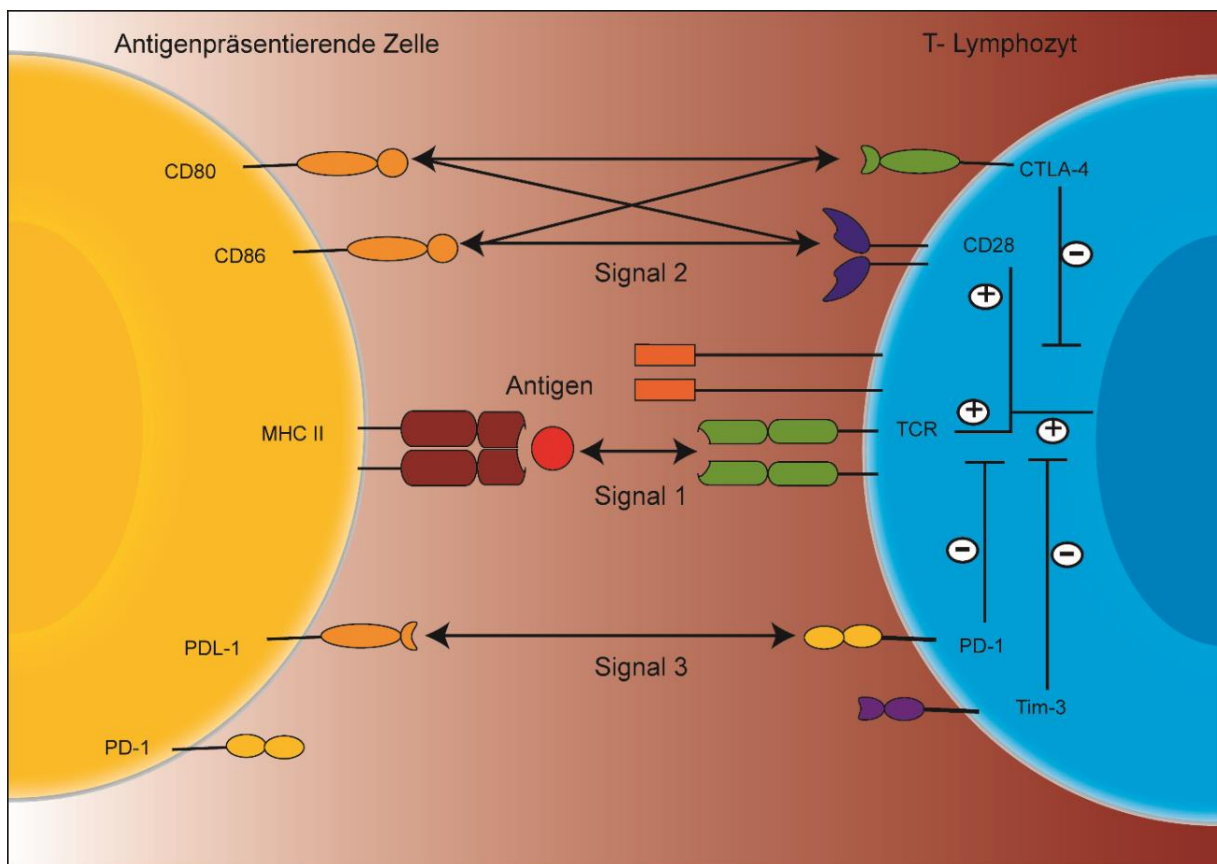


Abbildung 3: Prinzip der Antigenpräsentation: Die Antigenpräsentierende Zelle präsentiert über ihren major histocompatibility complex II ein prozessiertes Antigen. Dies kann von einem T- Zell- Rezeptor (TZR) einer naiven T- Zelle erkannt werden (Signal 1). Das für eine Aktivierung zusätzlich notwendige Signal 2 wird über die Interaktion von CD80 oder CD86 auf der APZ mit dem Kostimulator CD28 auf der T- Zelle vermittelt. Weitere Regulation kann durch Signal 3 erfolgen, beispielsweise über die Bindung von Programmed Death- Ligand (PDL)1 der APZ mit Programmed Death (PD)-1 auf der T- Zelle.

Folglich ist es möglich, dass die Dysfunktion der T- Lymphozyten auch auf eine Störung der APZ oder der Interaktion mit ihnen zurückzuführen ist. Insbesondere die Arbeitsgruppe um Matthias Girndt führte Studien durch, die diese Hypothese im Hintergrund der HD unterstützen.

So ließ sich *in-vitro* die T- Zell- Antwort auf Stimulation normalisieren, wenn das Blut von HD- Patienten mit APZ gesunder Probanden substituiert wurde (Girndt, Köhler, Schiedhelm-Weick, Meyer zum Büschenfelde, & Fleischer, 1993). Auch konnte gezeigt werden, dass Monozyten von HD- Patienten den für das Signal 2 notwendigen Kostimulator CD86 vermindert exprimieren (Girndt, Sester, Sester, Kaul, & Köhler, 2001).

Monozyten zeigen darüber hinaus aber noch weitere Veränderungen. Sie fungieren als APZ nicht nur als Teil der adaptiven Immunantwort, sondern sind auch wichtige Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, was die enge Vernetzung der beiden Arme gut veranschaulicht. Über ihre PRRs wie den TLRs oder den Scavenger- Rezeptoren können sie direkt von Pathogenen aktiviert werden. Sie sind zur Phagozytose befähigt und potente Produzenten von Zytokinen (Murphy K, 2009).

Die Monozytendysfunktion nimmt im abnormen Immunsystem der HD Patienten eine besondere Rolle ein. Sie sind zentrale Beteiligte in der chronischen Inflammation, da alle im Abschnitt 1.2.1. *Chronische Inflammation* besprochenen Pathomechanismen zu einer Aktivierung dieser Immunzellen führt. Ausdruck der chronischen Aktivierung ist unter anderem die vermehrte Expression von PRRs wie dem Scavenger- Rezeptoren (Ando, Lundkvist, Bergstrom, & Lindholm, 1996), TLR2 und TLR4 auf ihrer Oberfläche sowie *ex-vivo* eine verstärkte Antwort auf Stimulation (Gollapudi, Yoon, Gollapudi, Pahl, & Vaziri, 2010). Die Hochregulation der TLR4- Expression ist mit der HD assoziiert (Koc et al., 2011). Auch ist bei HD- Patienten die pro-inflammatorische CD14⁺/CD16⁺ Monozyten-Subpopulation vergrößert (Scherberich, Estner, & Segerer, 2004).

2.2.3 Zusammenhang der chronischen Inflammation und Immundefizienz

Zusammenfassend besteht also bei CNI- und insbesondere bei HD- Patienten gleichzeitig ein Zustand der chronischen Inflammation und Immunschwäche. Ob beide Phänomene kausal miteinander zusammenhängen ist noch nicht untersucht worden, wenngleich diese Hypothese in den vergangenen Jahren bereits vorgeschlagen wurde (Anders et al., 2013; Kurts, Panzer, Anders, & Rees, 2013).

Das gleichzeitige Bestehen von Inflammation und Infektneigung zeigt sich jedoch auch bei anderen Krankheiten. Die Sepsis (Boomer et al., 2011), chronisch- infektiöse Erkrankungen wie Hepatitis B (Ye et al., 2015) aber auch Tumorerkrankungen (Jiang, Li, & Zhu, 2015) sind ebenfalls durch gleichzeitige Inflammation und eine Neigung zu Infektionen gekennzeichnet. Bei all diesen Krankheiten kommt es zu einem immunologischen Phänomen, das als Immunparalyse bezeichnet wird.

Das Konzept der Immunparalyse vereinigt Inflammation und Immundefizienz miteinander.

2.3 Die Immunparalyse

2.3.1 Allgemeines zur Immunparalyse

Was genau ist aber die Immunparalyse? Der Begriff Immunparalyse beschreibt den Zustand eines, wie der Name bereits impliziert, gelähmten Immunsystems. Eine Lähmung setzt jedoch eine vorhergehende Verletzung voraus: im Falle der Immunparalyse ist dies eine Überbeanspruchung des Immunsystems durch eine starke oder lang andauernde systemische Entzündungsreaktion. Die Immunparalyse betrifft beide Arme des Immunsystems.

Sie führt zu einer erhöhten Empfänglichkeit für nosokomiale und opportunistische Infektionen (Boomer et al., 2011; Otto et al., 2011), der Reaktivierung von latenten viralen Infektionen (Limaye et al., 2008; Luyt et al., 2007) und dem Nichtvermögen, einen primären infektiösen Fokus zu beseitigen (Torgersen et al., 2009).

2.3.2 Das systemic inflammatory response syndrome

Die Immunparalyse tritt im Rahmen von mehreren Erkrankungen auf, häufig als Folge einer massiven Entzündungsreaktion. Dieser hyperinflammatorische Zustand entsteht zum Beispiel bei einer mikrobiellen Infektion oder einem ausgeprägten Gewebeschaden und wird als „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS) bezeichnet. Die häufigste Ursache für ein SIRS ist die bakterielle Infektion und wird in diesem Zusammenhang als Sepsis bezeichnet. Andere häufige Ursachen sind daneben Polytraumata, die Verbrennungskrankheit und die akute Pankreatitis (Bone et al., 1992).

Grundsätzlich kann man diesen hyperinflammatorischen Zustand als Dysregulation einer lokalen Entzündung betrachten. Verliert eine Entzündung ihre lokale Begrenzung und greift auf den gesamten Organismus über so ist die Folge dramatisch: die Inflammation greift zusätzliche Organsysteme an mit der Folge von schweren Gerinnungsstörungen, Organversagen, Kreislaufdysregulation und sowohl akut als auch langfristigen Veränderungen des Immunsystems, wie zum Beispiel der Immunparalyse.

Zentrale Mediatoren in der Entzündungskaskade, sei sie infektiös oder steril ausgelöst, sind pro- inflammatorische Zytokine wie TNF- α oder das IL-1 β . Beide werden vor allem von aktivierten Monozyten bzw. Makrophagen sezerniert und sind somit Teil der initialen Entzündungsreaktion, der so genannten Akute- Phase- Reaktion. Sie aktivieren weitere Immunzellen und nehmen Einfluss auf Gefäßpermeabilität und die lokale Gerinnung und erleichtern somit den Ablauf der lokalen Immunantwort. (Murphy K, 2009). Gleichzeitig führt eine massive TNF- α Produktion zu Schock, disseminierter intravasaler Koagulopathie und

multiplen Organversagen (Tracey et al., 1986). Es konnte in Tierversuchen gezeigt werden, dass eine Immunisierung gegen TNF- α eine niedrigere Mortalität als ihre Vergleichsgruppe zur Folge hatte nachdem sie mit LPS infundiert wurden (Beutler, Milsark, & Cerami, 1985).

Dementsprechende Versuche, die Mortalität der Sepsis durch gezielte Antagonisierung dieser pro- inflammatorischen Zytokine zu senken zeigten jedoch bisher keinen Erfolg (Remick, 2003).

Vielmehr zeigte sich, dass nicht nur das Multiorganversagen und die Kreislaufdysregulation zur hohen Sterblichkeit beitragen (Angus & van der Poll, 2013; Rivers et al., 2001) sondern auch das häufige Auftreten von sekundären nosokomialen Infektionen in der Spätphase der Sepsis. Insgesamt verstirbt heutzutage mehr als die Hälfte der Sepsis- Patienten im späteren Verlauf der Erkrankung (Otto et al., 2011).

Damit übereinstimmend fanden *Boomer et al.* deutliche Zeichen von Immunsuppression bei an Sepsis verstorbenen Patienten: Immunzellen aus Lungen- und Milzgewebe zeigten signifikant schwächere Zytokinantworten auf *ex-vivo*- Stimulation und vermehrt inhibitorische Oberflächenrezeptoren wie PD-1 (Boomer et al., 2011).

Bone et al. etablierten bereits 1996 erstmals den Begriff des „compensatory antiinflammatory response syndrome“ (CARS) und legte damit den Grundstein für die Theorie der Immunparalyse (Bone, Grodzin, & Balk, 1997). Wie der Name bereits impliziert ist das CARS ein Zusammenspiel verschiedener, antiinflammatorischer Prozesse, die physiologisch eine überschießende Inflammation verhindern bzw. regulieren sollen. Wie das SIRS kann es jedoch auch zu einer Dysregulation des CARS kommen, in der die enthemmten antiinflammatorischen Prozesse zu einer Immunschwäche führen.

2.3.3 Der Immunphänotyp der Immunparalyse

Die Immunparalyse entsteht aus dem Zusammenspiel verschiedener immunologischer Phänomene, die alle Arme der Immunantwort treffen. Dabei sind diese Defekte eng miteinander verknüpft und gehen zum Teil ineinander über. Die Aufteilung in die folgenden 4 übergeordneten Mechanismen dient daher vor allem dem Verständnis der komplexen Vorgänge der Immunparalyse und spiegelt keine getrennten Abläufe der *in vivo* Immunreaktion wider.

2.3.3.1 Monocyte- reprogramming

Erstens, die Monozytendysfunktion. Die maßgebliche Bedeutung von Monozyten und deren Abkömmlinge in der Entzündungsreaktion wurden bereits eingangs besprochen. Ihre Aufgabe liegt sowohl in der initialen Bekämpfung und damit Eindämmung von mikrobiellen

Schädlingen als auch in der Aktivierung der spezifischen adaptiven Immunantwort, deren Mobilisierung bei Erstkontakt mit einem Pathogen Zeit benötigt.

Monozyten sind in der Immunparalyse global in ihrer Kapazität eingeschränkt: Es kommt zu einer Veränderung ihres Oberflächenphänotyps und es verschiebt sich das Zytokinprofil, das von den Monozyten produziert wird, entscheidend. Dieser Vorgang, der nicht als Inaktivität verstanden werden sollte sondern vielmehr als eine funktionale Verschiebung, wird unter dem Begriff des *monocyte reprogramming* zusammengefasst (Cavaillon & Adib-Conquy, 2006).

Der am besten untersuchte Marker für die Immunparalyse ist die verminderte Expression des *humanen Leukozytenantigen DR* (mHLA- DR) auf Monozyten (Monneret et al., 2006). Es konnte mehrfach ein Zusammenhang zwischen verminderter mHLA- DR Expression mit Mortalität und nosokomialen Infektionen gezeigt werden (Lukaszewicz et al., 2009).

mHLA- DR wird zu der Gruppe der MHC- II Molekülen gezählt und dient somit der Übermittlung von Signal 1 der Antigenpräsentation. In der Immunparalyse kommt es jedoch zu Störungen auf allen Ebenen der Antigenpräsentation: Sowohl Signal 1 (mHLA- DR), Signal 2 (Verlust von CD86 (Wolk et al., 2007)) sowie Signal 3 (vermehrte Expression von PD-1 und seinem Liganden PDL-1 (Guignant et al., 2011)) sind im Rahmen der Immunparalyse beeinträchtigt.

Auch die monozytäre Zytokinantwort ist verändert: nach *ex-vivo* Stimulation mit LPS produzieren Monozyten von Sepsis- Patienten signifikant weniger TNF- α , IL-1 β und IL-6 (Munoz et al., 1991). Die monozytäre Synthese von anti- inflammatorisch wirksamen Zytokinen wie ILR α bleibt hingegen unverändert (Volk et al., 1996) oder beginnt sogar verfrüht, wie im Falle von IL- 10 (Randow et al., 1995). IL-10 hat in der Immunparalyse eine zentrale Rolle und wird im Abschnitt „Zytokindysbalance“ besprochen.

2.3.3.2 Lymphozytendysfunktion

Ein zweites wesentliches Phänomen in der Immunparalyse sind Veränderungen der lymphoiden Zellpopulationen. In der Immunparalyse kommt es sowohl zu quantitativen als auch zu funktionellen Veränderungen der lymphozytären Subpopulationen.

Leukopenie ist ein seit langem bekanntes Phänomen bei Patienten mit SIRS und Sepsis und wurde bereits 1991 in die SIRS- Kriterien aufgenommen (Bone et al., 1992). Eine persistierend niedrige Zahl an Lymphozyten ist ein Prädiktor für Mortalität und mit der Entwicklung für nosokomialen Infektionen assoziiert (Drewry et al., 2014).

Die Apoptose von Lymphozyten spielt außerdem eine wichtige Rolle für die Monozytendysfunktion: Monozyten und Makrophagen, die apoptotisches Zellmaterial über

ihre Scavenger- Rezeptoren phagozytieren, unterlaufen dem *monocyte reprogramming* und produzieren vermehrt anti- inflammatorische Zytokine und zeigen eine verminderte Fähigkeit, T- Zellen zu aktivieren (Barker, Erwig, Pearce, Devine, & Rees, 1999; Voll et al., 1997).

Ein weiteres, die T- Zellen betreffendes Phänomen in der Sepsis, ist die kutane Anergie. Anergie beschreibt einen „abgeschalteten“ Zustand eines T- Lymphozyten. Anergie T-Zellen sind nicht mehr dazu in der Lage, auf ein auf ihren TZR passendes Antigen zu reagieren. Klinisch äußert sich dies durch Ausbleiben einer allergischen Typ IV Haut- Reaktion nach intrakutaner Injektion von Allergenen, ein seit langem bekanntes und mit Mortalität und nosokomialen Infektionen assoziiertes Phänomen (Brown et al., 1982; Meakins et al., 1977).

Wie bereits erläutert tritt eine T- Zelle in einen anergen Zustand über, wenn sie über ihren TZR mit dem MHC- Molekül einer APZ interagiert, das kostimulatorische Signal 2 aber ausbleibt. Signal 2 wird während der Antigenpräsentation durch die Interaktion von CD80 und CD86 auf APZ mit CD28 auf T- Zellen vermittelt. Neben der bereits erwähnten eingeschränkten CD86 Expression auf Monozyten kommt es in der Sepsis auch zu einer verminderten Expression von CD28 auf T- Zellen (Boomer et al., 2011).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass T- Lymphozyten im Verlauf der Sepsis einen Oberflächenphänotyp exprimieren, der auch bei chronisch- infektiösen Erkrankungen wie Hepatitis B und -C, HIV (Boomer, Shuherk-Shaffer, Hotchkiss, & Green, 2012) sowie bei Tumorerkrankungen (Pauken & Wherry, 2015) auftritt. Dieser Phänotyp wird als „T- Cell Exhaustion“ (TCE) bezeichnet und spiegelt die lymphozytäre Regulation auf einen persistierenden Stimulus wider. *Spec et al.* zeigten kürzlich, dass T- Zellen in der durch *Candida albicans* verursachten Sepsis ebenfalls diesen Phänotyp exprimieren (Spec et al., 2016).

Auch hier besteht wiederum eine Dysregulation eines ursprünglich protektiven Mechanismus. Regulation der T- Zell- Aktivität ist wichtig, um überschießende Inflammation und vor allem Autoimmunität zu verhindern. Die Notwendigkeit von mehreren Signalen zur Aktivierung einer T- Zelle und die vielfältigen Modifikationsmöglichkeiten dieser Signale sind Ausdruck dessen. In der Sepsis und bei chronischen Infektionen schafft es der Organismus jedoch nicht, aufgrund der dauerhaften Stimulation die feinjustierte Balance zwischen Aktivierung und Abschaltung zu halten und kippt in die Unterdrückung der T- Zell- Aktivität. Diese „erschöpften“ T- Zellen verlieren sukzessive ihre Effektorfunktionen wie Zytokinproduktion, Zytotoxizität sowie Proliferationsfähigkeit, während im ausgeprägtesten Falle in ihnen sogar die Apoptose initiiert wird. Vermittelt wird dies durch die zum Teil bereits erwähnten Koinhibitoren PD-1, der auch auf Monozyten in der Sepsis exprimiert wird, sowie das „cytotoxic T- lymphocyte antigen“ (CTLA)4 und das „T cell immunoglobulin mucin“- (TIM)-3, die allesamt in der Vermittlung

von Signal 3 in der Antigenpräsentation eingebunden sind. Hierbei ist zu unterstreichen, dass diese Koinhibitoren bei jeder Aktivierung von T- Zellen exprimiert werden. Bei der TCE besteht die Expression dieser Rezeptoren jedoch dauerhaft und führt darüber zu einem Überwiegen der Inhibition. Vor allem die Dauer der Antigenpersistenz und das Fehlen von T-Helfer- Zell Signalen scheint diesen Zustand hervorzurufen (Yi, Cox, & Zajac, 2010).

2.3.3.3 Zytokindysbalance

Die dritte Säule der Immunparalyse, die eng mit den ersten beiden Mechanismen verknüpft ist, ist das aus dem Gleichgewicht geratene Zytokinmilieu. Die massive Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen während des SIRS, auch Zytokinsturm genannt, hat neben den gegebenenfalls tödlichen Konsequenzen des Multiorganversagens auch zur Folge, dass reaktiv ein ebenso starkes anti- inflammatorische Zytokinprofil synthetisiert wird (Calvano et al., 2005). Zum Teil induziert dabei die Ausschüttung von einem Zytokin direkt die Produktion des anderen, wie beispielshalber im Falle von TNF- α , das Monozyten dazu stimuliert, IL-10 zu produzieren (Platzer, Meisel, Vogt, Platzer, & Volk, 1995).

Für verschiedene anti- inflammatorische Zytokine konnten Zusammenhänge mit Mortalität gezeigt werden. Insbesondere für Serum IL-10 konnte dies mehrfach gezeigt werden (Friedman et al., 1997; Gogos, Drosou, Bassaris, & Skoutelis, 2000; Lehmann, Halstensen, Sornes, Rokke, & Waage, 1995). IL-10 ist ein 178 Aminosäuren- langes Homodimer, das aufgrund seiner zentralen Rolle in der Immunparalyse in den vorhergehenden Abschnitten bereits mehrfach erwähnt wurde.

Initial ging man davon aus, dass IL- 10 ausschließlich von Th2 Zellen produziert wird (Fiorentino, Bond, & Mosmann, 1989). Inzwischen ist aber klar, dass es aufgrund seiner Wichtigkeit von einer Vielzahl von Immunzellen synthetisiert wird. Neben Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen wird es auch von Tregs, Th2- Zellen und myeloischen Suppressorzellen produziert. Zu seinen Zielzellen gehören wiederum eine diverse Gruppe von Zelltypen, die sowohl der myeloischen als auch der lymphoiden Zellreihe zugehören. Vor allem inhibiert es aber die TLR- vermittelte Produktion von pro- inflammatorischen Zytokinen in den myeloischen Zellreihen (Saraiva & O'Garra, 2010).

Zur Ausschüttung von IL- 10 kann die Aktivierung einer heterogenen Gruppe von Rezeptoren beitragen. Dazu gehört der TNF- α - Rezeptor, aber auch TLR2, TLR4 und TLR9 lösen die Produktion von IL- 10 aus (Boonstra et al., 2006; Netea et al., 2004).

Interessanter weise wird die Synthese von IL-10 durch denselben Transkriptionsfaktor gesteuert wird wie viele pro- inflammatorische Zytokine, nämlich NF- κ B. Dies unterstreicht

seine regulatorische Funktion in der Natur. Bei einer Infektion wird über die Bindung von TLRs NF- κ B aktiviert, was initial die Synthese von pro- inflammatorischen Zytokinen bewirkt, die der Schädlingsbekämpfung dienen. Automatisch folgt zeitlich verzögert die Produktion von IL-10, das die Entzündungsreaktion bremst um unnötigen Gewebeschaden zu verhindern (Calvano et al., 2005).

Unter bestimmten Bedingungen, wie zum Beispiel in der Sepsis, kippt jedoch diese feinjustierte Balance zeitlich sowie quantitativ zugunsten der IL- 10 Antwort. *In vitro* konnte dies für Monozyten gezeigt werden (Randow et al., 1995).

Für das *monocyte reprogramming* ist IL-10 ein Schlüsselmediator: *in vitro* vermindert es über die Blockade des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Driessler, Venstrom, Sabat, Asadullah, & Schottelius, 2004) unter anderem die monozytäre Produktion der pro- inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL- 8 (R. A. J. De Waal Malefyt, 1991) und IL-12 (Aste-Amezaga, Ma, Sartori, & Trinchieri, 1998). Auch reguliert es die Expression der für die Antigenpräsentation wichtigen Rezeptoren mHLA- DR und CD86 herunter (R. H. De Waal Malefyt, J., 1991; Wolk, Docke, von Baehr, Volk, & Sabat, 2000). Damit übereinstimmend konnte bei Sepsis- Patienten eine Korrelation zwischen Serum- IL-10 und niedrigerer mHLA- DR Expression gezeigt werden (Monneret et al., 2004).

Auch auf T- Zellen nimmt es maßgeblich Einfluss. Naive CD4⁺ T- Helferzellen können sich in verschiedene Subtypen differenzieren, je nachdem welchem Zytokinmilieu sie ausgesetzt sind. IL- 10 in Kombination mit TGF- β veranlasst naive T- Helferzellen dazu, sich in Tregs zu differenzieren, dessen Haupteffektor- Molekül wiederum IL- 10 ist (Hsu et al., 2015). Dies beschreibt einen positiven Feedback- Mechanismus, mit den IL- 10 seinen anti- inflammatorischen Effekt verstärkt. Auch hemmt es über die Unterdrückung der IL-12 Produktion von myeloischen Zellen auch die Differenzierung von naiven T- Zellen in Th1 Zellen (Demangel, Bertolino, & Britton, 2002). Th-1 Zellen sind aufgrund ihrer Produktion der pro- inflammatorische Zytokine IL- 2 und Inf- γ wichtig für die Aktivierung von weiteren T- Zellen und Makrophagen.

2.4 Hypothese: bei Hämodialysepatienten besteht aufgrund von chronischer Inflammation eine Immunparalyse

Die Ursache für die ausgeprägte Infektanfälligkeit von HD- Patienten ist nach wie vor unbekannt, wenngleich schon jahrelang Gegenstand intensiver Forschung.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass T- Zellen (Gerez et al., 1991; Lisowska et al., 2012), APZ (Girndt et al., 2001) und andere Zellpopulationen phänotypische Veränderungen aufweisen, die sie in ihrer Funktion beeinträchtigen. In der Immunparalyse im Rahmen der Sepsis oder der chronischen Hepatitis B exprimieren T- Zellen und APZ zum Teil den gleichen Phänotyp (Boomer et al., 2011; Wolk et al., 2007). Bei der Immunparalyse spielt die Inflammation eine bedeutende Rolle in der Genese der Immunschwäche. Da auch bei HD- Patienten eine Inflammation vorliegt, besteht die Möglichkeit, dass die gleichen pathophysiologische Prozesse wie bei der Immunparalyse in der Sepsis oder bei chronischer Hepatitis B Infektion die Immunschwäche bei HD- Patienten bewirken.

Um diese Vermutung zu überprüfen untersuchten wir PBMCs und das Serum von HD- Patienten auf den aus der Immunparalyse bekannten Immunphänotyp. Zudem beabsichtigten wir, anhand von bivariater Korrelationen Zusammenhänge zwischen pro- inflammatorischer und anti- inflammatorischer Parameter zu erkennen. Weiterhin spekulierten wir in diesem Kontext auf ein vermehrtes Vorkommen von T- Zellen, die inhibitorische Rezeptoren exprimieren. Aufkommende so genannte Checkpoint- Inhibitoren, die die PD-1 induzierte TCE wieder aufheben, sind zunehmend erfolgreich in der Krebstherapie (Xu-Monette, Zhang, Li, & Young, 2017) und auch in der Therapie der Hepatitis B gibt es bereits erfolgreiche Tiermodelle (Tzeng et al., 2012). Sollte sich zeigen, dass die Immunparalyse auch bei HD- Patienten vorliegt, so ergäben sich daraus vielversprechende therapeutische Ansätze.

3 Materialien und Methoden

3.1 Patienten und gesunde Kontrollprobanden

Die Erfassung von Patientendaten sowie Probenmaterialien erfolgte im Rahmen der Dialyse-Studie „Austausch von Acetat durch Citrat im Dialysat der Bicarbonat- basierenden Hämodialyse (Citrat- Acetat- Studie)“ (NCT02745340) der Abteilung für Nephrologie des Klinikums rechts der Isar, Universitätsklinikum der Technischen Universität München. Alle erfassten Patienten sowie gesunde Kontrollprobanden wurden vor Einschluss in die Studien über Ziel, Umfang und mögliche Risiken der Studien aufgeklärt. Ferner wurde eine schriftliche Einverständniserklärung unterzeichnet. Ein positives Ethikvotum lag vor.

3.1.1 Einschlusskriterien Citrat- Acetat- Studie

Einschlusskriterien zur Teilnahme an der Citrat- Acetat Studie waren ein Mindestalter von 18 Jahren, eine seit mindestens 3 Monaten bestehende Dialysetherapie sowie einer Dialysefrequenz von mindestens 3- mal pro Woche à 4 Stunden. Ausschlusskriterien waren Schwangerschaft, klinisch relevante Infektionen zum Einschlusszeitpunkt sowie eine fehlende Einverständniserklärung. Die Rekrutierung erfolgte 2016 in 2 Dialysezentren in München.

3.1.2 Einschlusskriterien gesunder Kontrollprobanden

Einschlusskriterien für gesunde Kontrollprobanden waren ein Alter über 18 Jahre, keine chronischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus, kardiovaskuläre Erkrankungen, aktive maligne Tumorerkrankungen, chronische oder akute Infektionen sowie eine unterschriebene Einverständniserklärung. Die Rekrutierung erfolgte über Zeitungsinserate sowie lokale Aushänge. Es wurde eine finanzielle Aufwandsentschädigung bereitgestellt.

3.2 Materialien

Tabelle 1: Laborgerätschaften

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Analysesoftware	FlowJo	Treestar, Ashland, USA
	FCAP Array	BD Bioscience, San Jose, USA
	SPSS 23	IBM, Armonk, USA
	Adobe Illustrator CS2	Adobe, San Jose, USA
Automatische Pipette	Falcon	Corning, New York, USA
Automatischer Zellzähler	Vi- Cell XR	Beckmann- Coulter, Brea, USA
CO2- Inkubator	HERACell	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Durchflusszytometer	BD Canto II	BD Bioscience, San Jose, USA
	BD LSRFortessa	BD Bioscience, San Jose, USA
	CytoFLEX	Beckmann- Coulter, Brea, USA
Feinwaage	LA 120 S	Sartorius, Göttingen, D
Manuelle Pipette	Eppendorf Research 2, 10, 20, 200, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, D
Mikroskop	XDS-1	Optical Technology Germany
pH- Bestimmung	pH- Meter	Sartorius, Göttingen, D
Plattenschüttler	Microtitre Plate Shaker SSM5	stuart, Staffordshire, GB
Sterile Werkbank	HERASafe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermisches Wasserbad	Julabo SW 21	Julabo, Seelbach, D
Tisch- Zentrifuge	Centrifuge 5424 R	Eppendorf, Hamburg, D
Vortexer	Vortex Mixer	neoLab, Heidelberg, D

Tabelle 2: Einwegmaterialien

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller
EDTA- Röhrchen	S- Monovette	Sarstedt, Nümbrecht, D
Eppendorf- Tubes/Falcons	1,5; 2; 15, 50 ml	greiner bio- one, Kremsmünster, Österreich
Kryokonservierung	CryoPure Tube 1,6 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen	SurPhob Spitzen 10; 200; 500 µl	Biozym, Oldendorf, D
Serologische Pipetten	Cellstar 5; 10; 25; 50 ml	greiner bio- one, Kremsmünster, Österreich
Serum- Röhrchen	S- Monovette	Sarstedt, Nümbrecht, D
Versiegelung		
Zellkulturplatten	Parafilm	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Zählkammer	C- Chip	NanoEntek, Seoul, Korea
Zellisolation	BD Vacutainer CPT	BD Bioscience, San Jose, USA
Zellkulturplatte	Tissue Culture Plate, 96 well	Corning, New York, USA
Zellsieb	Corning Cell Strainer 100 µm	Corning, New York, US
Zellzählung	CNTR 4 ml sample cup	Beckmann- Coulter, Brea, USA
Zytometer- Röhrchen	Flow Cytometry Tubes 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zytometer- Röhrchen, klein	Microtube 1.2 ml	Starlab, Hamburg, D

Tabelle 3: Chemikalien, Reagenzien, Medium

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller
Antibiotikum	Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Bead- Array- Puffer	Human Soluble Protein Master Buffer Kit	BD Bioscience, San Jose, USA
Brilliantviolett- Antikörperstabilisierung	Brilliant Stain Buffer	BD Bioscience, San Jose, USA
Fixierung intrazellulärer Zytokine	Intracellular Fixation Buffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
Kryokonservierung	Dimethyl Sulfoxide	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Durchflußzytometer und Staining- Puffer	Cell Staining Buffer	Biologend, San Diego, USA
Supplement	Fetales Kälber Serum	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Wasch- Puffer, Zell- Isolation	Dulbecco's PBS	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Zellkulturmedium	RPMI- 1640 Medium	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Zellmembran-Permeabilisierung	Permeabilization Buffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
Lebend/Tod- Zellzählung	Trypan Blue Solution	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

Tabelle 4: Antikörper, Beads

Verwendung	Bezeichnung/Zielantigen/ Fluorophor	Hersteller
Bead- Array	Human MCP-1 Flex Set	BD Bioscience, San Jose, USA
	Human IL-6 Flex Set	BD Bioscience, San Jose, USA
	Human IP-10 Flex Set	BD Bioscience, San Jose, USA
	Human CCL 5 Flex Set	BD Bioscience, San Jose, USA
	Human IL-8 Flex Set	BD Bioscience, San Jose, USA
	Human IL-10 Flex Set	BD Bioscience, San Jose, USA
	Human IL-2 Flex Set	BD Bioscience, San Jose, USA
	Human Interferon- γ Flex Set	BD Bioscience, San Jose, USA
Intrazelluläre Zytokinfärbung	Anti- Human IL-4 PE	BD Bioscience, San Jose, USA
	Anti- Human IL-10 APZ	BD Bioscience, San Jose, USA
	Anti- Human Interferon- γ AlexaFluor700	BD Bioscience, San Jose, USA
	Anti- Human TNF- α BV786	Biolegend, San Diego, USA
Kompensationsbeads	Anti- Human IL-2 FITC	eBioscience
	Ultracomp eBeads	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kostimulation	ArC Amine Reactive Compensation Bead Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
	Anti- Human CD28	BD Bioscience, San Jose, USA
Lebend/Tot- Färbung	Propidium Iodide	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
	Live/Dead Fixable Blue Stain	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Oberflächenfärbung	Anti- Human CD16 FITC	Biolegend, San Diego, USA
	Anti- Human PD-1 PE	Biolegend, San Diego, USA
	Anti- Human CD14 PerCP/Cy5.5	Biolegend, San Diego, USA
	Anti- Human CD86 PerCP/Cy5.5.	Biolegend, San Diego, USA
	Anti- Human HLA-DR APZ	Biolegend, San Diego, USA
	Anti- Human CD69 AlexaFluor700	Biolegend, San Diego, USA
	Anti- Human Tim3 BV450	Biolegend, San Diego, USA
	Anti- Human PDL-1 BV510	BD Bioscience, San Jose, USA
	Anti- Human CD3 BV605	Biolegend, San Diego, USA
	Anti- Human CD56 BV785	Biolegend, San Diego, USA
	Anti- Human CD25 PE- Dazzle	Biolegend, San Diego, USA
	Anti- Human CD45RO PerCP/Cy5.5	Biolegend, San Diego, USA
	Anti- Human CCR7 FITC	Biolegend, San Diego, USA
	Anti- Human CTLA4 PE/Cy7	Biolegend, San Diego, USA
	Anti- Human CD28 APZ	Biolegend, San Diego, USA
	Anti- Human Tim3 BV421	Biolegend, San Diego, USA
	Anti- Human CD8 BV510	Biolegend, San Diego, USA
	Anti- Human CD3 BV605	Biolegend, San Diego, USA
	Anti- Human CD4 BV785	Biolegend, San Diego, USA
	Anti- Human CD3 FITC	Biolegend, San Diego, USA
Anti- Human CD14 FITC	Biolegend, San Diego, USA	

Anti- Human CD19 FITC	Biolegend, San Diego, USA
Anti- Human CD56 FITC	Biolegend, San Diego, USA
Anti- Human IL4R- alpha PE	Biolegend, San Diego, USA
Anti- Human CD33 PC7	Biolegend, San Diego, USA
Anti- Human CD11b AlexaFluor700	Biolegend, San Diego, USA
Anti- Human CD14 APZ/Cy7	Biolegend, San Diego, USA
Anti- Human CD15 Pacific Blue	Biolegend, San Diego, USA
Anti- Human CD4 eFluor450	eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Anti- Human CD3 BV510	Biolegend, San Diego, USA
Anti- Human CD8 ECD	BD Bioscience, San Jose, USA
Anti- Human CD56 PE/Cy7	Biolegend, San Diego, USA

3.3 Methoden

3.3.1 Probenmaterialgewinnung und -verarbeitung

3.3.1.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte nach dem kurzen Dialyse- freien Intervall unmittelbar vor Beginn der Dialysesitzung. Die Abnahme von venösem Vollblut erfolgte über den durch Fachpersonal punktierten Dialysezugang. Zur Blutbildbestimmung wurde ein EDTA- Röhrchen, zur Serumbestimmung ein Serum- Röhrchen mit Blut befüllt. Zur Immunphänotypisierung von PBMCs wurden zudem 3 CPT- Röhrchen mit Blut gefüllt.

3.3.1.2 Serum- Gewinnung

Zur Gewinnung von Serum wurden die mit Blut gefüllten Serumröhrchen nach Abnahme 15 Minuten bei Raumtemperatur aufrecht gelagert. Dies ermöglicht einen, für eine Serum- Gewinnung notwendig, vollständigen Ablauf der plasmatischen Gerinnung. Folgend wurden die Serumröhrchen 10 Minuten bei 2500 g zentrifugiert. Der Überstand, also das durch die Zentrifugation vom zellulären Blutanteil und geronnenen Fibrin getrennte Serum, wurde manuell abpipettiert, in 2 ml Eppendorf- Tubes aliquotiert und in einem -80°C Gefrierschrank kryokonserviert.

3.3.1.3 PBMC- Isolation

Zur Isolation der PBMCs wurden BD CPTTM- Tubes verwendet. Diese enthalten als Antikoagulanzen Heparin sowie verfestigtes FicollTM- Substrat, welches zelluläre Blutbestandteile entlang ihres Dichtegradienten durch Zentrifugation voneinander trennt. Nach Blutentnahme wurde das Material innerhalb von 2 Stunden weiterverarbeitet. Direkt vor der Zentrifugation wurden die Röhrchen zur Durchmischung 5x über Kopf geschwenkt. Anschließend wurden die Röhrchen 15 Minuten bei 20 °C und 1650 g zentrifugiert. Die PBMCs, Thrombozyten sowie das Blutplasma befanden sich danach oberhalb des Ficolls. Durch erneutes Schwenken (3x) wurde das Plasma mit PBMCs und Thrombozyten erneut vermischt. Danach wurden die PBMCs im Plasma unter sterilen Bedingungen in ein 50 ml Falcon überführt. Um die Thrombozyten aus dem Gemisch zu entfernen, folgten 2 Waschgänge in 50 ml PBS für je 10 Minuten bei 260 g. Die isolierten PBMCs wurden schließlich in 2 ml RPMI Zellmedium resuspendiert und in Eis auf 4°C gekühlt.

3.3.1.4 Lebend/Tod- Färbung und Zellzählung

Zur Quantifizierung der lebenden PBMCs wurde eine Türkisch- Blau Färbung durchgeführt. Türkisch- Blau wird ausschließlich von toten bzw. perforierten Zellen aufgenommen und kann daher zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen verwendet werden. Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl PBS versetzt und anschließend mit 100 µl Türkisch- Blau gefärbt. Hierdurch wurde ein Verdünnungsfaktor von 1:20 erzielt. Zur Auszählung wurde eine Neubauer Zählkammer mit dem Gemisch beimpft. Abschließend wurden unter einem Mikroskop die lebenden Zellen in 4 Quadranten gezählt, durch 4 dividiert und mit dem Verdünnungsfaktor sowie 10^4 multipliziert. Der errechnete Wert entsprach dem PBMC- Gehalt pro ml. Zur Oberflächenphänotypisierung wurden 5×10^6 PBMCs abgetrennt und unmittelbar für die Durchflusszytometrie gefärbt.

3.3.1.5 Kryokonservierung der PBMCs

Um weitere Experimente zu einem späteren Zeitpunkt durchzuführen, wurden alle nicht unmittelbar zytometrisch untersuchten PBMCs kryokonserviert. Als Kryomedium wurde Fetales Kälberserum (FCS) mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. Die Zellsuspension wurde bei 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Zellpellet wurde anschließend in so viel Kryomedium resuspendiert, dass sich eine Zellkonzentration von $5-20 \times 10^6$ Zellen pro ml ergab. Kryo- Rörchen wurden mit je 1 ml Zell-Kryomedium- Gemisch aliquotiert. Zur langsamen Abkühlung auf -80 °C wurden die Kryo- Rörchen in einen auf 4°C vorgekühlten Gefrierbehälter überführt. Die Rörchenhalterung dieses Behälters ist von Isopropylalkohol umgeben, welches mit einer Geschwindigkeit von 1 °C pro Minute abkühlt. Diese langsame Temperaturveränderung ist notwendig, um die Viabilität der Zellen zu erhalten. Der Gefrierbehälter wurde anschließend für 24 Stunden in einen -80 °C Gefrierschrank überführt. Abschließend wurden die gefrorenen Kryo-Rörchen in einen -260 °C kalten Stickstofftank überführt.

3.3.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein spektrometrisches Verfahren, mit der Zellen hinsichtlich ihrer Größe, Granularität sowie der Expression von Molekülen untersucht werden können, die sich auf ihrer Oberfläche oder in ihrem Zellinneren befinden. Im Prinzip erfolgt der Nachweis durch Detektion optischer Signale, die durch Beugung und Brechung sowie Fluoreszenz entstehen, wenn eine markierte Zelle einen Laserstrahl passiert.

Die zu untersuchenden Zellen werden mit Fluorophor- konjugierten Antikörpern gefärbt und anschließend in einer Trägerflüssigkeit mit Überdruck durch einen Mikrokanal gepresst. Die Zellsuspension erzeugt unter diesen Umständen einen laminaren Hüllstrom, der zur Folge hat, dass die Zellen sich in der Mitte des Suspension- Flusses hintereinander aufreihen und somit in hoher Geschwindigkeit einzeln nacheinander den Mikrokanal passieren (hydrodynamische Fokussierung).

Die Zellen passieren in diesem Kanal einen Laser einer bestimmten Wellenlänge. Durch die Anregung des Antikörper- konjugierten Fluorophors durch den Laser emittiert die Zelle ein optisches Signal, dessen Wellenlänge für das jeweilige Fluorophor spezifisch ist. Dieses Signal wird von einem Detektor erfasst. Durch das Untersuchen von großen Zellmengen (bis zu 10000 Zellen pro Sekunde) können somit quantitative Aussagen bezüglich verschiedener Zellpopulationen getroffen werden. Abbildung 4 zeigt das Prinzip der Durchflusszytometrie.

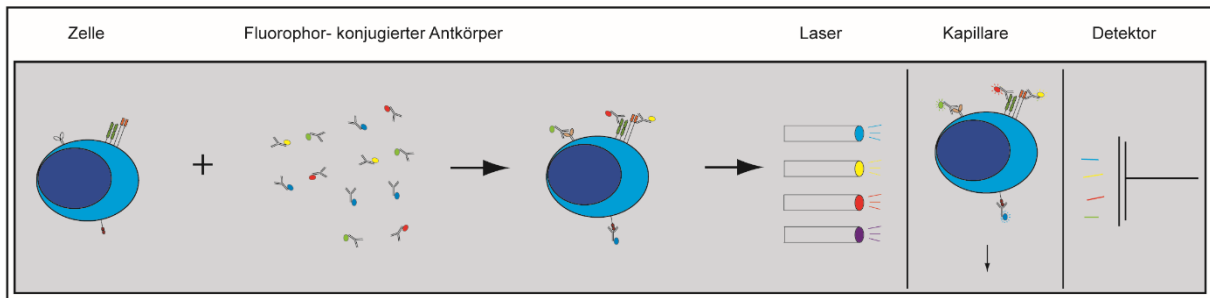


Abbildung 4: Prinzip der Durchflusszytometrie Fluorophor- konjugierte Antikörper werden mit Zellen inkubiert. Nach Bindung der Antikörper an ihr Zielantigen auf den Zellen strömen die Zellen durch eine Kapillare. Dort werden sie optischen Signalen bestimmter Wellenlängen ausgesetzt. Die Fluorophore werden durch diese angeregt und emittieren ihrerseits optische Signale bestimmter Wellenlängen, die von einem Detektor registriert werden.

Färbung von PBMCs für Durchflusszytometrie

Um den Oberflächenphänotyp von T- Zellen, Monozyten, NK- Zellen und MDSCs zu charakterisieren, verwendeten wir Ko- Färbungen mit bis zu 13 Fluorophoren (adaptiert nach Lugli et al., 2013; Wildgruber et al., 2016). Für T- Zellen, Monozyten und NK- Zellen wurden je 1×10^6 , für MDSCs 3×10^6 PBMCs gefärbt. Für Einzelfärbungen wurden 1×10^5 PBMCs verwendet.

Die PBMCs wurden zunächst in einer 96- well Platte verteilt und dann bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ und 300 g für 5 Minuten zentrifugiert. T- Zellen wurden anschließend mit einem CCR7- Antikörper in $90\text{ }\mu\text{l}$ staining- Buffer versetzt, resuspendiert und für 15 Minuten bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ lichtgeschützt inkubiert. Anschließend folgte ein Waschgang ($4\text{ }^\circ\text{C}$, 300 g , 5 min) in $200\text{ }\mu\text{l}$ PBS. Anschließend wurden die Kofärbungen (Tabelle 5) zu den Pellets in $50\text{ }\mu\text{l}$ staining- Buffer gegeben, die Pellets resuspendiert und für 20 Minuten bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ lichtgeschützt inkubiert. Einzelfärbungen erfolgten zeitgleich mit den Kofärbungen in $100\text{ }\mu\text{l}$ staining- Buffer. An die Inkubation folgend wurden

3 Waschgänge in 200 µl PBS durchgeführt (4°C, 300 g, 5 min). Abschließend erfolgte die Resuspension in 200 µl PBS zur zytometrischen Untersuchung. Zur Lebend/Tot-Diskrimination wurde kurz vor Messung 2 µl Propidium Iodide zu den gefärbten Zellen gegeben und die Suspension resuspendiert. Abbildungen 5-8 zeigen die verwendeten Gating- Strategien. Die Messung erfolgte an einem 3 Laser/13 Kanal Durchflusszytometer von Beckmann Coulter (CytoFLEX).

Tabelle 5: Antikörper Ko- Färbungen

Panel	Bezeichnung/Zielantigen/ Fluorophor	Hersteller	
T- Zellen Oberflächenphänotyp	Anti- Human PD-1 PE	Biolegend, San Diego, USA	
	Anti- Human CD69 AlexaFluor700	Biolegend, San Diego, USA	
	Anti- Human Tim3 BV450	Biolegend, San Diego, USA	
	Anti- Human CD3 BV605	Biolegend, San Diego, USA	
	Anti- Human CD25 PE- Dazzle	Biolegend, San Diego, USA	
	Anti- Human CD45RO PerCP/Cy5.5	Biolegend, San Diego, USA	
	Anti- Human CCR7 FITC	Biolegend, San Diego, USA	
	Anti- Human CTLA4 PE/Cy7	Biolegend, San Diego, USA	
	Anti- Human CD28 APZ	Biolegend, San Diego, USA	
	Anti- Human CD8 BV510	Biolegend, San Diego, USA	
	Anti- Human CD4 BV785	Biolegend, San Diego, USA	
	Monozytenoberflächenphänotyp	Anti- Human CD3 FITC	Biolegend, San Diego, USA
		Anti- Human CD16 FITC	Biolegend, San Diego, USA
		Anti- Human PD-1 PE	Biolegend, San Diego, USA
		Anti- Human CD86 PerCP/Cy5.5.	Biolegend, San Diego, USA
Anti- Human HLA-DR APZ		Biolegend, San Diego, USA	
Anti- Human CD69 AlexaFluor700		Biolegend, San Diego, USA	
Anti- Human PDL-1 BV510		BD Bioscience, San Jose, USA	
Anti- Human CD56 BV785		Biolegend, San Diego, USA	
Anti- Human Tim3 BV421		Biolegend, San Diego, USA	
Anti- Human CD14 APZ/Cy7		Biolegend, San Diego, USA	
Myeloid- derived suppressor- cells	Anti- Human CD3 FITC	Biolegend, San Diego, USA	
	Anti- Human CD14 FITC	Biolegend, San Diego, USA	
	Anti- Human CD19 FITC	Biolegend, San Diego, USA	
	Anti- Human CD56 FITC	Biolegend, San Diego, USA	
	Anti- Human IL4R- alpha PE	Biolegend, San Diego, USA	
	Anti- Human CD33 PC7	Biolegend, San Diego, USA	
	Anti- Human CD11b AlexaFluor700	Biolegend, San Diego, USA	
	Anti- Human CD15 Pacific Blue	Biolegend, San Diego, USA	

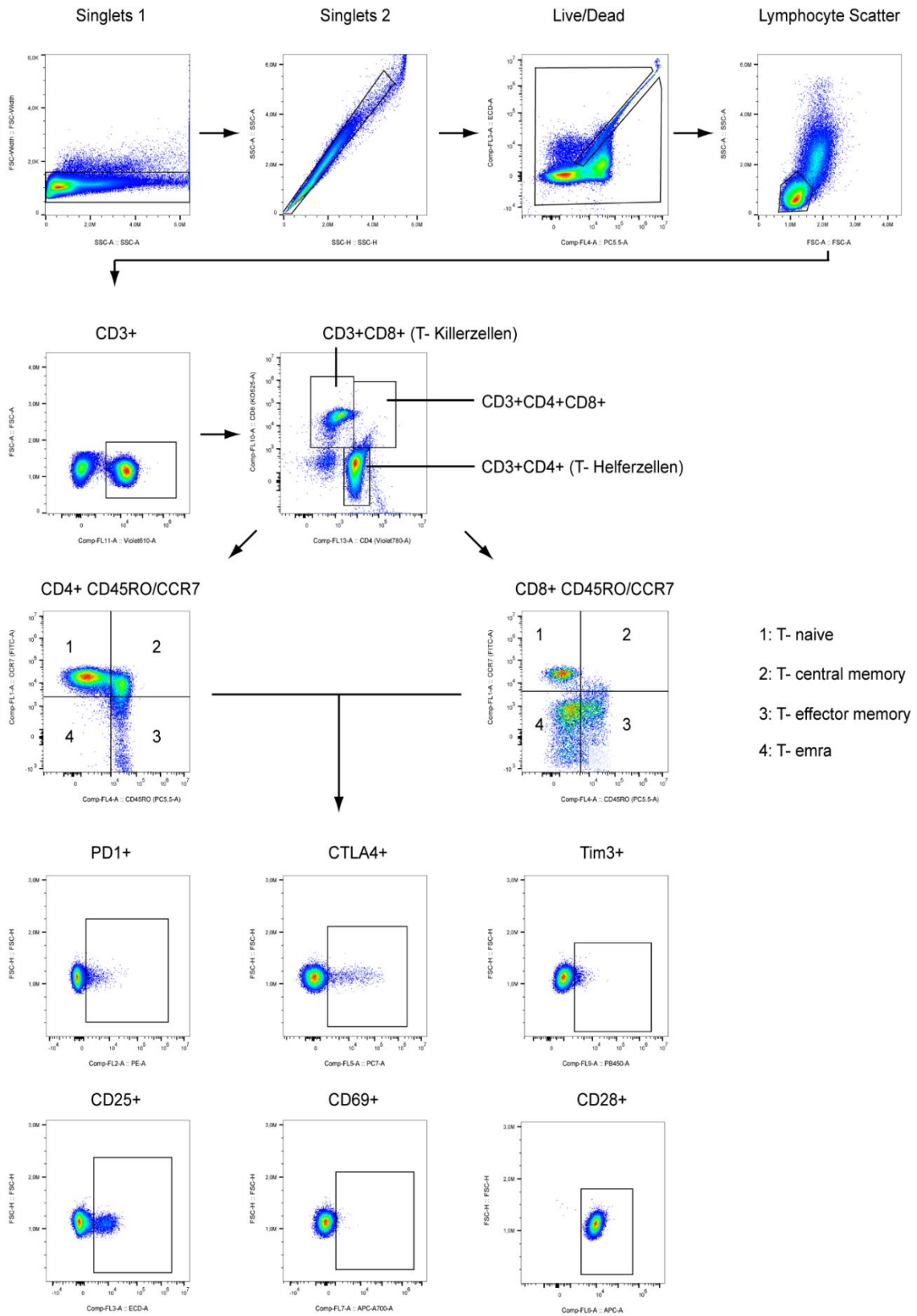


Abbildung 5: Gating- Strategie für Oberflächenphänotyp der T- Zellen

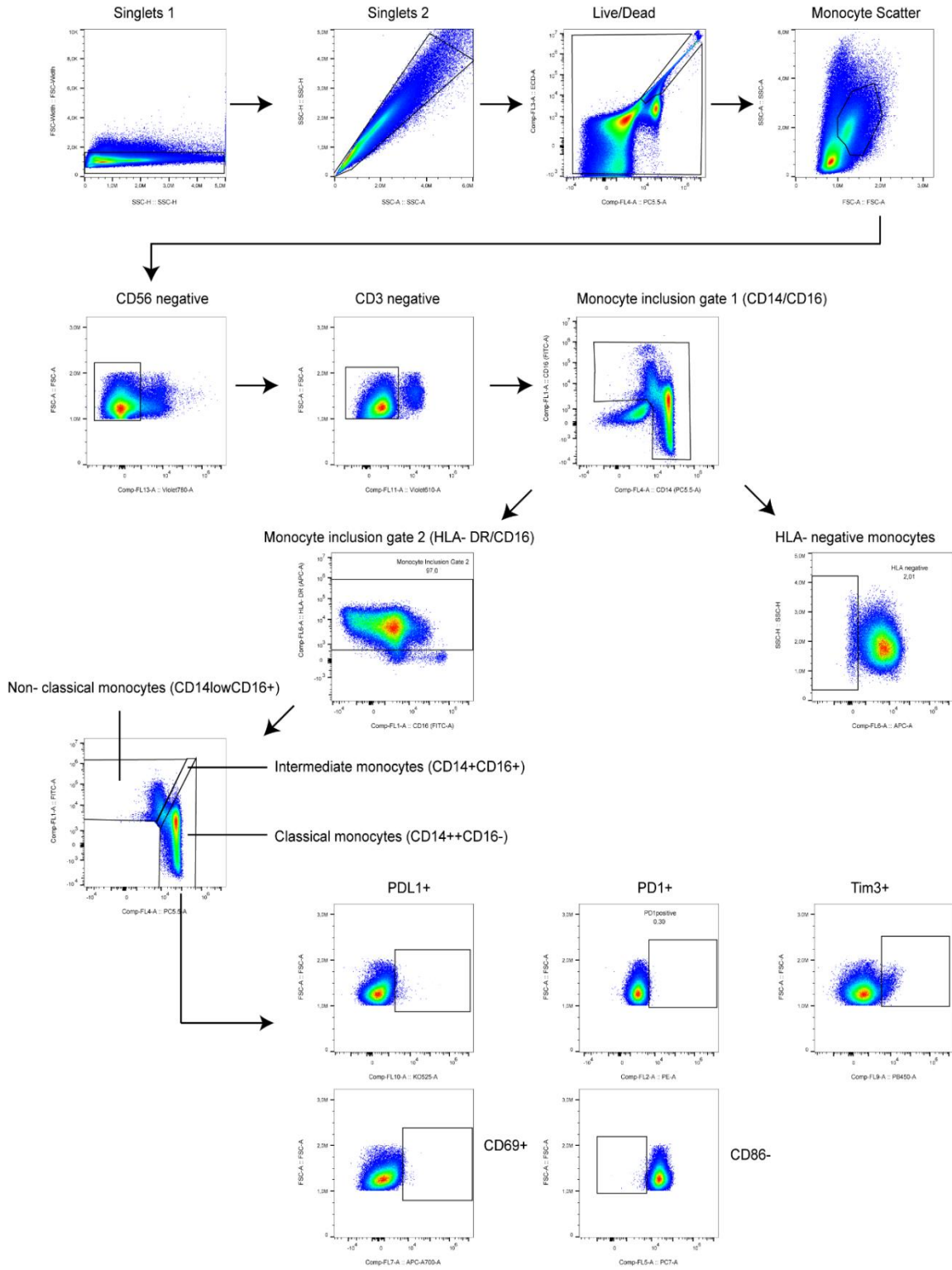


Abbildung 6: Gating- Strategie für Monozyten

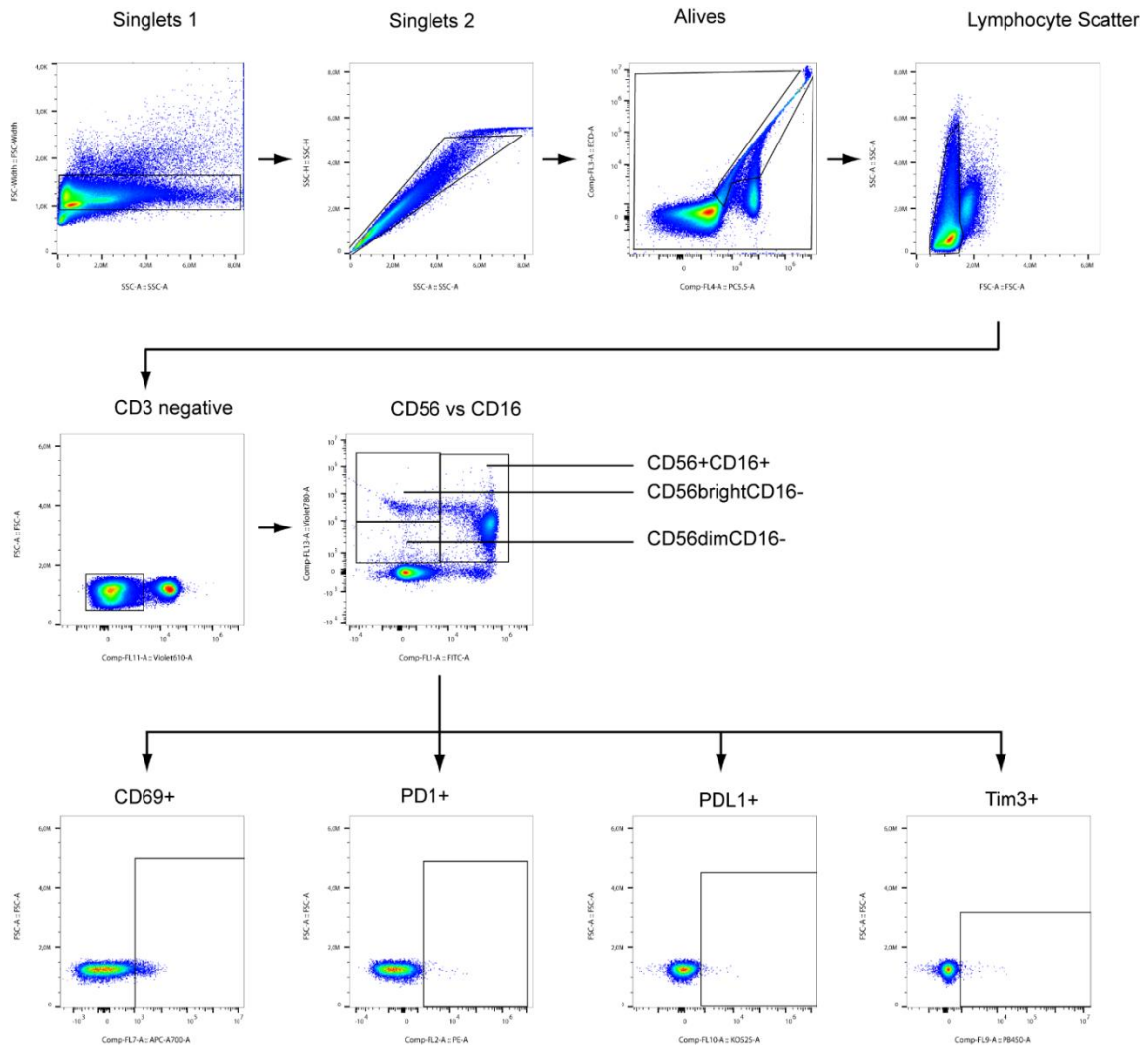


Abbildung 7: Gating- Strategie für NK- Zellen

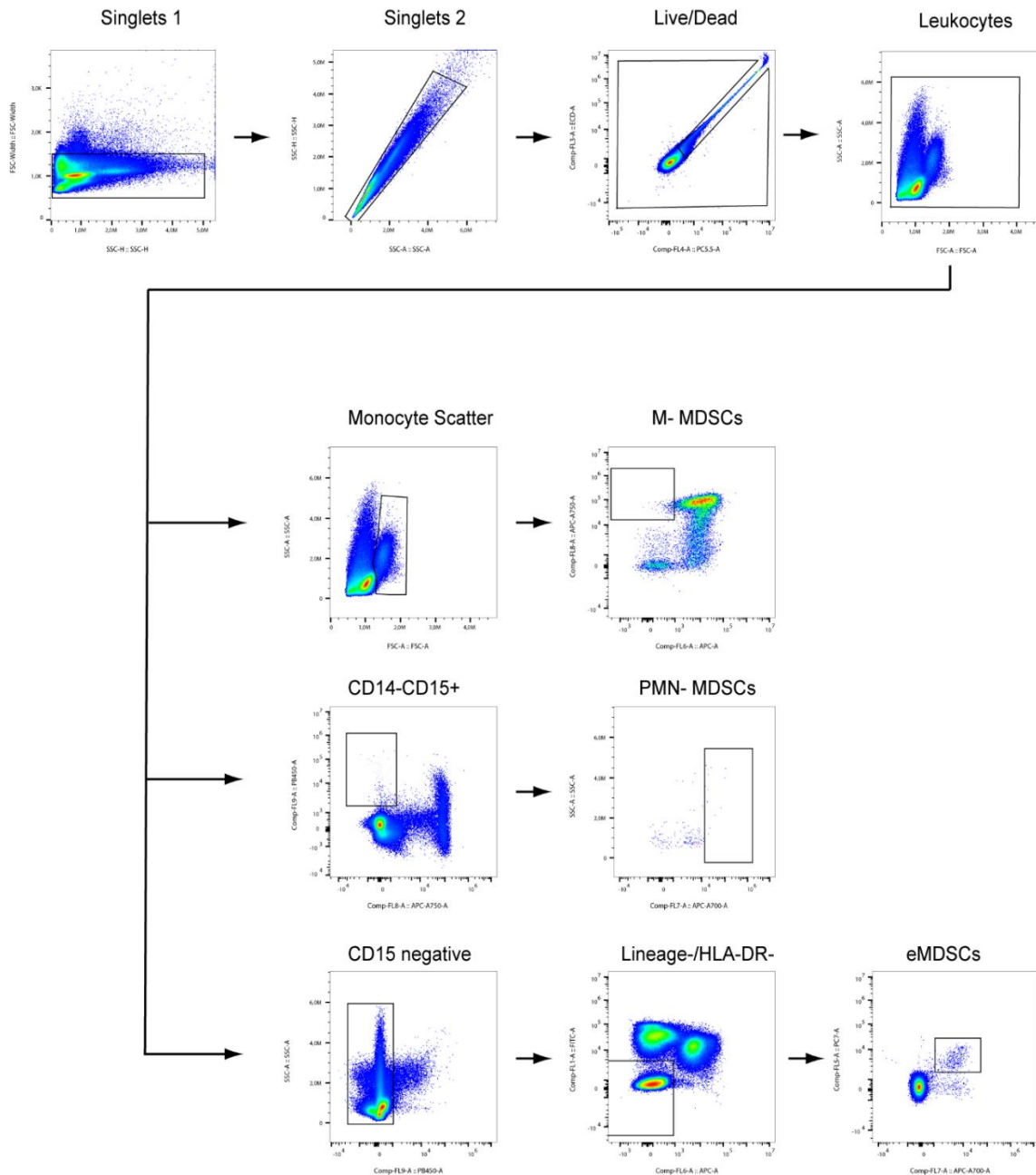


Abbildung 8: Gating- Strategie für MDSCs

3.3.3 Bead- Array

Zur quantitativen Bestimmung der im Serum befindlichen Zytokine verwendeten wir ein kommerziell verfügbares Bead Array Kit von BD Bioscience (BD CBA Flex Sets). Der Bead-Array ist ebenfalls ein spektrometrisches Verfahren, das dem Funktionsprinzip von „Antikörper- Sandwich“ Assays folgt. Hierbei werden „Capture Beads“ mit einer spezifischen Fluoreszenzintensität verwendet, deren Oberfläche zusätzlich mit Analyt- spezifischen

Antikörpern konjugiert ist. Freie Fluorophor- konjugierte „Detection-“ Antikörper (PE- konjugierte Antikörper) binden ebenfalls spezifisch an das Analyt, sodass sich die klassische „Antikörper- Sandwich“ Struktur ergibt. Die Untersuchung erfolgt anschließend im Durchflusszytometer. Je mehr Analyt und damit Detection- Antikörper der Capture- Bead gebunden hat, desto stärker ist die Fluoreszenzintensität, die von den Antikörper- konjugierten Fluorophoren ausgeht. Abbildung 9 zeigt das Prinzip schematisch.

Durch die spezifische Fluoreszenzintensität (in den BD CBA Flex Sets APZ und APZ-Cy7) der

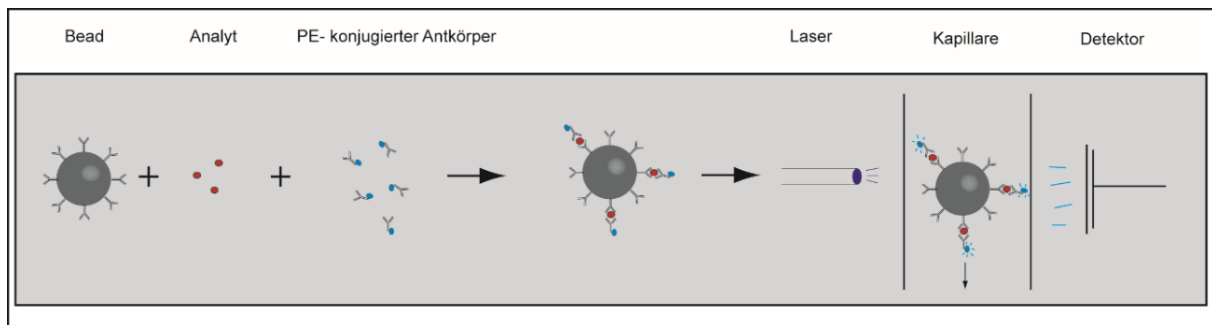


Abbildung 9: Prinzip des Bead Array

Capture Beads können zeitgleich in derselben Probe bis zu 10 Analyten bestimmt werden. Zur quantitativen Bestimmung wird eine Verdünnungsreihe mit rekombinanten Protein des untersuchten Analyts durchgeführt und eine 5- Punkt- logarithmische Standardkurve berechnet. Zur genauen Durchführung des Assays sei an dieser Stelle auf das vom Hersteller erstellte Protokoll verwiesen. Die Messung erfolgte an einem 3- Laser Durchflusszytometer von BD Bioscience (BD Canto II).

3.3.4 Zellkultur und Stimulations- Assay

Zur Überprüfung der *in- vitro* Effektorfunktion von T- und NK- Zellen führten wir ein Kurzzeit Stimulationsexperiment in einer Zellkultur durch mit konsekutiver intrazellulärer Zytokinfärbung und Messung mittels Durchflusszytometrie (adaptiert nach (Kutscher et al., 2013a)).

Hierfür verwendeten wir kryokonservierte PBMCs. Dies ermöglichte, eine große Probenanzahl gleichzeitig zu stimulieren und somit nahezu identische experimentelle Bedingungen über die gesamte Studienpopulation zu erzeugen. Die anschließende intrazelluläre Zytokinfärbung erlaubte eine zellspezifische Untersuchung der Effektorfunktion. Zur Stimulation verwendeten wir einen kommerziell verfügbaren Stimulator Mix (T-activated ImmunoScan Cocktail, Lophius).

3.3.4.1 Durchführung

Auftauen von kryokonservierten PBMCs

Die Kryoröhrchen wurden nach Entfernen aus dem Stickstofftank in einer Styroporbox mit Trockeneis zwischengelagert. Das Auftauen der Proben erfolgte einzeln. Dazu wurden die Kryoröhrchen für 1:15 Minute in ein 37 °C warmes Wasserbad getaucht, sodass sich das Kryomedium zu ca. 2/3 wieder verflüssigte.

Unter sterilen Bedingungen wurden 1 ml RPMI mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin (RPMI-10) tröpfchenweise zum Kryomedium hinzupipettiert und dann resuspendiert. Anschließend wurde das Kryomedium- RPMI-10- Gemisch zu 9 ml vorgewärmtem RPMI-10 in einem 15 ml Falcon transferiert und erneut resuspendiert. Es folgten 2 Waschgänge in 10 ml RPMI-10 (19 °C, 300 g, 10 min). Um Zellbestandteile von beim Auftauen gestorbenen Zellen zu entfernen wurde der Pellet erneut in 10 ml RPMI-10 resuspendiert und die Suspension durch einen 100 µl Zellsieb gegeben. 10 µl wurden zur Zellzählung mittels Trypanblau- Färbung abgetrennt. Die Zellsuspension wurde abschließend in einem 50 ml Falcon für 18 Stunden in einem 37°C Inkubator bei 5% CO₂ inkubiert. Zur Ermöglichung des Gasaustausches wurde der Deckel um eine halbe Umdrehung geöffnet.

Diese Inkubationszeit diente der Erholung der PBMCs vom Auftaustress sowie um einen vollständigen Ablauf von dadurch eventuell induzierter Apoptose oder Nekrose zu erlauben. Nach Ablauf der Erholungs- Phase wurden die Zellen erneut in 10 ml RPMI-10 gewaschen (19 °C, 300 g, 10 min) und mittels Trypanblau Färbung gezählt. Eine Viabilität von >70% war Voraussetzung für eine zuverlässige Effektorfunktion (Kutscher et al., 2013b).

Stimulation

Zur Stimulation wurden 2×10^6 PBMCs von der Zellsuspension abgetrennt und in einem neuen 15 ml Falcon zentrifugiert (21 °C, 560 g, 5 min). Der Zellpellet wurde anschließend in 200 µl eines Kostimulator- Buffers (RPMI-10 und 0,3% Anti- CD28- Antikörper) resuspendiert. Dies sicherte die APZ- unabhängige Aktivierung von T- Zellen. In einer 96- well Platte wurden pro Proband je 1×10^6 PBMCs in 100 µl auf 2 Wells verteilt (Stimulation und jeweilige Negativkontrolle). Anschließend wurden 50 µl des Stimulator- Buffers (RPMI-10 und 40% Stimulator Mix) zu dem Stimulationswell und 50 µl RPMI-10 zur Negativkontrolle hinzugefügt. Folgend wurden die Proben für 12 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ erneut inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden 50 µl Brefeldin A (BFA)- Buffer (RPMI-10 und 0,83% BFA) zu beiden Wells addiert, um den Golgi- Apparat zu blocken und somit die Vesikel-

Ausschleusung von intrazellulär befindlichen Zytokinen zu stoppen. Die Proben wurden für weitere 4 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die gesamte Stimulationszeit lag somit bei 16 Stunden. Um die Stimulation zu stoppen wurde die 96- well- Platte mit Parafilm isoliert und auf Eis in einem Kühlschrank auf 4 °C runtergekühlt.

Intrazellulär- und Oberflächenfärbung

Nach Herunterkühlung wurden die Proben für 5 Minuten bei 4°C und 560 g herunterzentrifugiert. Zur Lebend-Tod- Diskriminierung wurden anschließend die Zellpellets in 50 µl eines Ultraviolett (UV)- Stain- Buffer (Staining Buffer und 0,25% Live/Dead Fixable Blue Stain) resuspendiert und 30 Minuten bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Es folgten 3 Waschgänge in 200 µl staining- Buffer (4 °C, 560 g, 5 min). Zur Bindung der Zytokine im Intrazellulärraum erfolgte die Fixierung der Zellen mittels 100 µl IC Fixation Buffer und 20-minütiger Inkubation. Anschließend folgte die Permeabilisierung der Zellmembran mittels 100 µl Permeabilization Buffer (Perm- Buffer). Demnach wurden 4 Waschgänge in 200 µl Perm- Buffer (4 °C, 710 g, 5 min) durchgeführt. Zur Färbung wurden die Pellets in 50 µl Perm- Buffer sowie den Ko- Färbungen in 30 µl Staining- Buffer resuspendiert und 30 Minuten bei 4 °C lichtgeschützt inkubiert. Zeitgleich wurden die Einzelfärbungen mit Kompensations- Beads durchgeführt. Abschließend wurden die Zellen 3- mal in 200 µl Perm- Buffer, die Kompensations- Beads in 200 µl Staining- Buffer gewaschen (4 °C, 710 g, 5 min). Zur durchflusszytometrischen Untersuchung wurden die Zellen abschließend in 200 µl Staining- Buffer in Suspension genommen und bis zur Messung lichtgeschützt auf Eis gelagert. Die Messung erfolgte an einem 4- Laser/18- Kanal Durchflusszytometer von BD Bioscience (BD LSR Fortessa). Zur Auswertung wurde die in Abbildung 10 gezeigte Gating- Strategie verwendet.

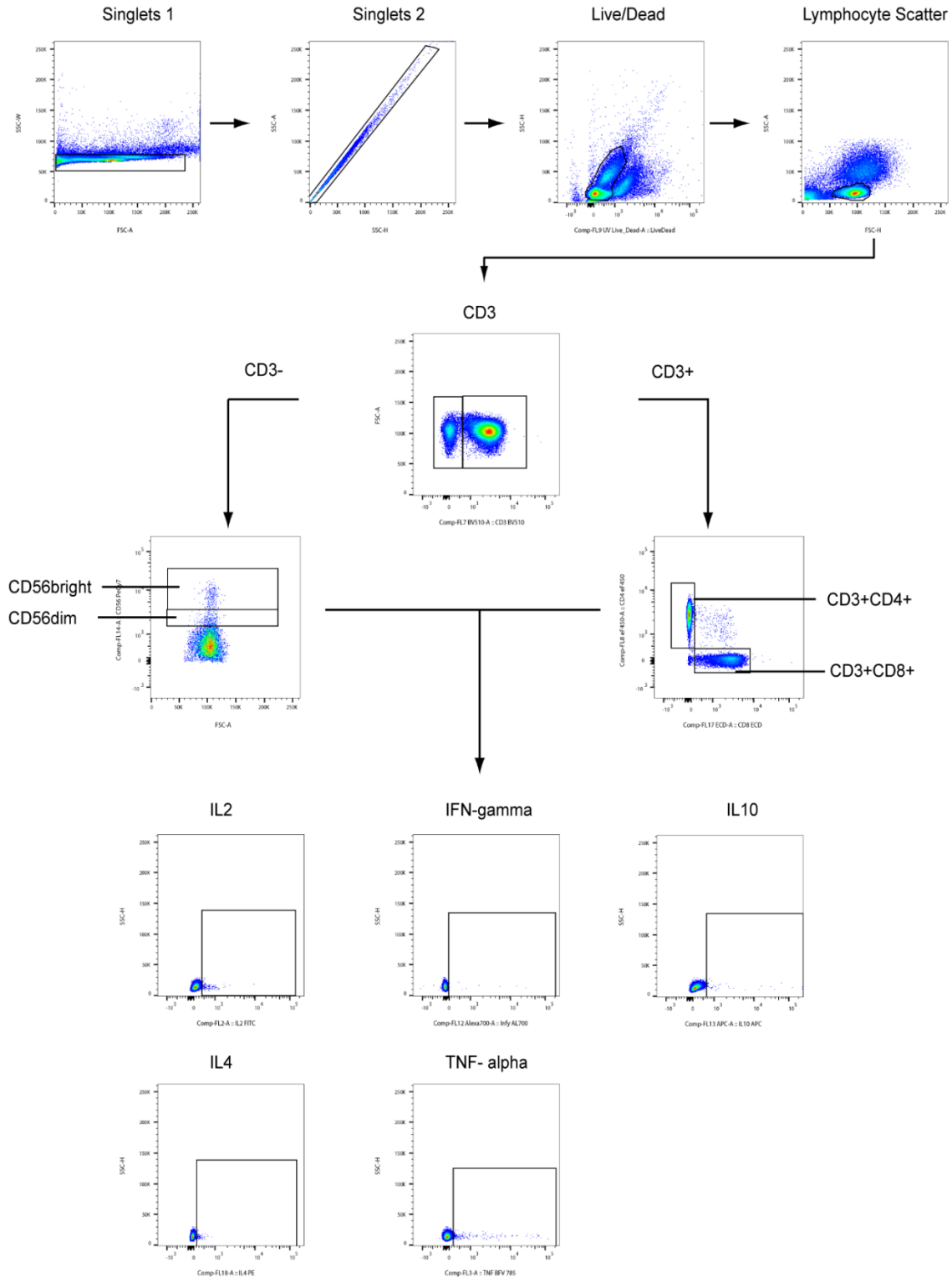


Abbildung 10: Gating- Strategie für intrazelluläre Zytokinfärbung

3.3.5 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse wurde das Statistikprogramm SPSS 23 von IBM verwendet. Datensätze wurden mittels visueller Einschätzung des Histogramms sowie dem Parameter Schiefe (Annahme von Normalverteilung bei Werten von -2 bis +2) auf Normalverteilung untersucht. Bei Normalverteilung erfolgten Mittelwertsvergleiche mit dem student's t-test, bei

nicht- Normalverteilung mit dem Mann- Whitney- U- Test. Adjustierung der p- Werte erfolgte nach Carlson Comorbidity Index (CCI) (Liu, Huang, Gilbertson, Foley, & Collins, 2010) und medikamentöser Immunsuppression mittels einer ANCOVA- Analyse (analysis of covariances). Unterschiede nominal skaliertes Parameter zwischen den Gruppen wurden mittels des Chi- Quadrat- Tests berechnet. Gezeigt werden Mittelwerte +/- 1 SEM. Die grafische Darstellung der p- Werte bedient sich folgender Schlüssel: *= p < 0,05; **= p < 0,01; ***= p < 0,001.

Korrelationen wurden je nach Normalverteilung mit Pearson oder Spearman- Korrelation berechnet. Adjustierung der p- Werte erfolgte nach bestandener Annahmen- Überprüfung mittels multipler linearer Regression nach Alter, BMI, CCI, Diabetes mellitus, chronischer Infektion, rheumatologischer Erkrankung, Tumor, Katheter, medikamentöse Immunsuppression, Statine sowie Albumin. Angegeben sind der standardisierte Korrelationskoeffizient β sowie der p- Wert.

4 Ergebnisse

4.1 Deskriptive Kohortenstatistik

Die in die Studie eingeschlossene Patientenkohorte zeigte ein Durchschnittsalter von 70 Jahren und bestand zu 45,9 % aus Männern. Die eingeschlossene Kontrollgruppe unterscheidet sich im Altersdurchschnitt und der Geschlechterverteilung nicht signifikant von der HD- Gruppe. Eine genauere Charakterisierung der Studienpopulation bietet Tabelle 6.

Für Mittelwertsvergleichs- Analysen hinsichtlich des Oberflächenphänotyps und der T-Zell-Effektorfunktion wurden Alters- und Geschlecht- gematchte Patienten- und Kontrollgruppen ermittelt. Detaillierte Kohortencharakteristika zeigen Tabellen 6-10 im Abschnitt 10: Supplementäre Daten.

Tabelle 5: Deskriptive Statistik der Studienpopulation

Parameter	HD- Patienten	Kontrollgruppe	p- Wert
Anzahl, <i>n</i>	74	74	-
Alter (Jahre), MW ± SD	70 ± 15	67 ± 12	0,247
Geschlecht (männlich), <i>n</i> (%)	34 (45,9)	36 (48,6)	0,742
BMI (kg/m ²), MW ± SD	26 ± 5	24 ± 4	0,020
Oberarmumfang (cm) MW ± SD	29 ± 4	26 ± 3	<0,001
Adaptierter CCI (0-21) MW ± SD	4 ± 3	0 ± 0	<0,001
MI in Anamnese, <i>n</i> (%)	14 (19)	0 (0)	<0,001
Hypertensive Herzerkrankung, <i>n</i> (%)	34 (46)	0 (0)	<0,001
KHK, pAVK oder Apoplex in Anamnese, <i>n</i> (%)	37 (50)	1 (1,4)	<0,001
Diabetes, <i>n</i> (%)	25 (34)	0 (0)	<0,001
COPD, <i>n</i> (%)	6 (8)	0 (0)	0,012
Neoplasie in Anamnese, <i>n</i> (%)	29 (39)	4 (5,4)	<0,001
Vorhofflimmern, <i>n</i> (%)	17 (23)	0 (0)	<0,001
Rheumatologische Erkrankung, <i>n</i> (%)	7 (9)	0 (0)	0,007
Chronische Infektion, <i>n</i> (%)	4 (5)	0 (0)	0,043
Hospitalisierungen in letzten 24 Monaten, MW ± SD	3 ± 2	0 ± 0	<0,001
Hospitalisierungen wg. primär infektiösen Ereignis, MW ± SD	0 ± 1	0 ± 0	<0,001
HD vintage (Monate), Median (IQR)	35 (17 - 55,25)	-	-
Katheter	8 (11)	-	-
Kt/V, MW ± SD	1,2 ± 0,3	-	-
Nikotinabusus, <i>n</i> (%)	14 (19)	14 (18,9)	1,000
Medikamentöse Immunsuppression, <i>n</i> (%)	22 (30)	0 (0)	<0,001
Statine	30 (41)	6 (8,1)	<0,001
Albumin (g/L), MW ± SD *	4,1 ± 0,4	3,9 ± 0,2	0,052
CRP (g/L), Median (IQR) *	5,1 (2,05 - 9,4)	0,11 (0,04 - 0,27)	<0,001
IL-6 (pg/mL), Median (IQR) *	4,1 (2,43 - 7,12)	1,01 (0,55 - 1,7)	<0,001
IL-8 (pg/mL), Median (IQR) *	16,12 (11,85 - 20,65)	5,7 (4,68 - 7,17)	<0,001

*unvollständige Daten (Patienten/Gesunde Kontrollen): Albumin n=3/53; CRP n=1/0; IL-6 n=10/19; IL-8 n=9/0

4.2 Ergebnisse zu Untersuchungen des Immunphänotyp bei Dialysepatienten

Hauptmerkmal der Immunparalyse ist das gleichzeitige Bestehen von Inflammation und Immundefizienz. Aus diesem Grunde untersuchten wir Serum und verschiedene Zellpopulationen sowohl auf Merkmale der Immun- Aktivierung und Supprimierung.

4.2.1 Monozyten von Dialysepatienten zeigen vermehrt Zeichen von Aktivierung

Als Zeichen monozytärer Aktivierung können verschiedene Parameter herangezogen werden: Zum einen kommt es bei chronischer Aktivierung des Monozytenkompartiments zu einer Zunahme pro- inflammatorischer Subpopulationen. Des Weiteren kommt es zu einer Zunahme von CD69- positiven Zellen. Wir erwarteten, dass sich beides bei HD- Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden zeigen würde.

Um dies zu erfassen quantifizierten wir von 67 HD- Patienten und 67 alters- und geschlechtsgematchten gesunden Kontrollprobanden via Durchflusszytometrie die Verteilung der Monozyten in ihre funktionell distinkten Subpopulationen. Monozyten unterlaufen bei chronischer Aktivierung einer phänotypischen Veränderung. So exprimieren sie zusätzlich zu ihrem Stammlinienmarker CD14 mit zunehmender pro- inflammatorischer Reizung zusätzlich den Fc- Rezeptor CD16. Daraus ergeben sich folgende drei Subpopulationen: die größte Klasse der klassischen Monozyten (engl.: *classical monocytes*, CM bzw. CD14⁺CD16⁻) sowie die beiden pro- inflammatorischen Subpopulationen intermediäre Monozyten (engl.: *intermediate monocytes*, IM bzw. CD14⁺CD16^{low}) und non- klassische Monozyten (engl.: *non- classical monocytes*, NCM bzw. CD14⁺CD16^{high}). Ebenso untersuchten wir die Monozyten auf das Oberflächenmolekül CD69, welches nach ihrer Aktivierung vermehrt exprimiert wird.

Bei HD- Patienten konnten wir im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe eine Expansion der pro- inflammatorischen IM- Populationen beobachten mit gleichzeitiger Verkleinerung der CM- Population. Die Größe der NCM- Population zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 11A). Zudem konnten wir eine höhere Frequenz CD69⁺ Monozyten- Populationen in der HD- Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen (Abb. 11B).

□ Gesunde Kontrollen ■ HD- Patienten

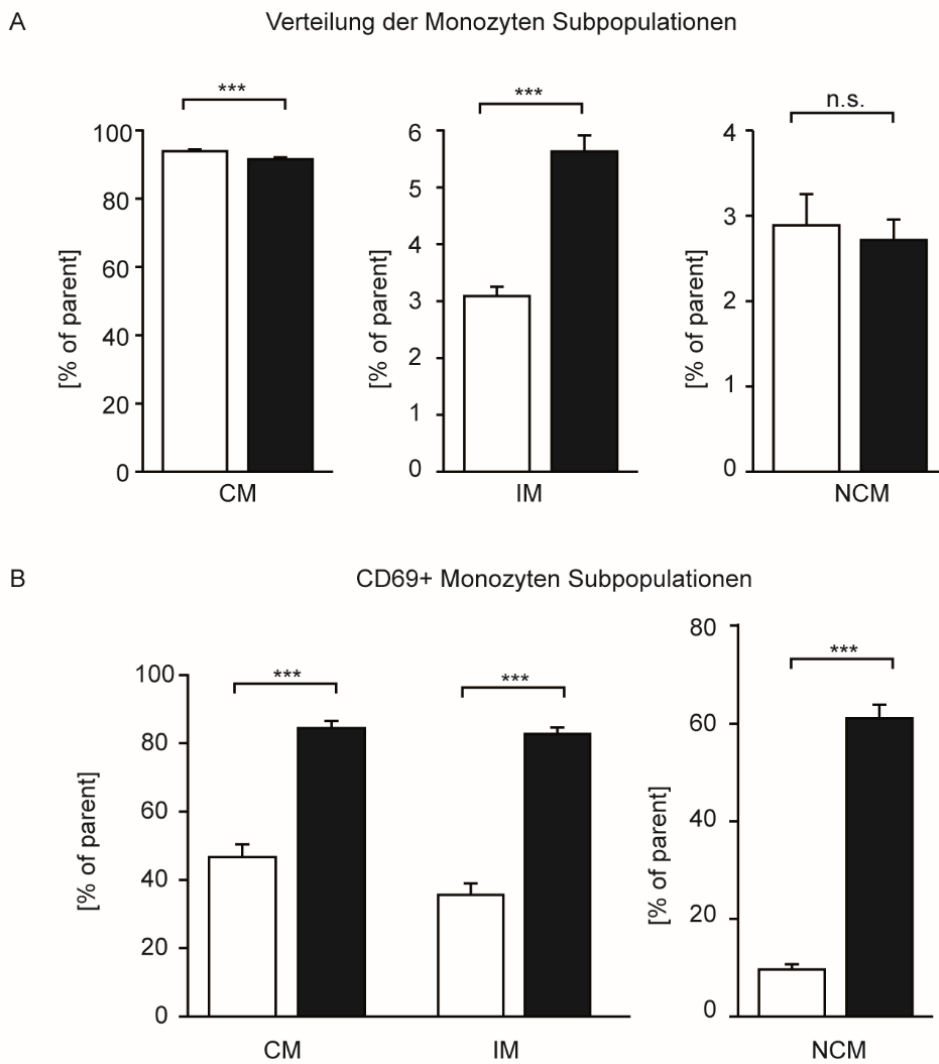


Abbildung 11: Merkmale von Monozyten Aktivierung; A: Distribution der Monozyten- Subpopulationen; **B:** Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf Monozyten; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$; (CM: classical monocytes; IM: intermediate monocytes; NCM: non- classical monocytes)

4.2.2 Monozyten von Dialysepatienten zeigen eine veränderte Expression von Rezeptoren für die Antigenpräsentation

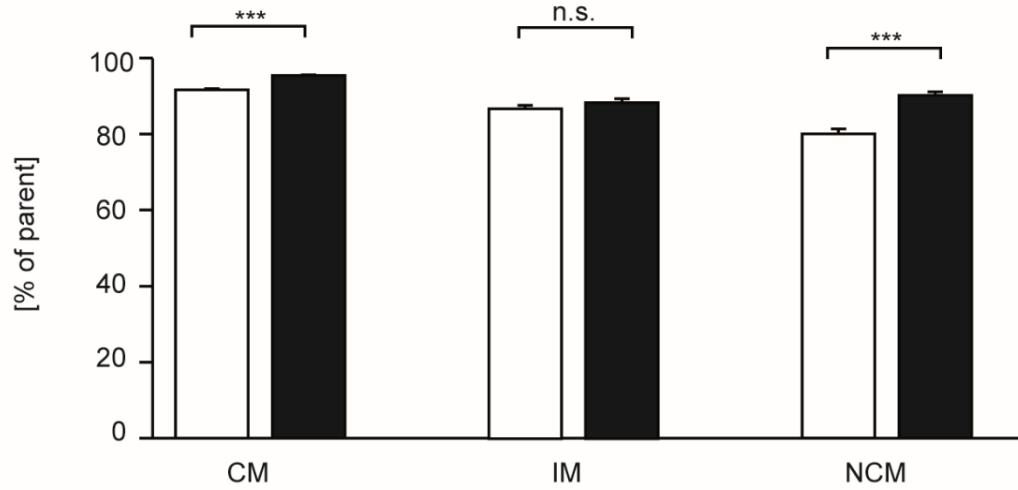
Eine verminderte Fähigkeit zur Antigenpräsentation ist eines der wichtigsten Merkmale der Immunparalyse in der Sepsis. Aus diesem Grund untersuchten wir mittels Durchflusszytometrie von 67 HD- Patienten und 67 alters- und geschlechts- gematchten gesunden Kontrollen die Zelloberfläche von Monozyten auf die Expression der für die Antigenpräsentation wichtigen Rezeptoren HLA- DR sowie CD86.

In der HD- Gruppe zeigte sich in unserer Untersuchung eine erhöhte Frequenz von HLA- DR⁺ CM sowie HLA- DR⁺NCM (Abb. 12A)

Es zeigten sich hingegen weniger CD86⁺ CM in der HD- Gruppe, verglichen mit den gesunden Kontrollen (Abb. 12B). In der IM- Subpopulation zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen.

□ Gesunde Kontrollen ■ HD- Patienten

A HLA- DR+ Monozyten- Subpopulationen



B CD86+ Monozyten- Subpopulationen

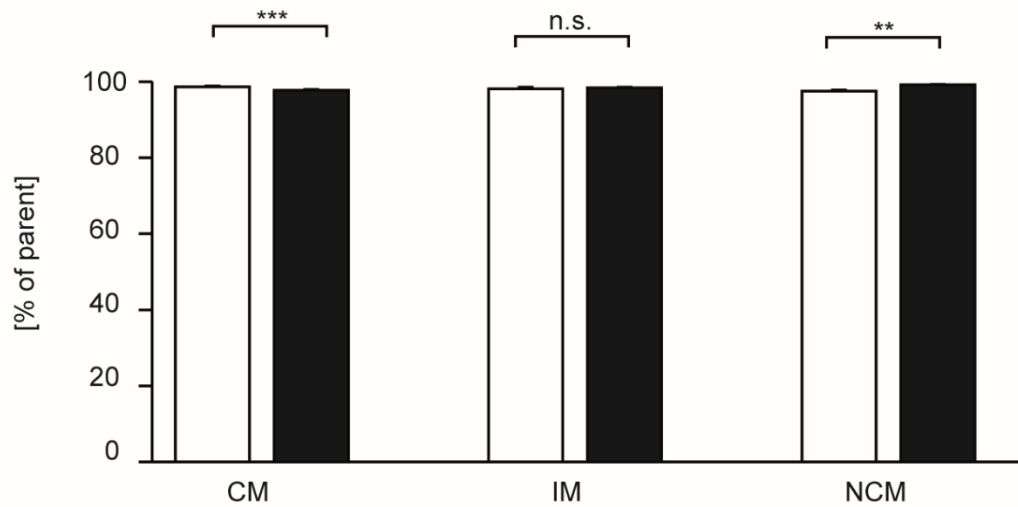


Abbildung 12: Expression der für die Antigenpräsentation notwendigen Rezeptoren; A: HLA-DR auf Monozyten; B: CD86 auf Monozyten, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; *: $p < 0,001$**

4.2.3 Monozyten von Dialysepatienten exprimieren vermehrt Rezeptoren der Immunparalyse

Als Träger des Liganden für den Koinhibitor PD-1 auf T- Zellen, PDL-1, können Monozyten zudem die T- Zell- Funktion unterdrücken. Auch kommt es in der Immunparalyse zu einem vermehrten Vorkommen von Exhaustionmarker (PD-1 und Tim-3)- positiven Monozyten

Wir bestimmten daher mittels Durchflusszytometrie PD-1, PDL-1 sowie Tim-3 auf der Oberfläche aller drei Monozytenpopulationen von 67 HD- Patienten und 67 alters- und geschlechts- gematchte gesunde Kontrollen.

Wir fanden in der HD- Gruppe signifikant mehr PD-1⁺ und PDL-1⁺ CM sowie IM. Zwischen den NCM beider Gruppen fanden sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 13A und 13C). Zudem fanden sich signifikant mehr Tim-3⁺ CM, IM und NCM in der HD- Gruppe (Abb. 13B).

□ Gesunde Kontrollen ■ HD- Patienten

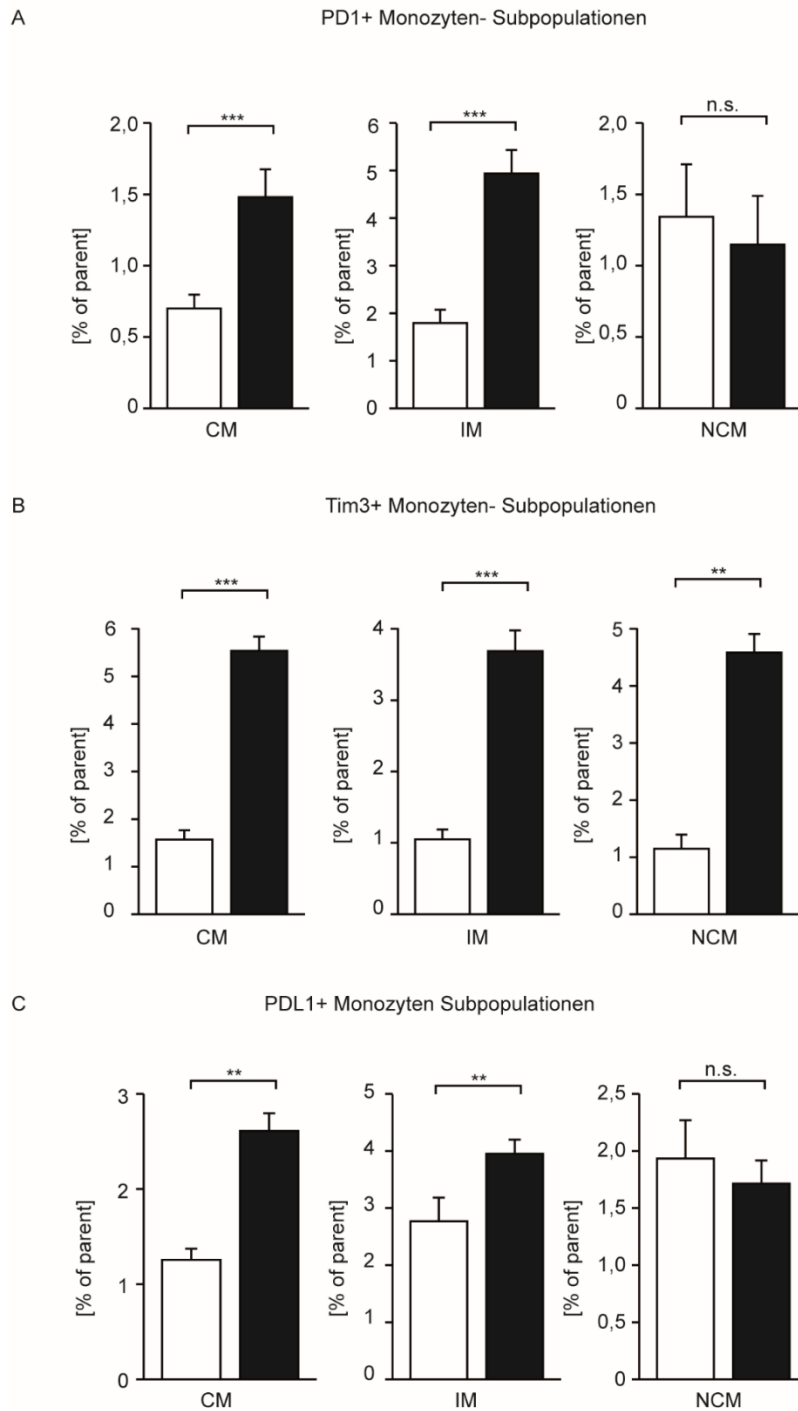


Abbildung 13: Marker der Immunparalyse auf Monozyten; A: PD-1 auf Monozyten; B: Tim-3 auf Monozyten; C: PDL-1 auf Monozyten; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; *: $p < 0,001$**

4.2.4 Dialysepatienten zeigen erhöhte Serum- Konzentrationen von pro-inflammatorischen akute- Phase- Proteinen und Zytokinen

Da sich in der Monozyten- Oberflächenphänotypisierung Zeichen der Aktivierung zeigten, stellte sich uns die Frage, ob sich dies auch in einem veränderten Serum- Milieu manifestieren würde. Wir vermuteten, dass im Serum von HD- Patienten erhöhte Konzentrationen der Monozyten- abhängigen Zytokine IL- 6, das von IL-6 induzierte CRP und die monozytären Chemokine „monocyte chemoattractant protein-1“ (MCP-1), „chemokine ligand 5“ (CCL5) und IL-8 zu finden wären.

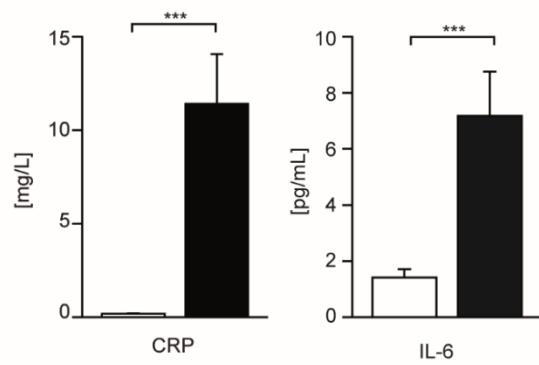
Wir verglichen daher mittels Bead Array die Konzentrationen dieser Mediatoren im Serum von 70 HD- Patienten versus 70 alters- und geschlechts- gematchten gesunde Kontrollen.

Es zeigte sich, dass verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe im Serum von HD- Patienten signifikant höhere Konzentrationen von IL-6 vorlagen. Damit übereinstimmend zeigte sich in bei HD- Patienten im Vergleich mit den gesunden Kontrollen auch CRP signifikant erhöht (Abb. 14A).

Ebenso erwiesen sich die Serumkonzentrationen der Chemokine IL-8, CCL-5 und IP-10 in der HD- Gruppe als signifikant erhöht (Abb. 14B).

□ Gesunde Kontrollen ■ HD- Patienten

A



B

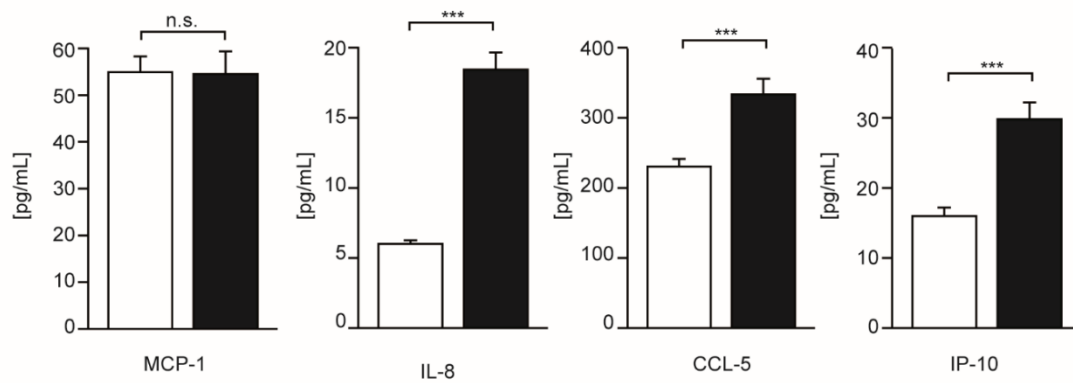


Abbildung 14: Pro- inflammatorische Biomarker; A: Interleukin-6 und das von ihm induzierte das akute- Phase-Protein CRP; **B:** Chemokine MCP-1, IL-8, CCL-5 und IP-10; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$

4.2.5 Auf Monozyten korreliert Expression von Markern der Immunparalyse mit Expression von Markern der Inflammation

Verschiedene Monozytenpopulationen exprimierten in unseren Untersuchungen sowohl vermehrt Marker der Immunparalyse wie PDL-1, PD-1 und Tim-3 sowie Marker der Aktivierung wie CD69. Um den vermuteten Zusammenhang beider Phänomene zu untersuchen, führten wir bivariate Korrelationen zwischen den jeweiligen Markern durch. Hier zeigte sich, dass die Tim-3 Expression von CM sowie NCM mit der Expression des Aktivierungsmarkers CD69 korrelierte (Abb. 15A). Weiterhin korrelierte auf CM die Expression von PD-1 mit der Expression von CD69 (Abb. 15B).

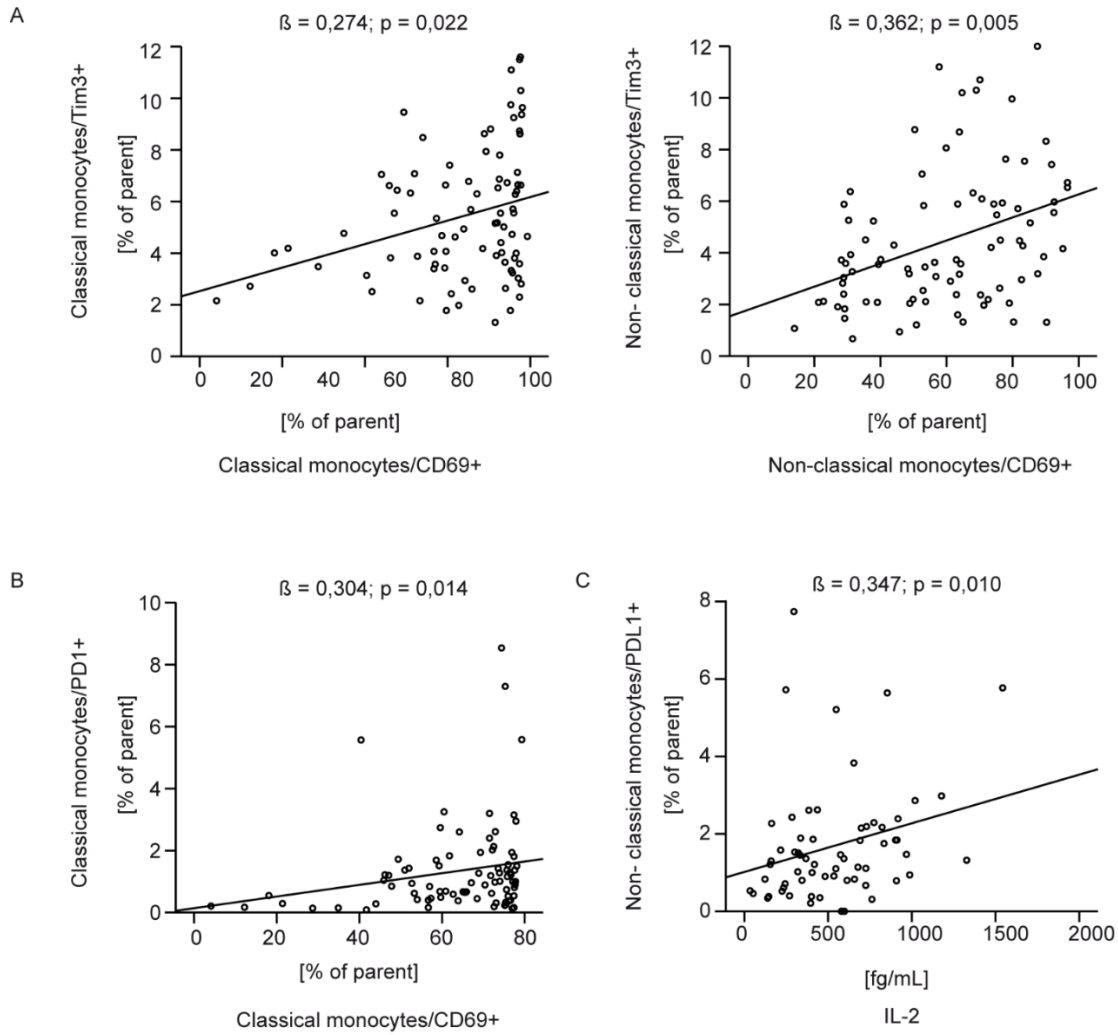


Abbildung 15: Korrelation von Markern der Immunparalyse auf Monozyten mit Markern der Inflammation; A: Korrelation von Tim-3 mit CD69; B: Korrelation von PD-1 mit CD69; C: Korrelation von PD-L1 mit IL-2

4.2.6 T- Zellen von Dialysepatienten zeigen eine Verschiebung zu älteren T- Gedächtniszell- Generationen

Wie einleitend erwähnt existieren unterschiedlich Entwicklungsstadien der T- Gedächtniszellen, wobei deren Alterung unter anderem durch rezidivierende Aktivierung bedingt ist (Abb.2). Um die Verteilung bei HD- Patienten näher zu charakterisieren quantifizierten wir mittels Durchflusszytometrie die jeweiligen Subpopulationen bei 74 HD- Patienten und 74 alters- und geschlechts- gematchten gesunden Kontrollen. Das Expressionsmuster der beiden Oberflächenmoleküle CD45RO und CCR7 erlaubt die Unterteilung in naive (T- naive), central memory (T- cm), effector memory (T-em) und terminal differenzierten Gedächtniszellen (T-emra bzw.) (Boots et al., 2013).

Bei den CD4⁺ T- Zellen zeigte sich in der HD- Gruppe eine signifikant kleinere T- naive Population einhergehend mit signifikant größeren Populationen der T- em und T- emra (Abb. 16A).

Eine ähnliche Tendenz war bei den CD8⁺ T- Zellen zu beobachten. In der HD- Gruppe waren die T- cm und T- em- Populationen signifikant kleiner als in der Kontrollgruppe, die T- emra Gedächtniszellpopulationen hingegen signifikant größer (Abb. 16B).

□ Gesunde Kontrollen ■ HD- Patienten

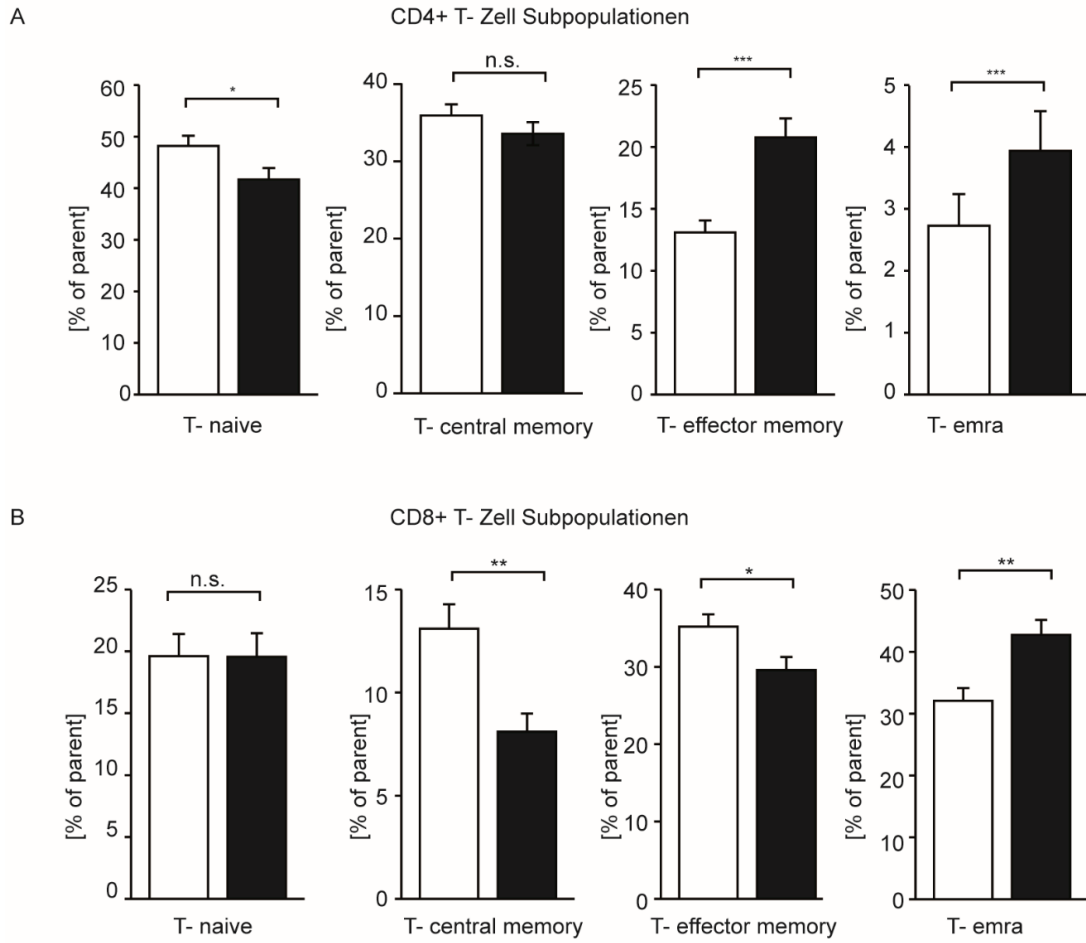


Abbildung 16: Distribution der T- Gedächtniszellen; A: Subpopulationen der CD4⁺ T- Helferzellen; **B:** Subpopulationen der CD8⁺ T- Killerzellen; *: p < 0,05; **: p < 0,005; ***: p < 0,001

4.2.7 Ältere T- Zell Generationen exprimieren auch in gesunden Kontrollen weniger Korezeptoren und vermehrt Marker der T- Zell- Erschöpfung

Um die Bedeutung der in der vorherigen Untersuchung beobachteten Generations-Verschiebung näher zu beleuchten entschieden wir uns dafür, die einzelnen T- Gedächtniszellpopulationen näher zu charakterisieren. Uns interessierte, ob auch physiologisch, also auch bei gesunden Probanden, Unterschiede zwischen den verschiedenen Gedächtniszell- Populationen hinsichtlich ihres Korezeptorprofils zu beobachten wären.

Wir untersuchten daher die Expression des stimulatorischen bzw. inhibitorischen Korezeptors CD28 bzw. PD-1 auf T- Zellen von 74 gesunden Kontrollprobanden und verglichen diese zwischen den unterschiedlichen Generationen.

Hier zeigte sich, dass sich bei den älteren (T- em und T- emra) CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszell- Generationen signifikant weniger CD28⁺ T- Zellen fanden als bei den jüngeren (T- naive und T- cm). Am wenigsten CD28⁺ T- Zellen fanden sich sowohl bei CD4⁺ als auch CD8⁺ Zellen bei den T- emra Subpopulationen. Verglichen mit naiven T- Zellen exprimierten von den terminal differenzierten Gedächtniszellen nur noch rund ein Viertel der Zellen CD28 (Abb. 17A). Zudem fanden sich in den älteren Generationen zunehmend mehr PD-1⁺ T- Zellen. Die meisten PD-1⁺ Zellen fanden sich sowohl bei CD4⁺ als auch CD8⁺ Zellen bei den T- em- Gedächtniszellen (Abb. 17B).

□ T- naive ■ T- central memory ■ T- effector memory ■ T- emra

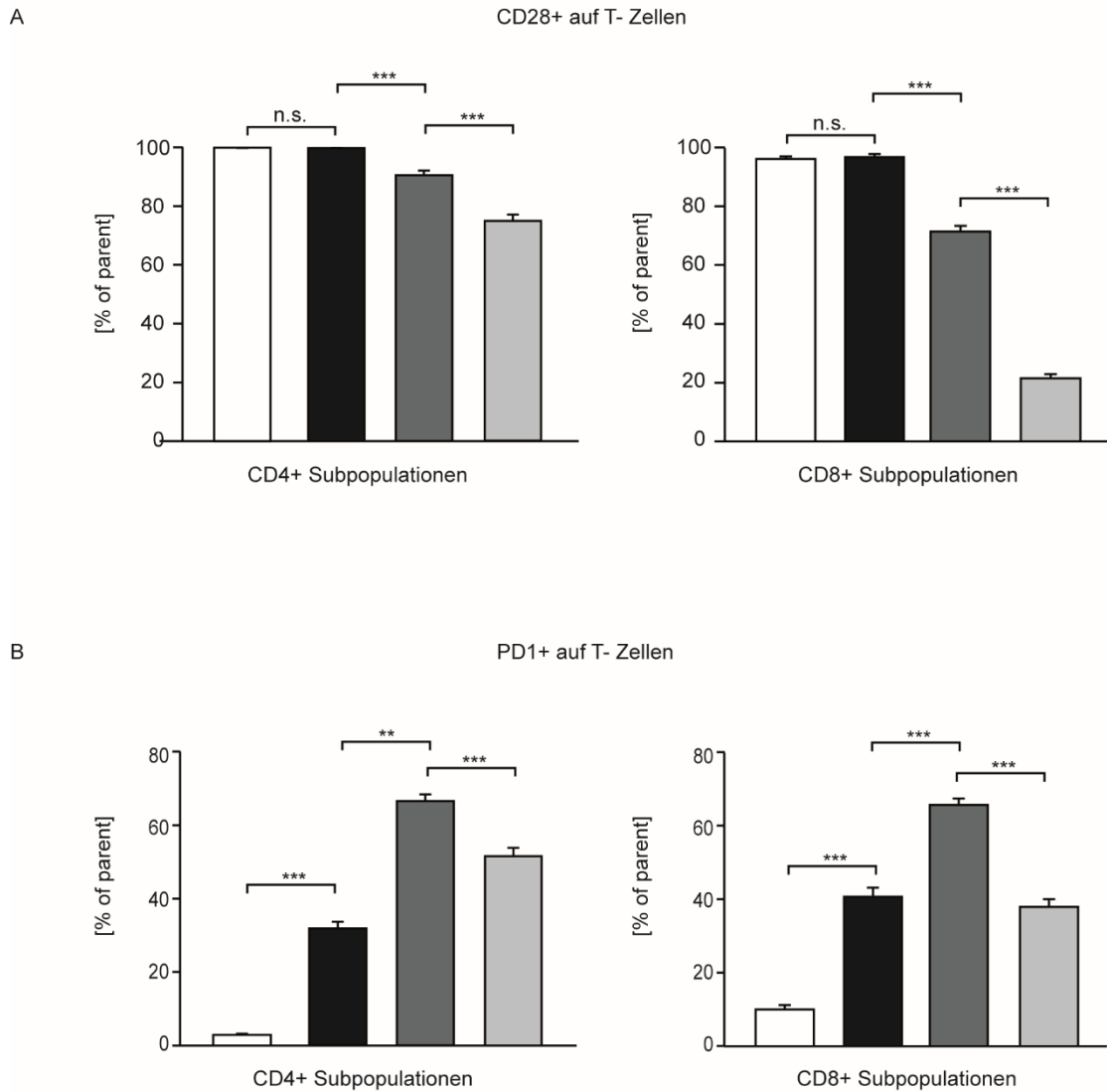


Abbildung 17: Korezeptorprofil von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gesunder Probanden; A: CD28 auf T-Gedächtniszellpopulationen; **B:** PD1 auf T- Gedächtniszellpopulationen; *: p < 0,05; **: p < 0,005; ***: p < 0,001

4.2.8 T- Zellen von Dialysepatienten zeigen vermehrt Zeichen von Aktivierung

Uns stellte sich die Frage, ob es bei T- Zellen ebenfalls zu einer dauerhaften Aktivierung kommt, weshalb wir von 74 HD- Patienten sowie 74 alters- und geschlechts- gematchten gesunden Kontrollen die Zelloberflächen von CD4⁺ T- Helferzellen sowie CD8⁺ T- Killerzellen und deren Gedächtniszell- Populationen mittels Durchflusszytometrie auf zwei Aktivierungsmarker untersuchten: CD69 wird auch auf T- Zellen innerhalb von wenigen Stunden nach Aktivierung auf der Zelloberfläche exprimiert und ist somit ein früher Aktivierungsmarker, CD25 hingegen dient der Aufrechterhaltung der Effektorfunktion und ist somit ein später Aktivierungsmarker (Reddy, Eirikis, Davis, Davis, & Prabhakar, 2004).

Wir fanden in der HD- Gruppe signifikant mehr CD25⁺ und CD69⁺ naive und central memory CD4⁺ T- Helferzellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zudem fanden sich in der HD- Gruppe signifikant mehr CD25⁺ effector- memory CD4⁺ T- Helferzellen (Abb. 18A).

Einige Subpopulationen der CD8⁺ T- Killerzellen zeigten ebenso Zeichen von sowohl früher als auch anhaltender Aktivierung. So fanden sich in der HD- Gruppe in allen Subpopulationen signifikant mehr CD25⁺ CD8⁺ T- Killerzellen. Eine größere Zahl CD69⁺ CD8⁺ T- Killerzellen konnte wir bei HD- Patienten hingegen nur bei den central memory und terminal differenzierten CD8⁺ T- Killerzellen beobachten (Abb. 18B).

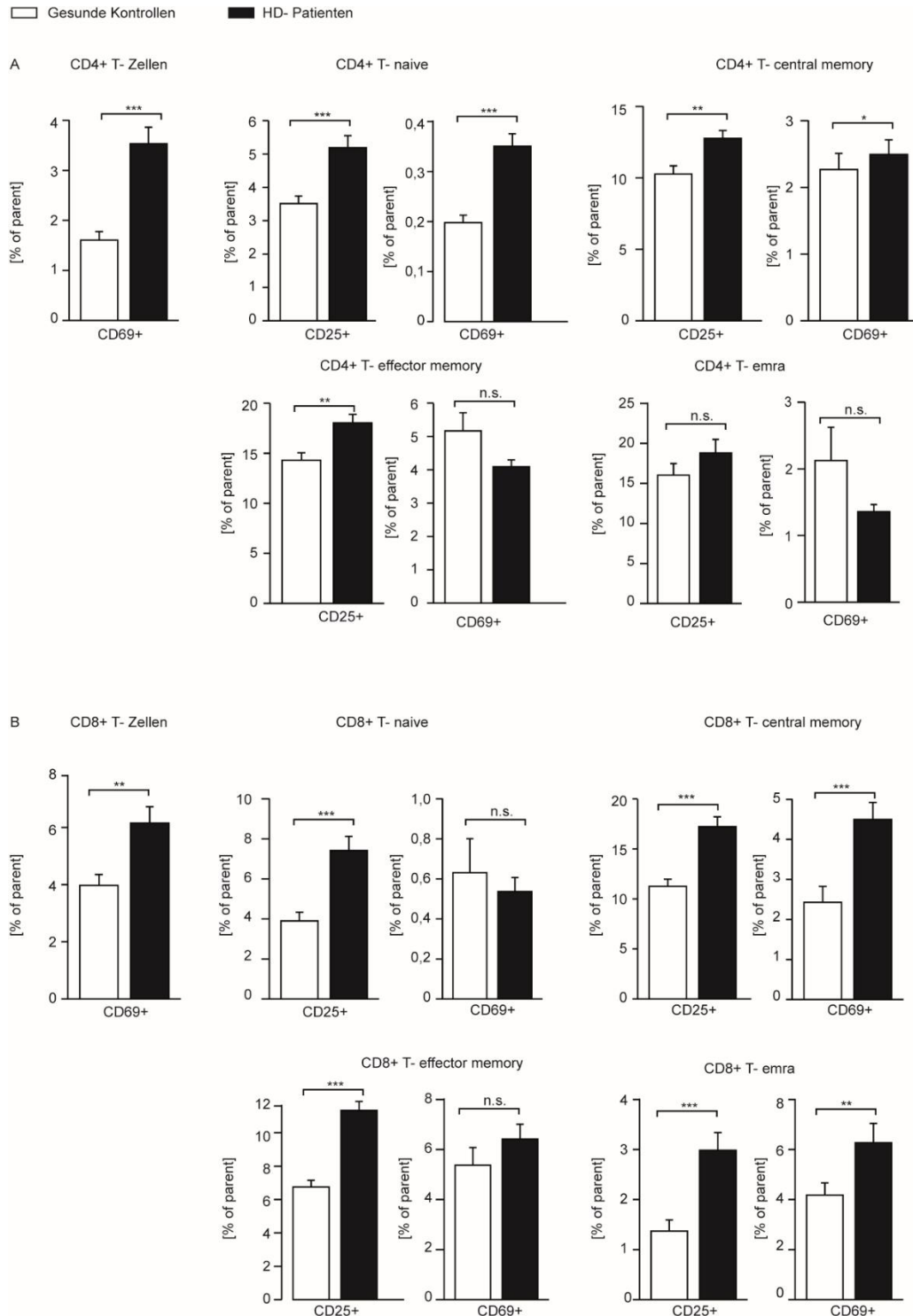


Abbildung 18: T- Zellen zeigen Zeichen von früher und später Aktivierung; A: Aktivierungsmarker auf CD4⁺ T- Helferzell- Subpopulationen; **B:** Aktivierungsmarker auf CD8⁺ T- Killerzell- Subpopulationen; *: p < 0,05; **: p < 0,005; ***: p < 0,001

4.2.9 Bei Dialysepatienten bestehen mehr CD28- negative CD4⁺ T- Helfer- und CD8⁺ T- Killerzellen

Als nächstes stellte sich uns die Frage, ob T- Zellen auch Veränderungen der Aktivierungsempfänglichkeit zeigen würden. Hierzu verglichen wir mittels

Durchflusszytometrie die Häufigkeit CD28- negativer T- Zellen von 74 HD- Patienten versus 74 alters- und geschlechts- gematchte gesunde Kontrollen. Hier zeigte sich sowohl in der gesamten Population der CD4⁺ Zellen als auch in den einzeln betrachteten CD4⁺ Subpopulationen signifikant mehr CD28- negative CD4⁺ T- Zellen als in der Kontrollgruppe (Abb. 19A). Ferner zeigten sich in der Gesamtpopulation der CD8⁺ T- Zellen der HD- Gruppe signifikant mehr CD28- negative T- Killerzellen, bei Einzelbetrachtung der Subpopulationen zeigten sich jedoch nur bei den T- em- CD8⁺ T- Zellen eine signifikant höhere Frequenz von CD28- negativen Zellen (Abb. 19B).

□ Gesunde Kontrollen ■ HD- Patienten

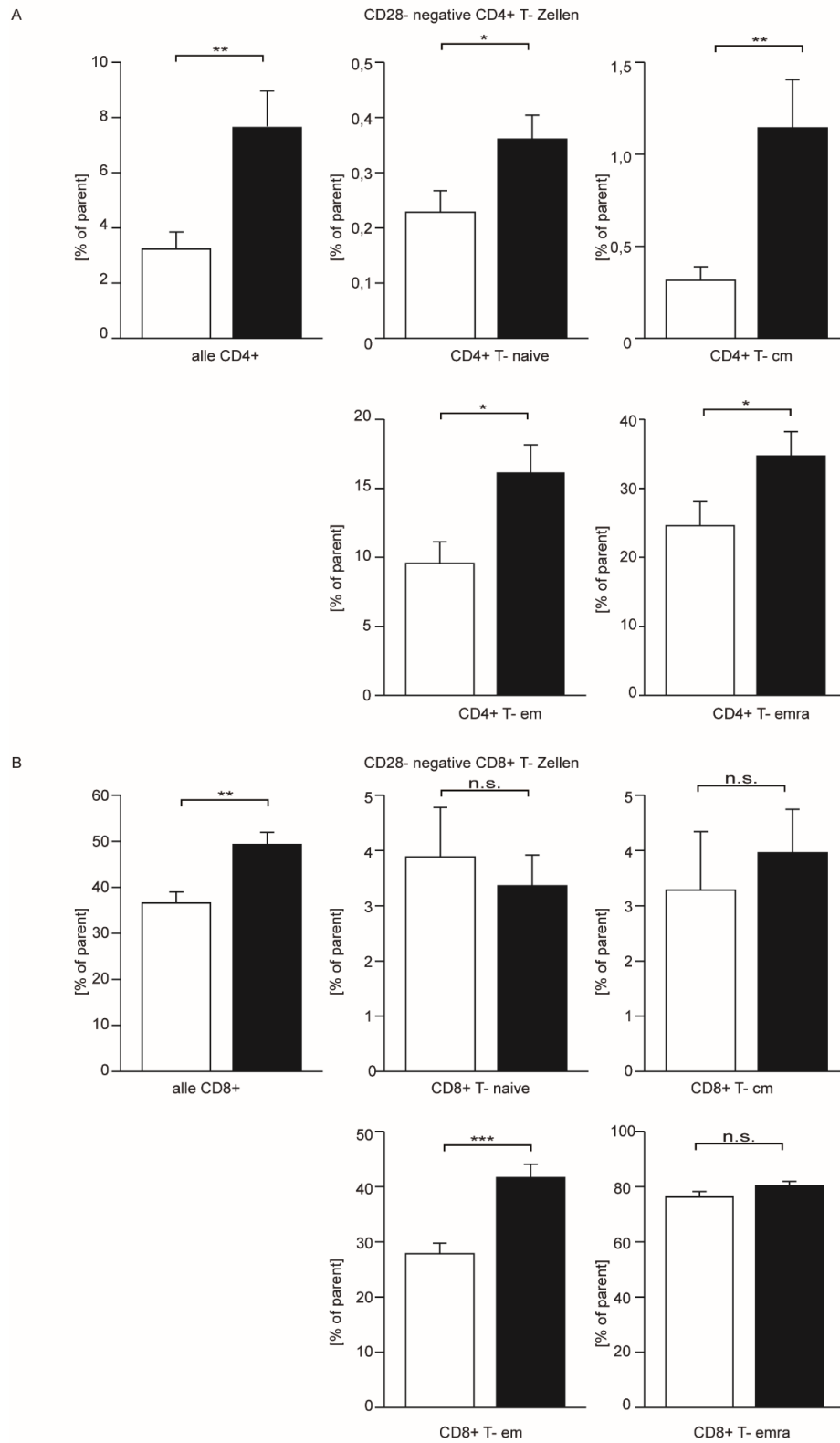


Abbildung 19: CD28- negative T- Zellen; A:CD4⁺ T- Helferzellen; B: CD8⁺ T- Killerzellen

4.2.10 Verlust von CD28 auf T- Zellen korreliert mit zellulären und löslichen Markern der Inflammation

In unseren vorherigen Untersuchungen zeigte sich bei HD- Patienten ein vermehrtes Vorkommen CD28- negativer T- Zellen. Aufgrund dem bei anderen chronisch-inflammatorischen Krankheitsbildern auftretende CD28 Verlust, der mit einer Erhöhung von pro- inflammatorischen Zytokinen assoziiert ist, untersuchten wir ob sich auch in unserem HD- Kollektiv eine Korrelation zwischen der Häufigkeit CD28⁺- T- Zellen und Serum- Konzentrationen von IL-6, IL-8, CCL5 oder IP-10 finden würde.

Es zeigte sich, dass die Häufigkeit CD28⁺ T- Zellen der gesamten CD4⁺ Zellen negativ mit der Serum- Konzentration des Chemokins IP-10 korrelierte. In den Subpopulationen der CD4⁺ Zellen zeigte sich dieser Effekt nur in den effector memory T- Zellen (Abb. 20A).

Auf naiven T- Zellen korrelierte zudem die Häufigkeit von CD28⁺ CD4⁺ Zellen- negativ mit dem Aktivierungsmarker CD69 (Abb. 20B)

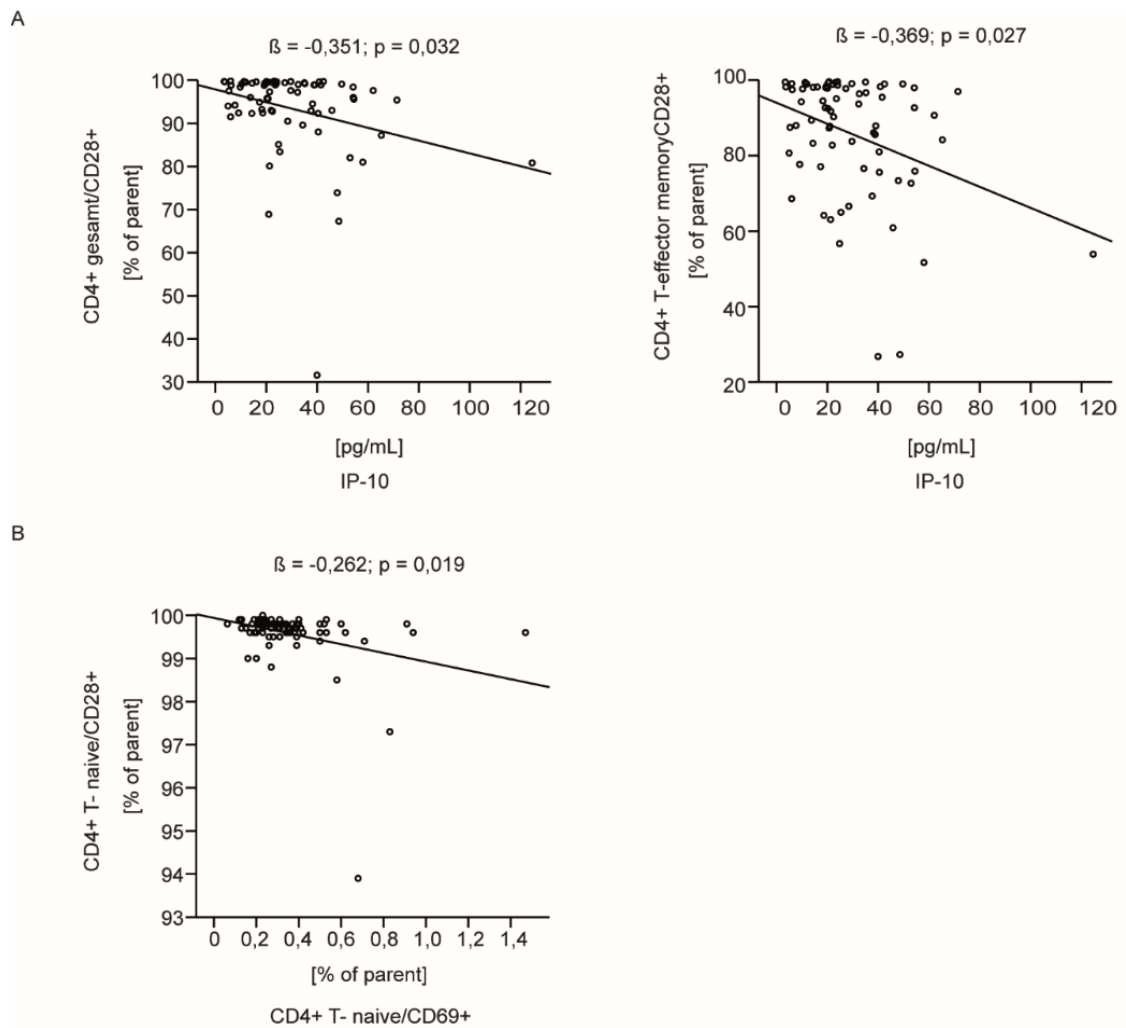


Abbildung 20: Korrelation von CD28- Verlust auf CD4⁺T. Helferzellen mit Markern der Inflammation; A: Korrelation von CD28 auf CD4⁺ T- Zellen mit IP-10; B: Korrelation des Aktivierungsmarkers CD69 mit CD28 auf naiven T- Zellen

4.2.11 Dialysepatienten zeigen keine konsistente Vermehrung Exhaustionmarker-positiver T-Zellen.

Bei der klassischen T-cell-exhaustion kommt es zu einer gleichzeitigen Überexpression mehrerer Koinhibitoren wie PD-1, CTLA-4 und Tim-3 auf T-Zellen. Wir untersuchten daher die Oberfläche von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von 74 HD-Patienten und 74 alters- und geschlechts-gematchten gesunden Kontrollen auf diese Koinhibitoren mittels Durchflusszytometrie.

In der HD-Gruppe fanden sich signifikant mehr PD-1⁺ CD4⁺ T-naive und T-cm Zellen (Abb. 21A). Hingegen fanden sich in der HD-Gruppe signifikant weniger CTLA-4⁺ und Tim-3⁺ CD4⁺ T-Zellen (Abb. 21B und 21C). Hinsichtlich der CD8⁺ T-Killerzellen fanden sich in der HD-Gruppe signifikant weniger PD-1⁺ T-cm Zellen (Abb. 21A). Zudem zeigten sich in der HD-Gruppe signifikant weniger CTLA4⁺ und Tim-3⁺ CD8⁺ T-Zellen (Abb. 21B und 21C)

□ Gesunde Kontrollen ■ HD- Patienten

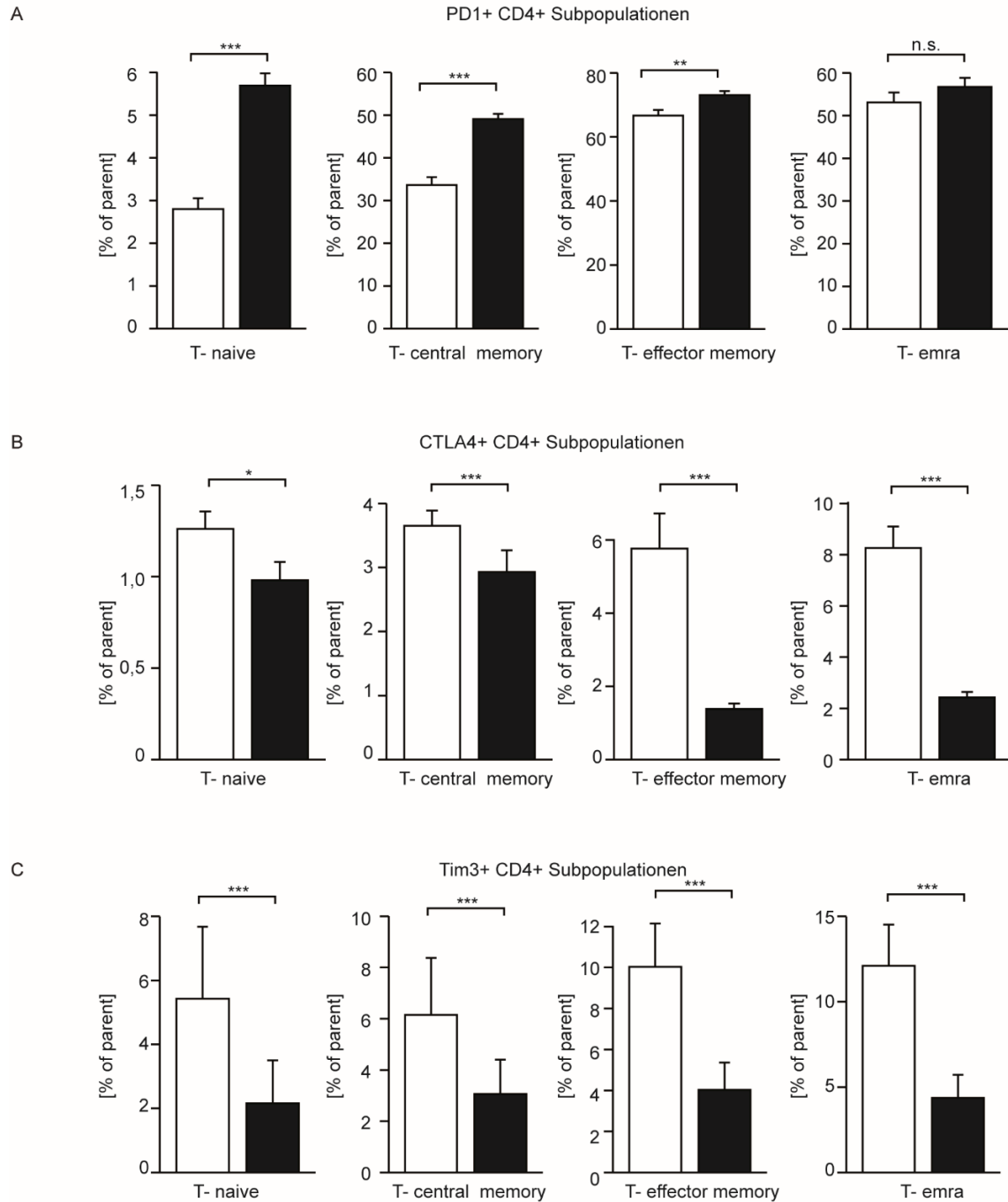


Abbildung 21: Marker der Immunparalyse auf CD4+ T- Helferzellen; A: PD-1- auf CD4+ T- Zell Subpopulationen; B: CTLA-4 auf CD4+ T- Zell Subpopulationen; C: Tim-3- auf CD4+ T- Zell Subpopulationen; *: p < 0,05; **: p < 0,005; *: p < 0,001**

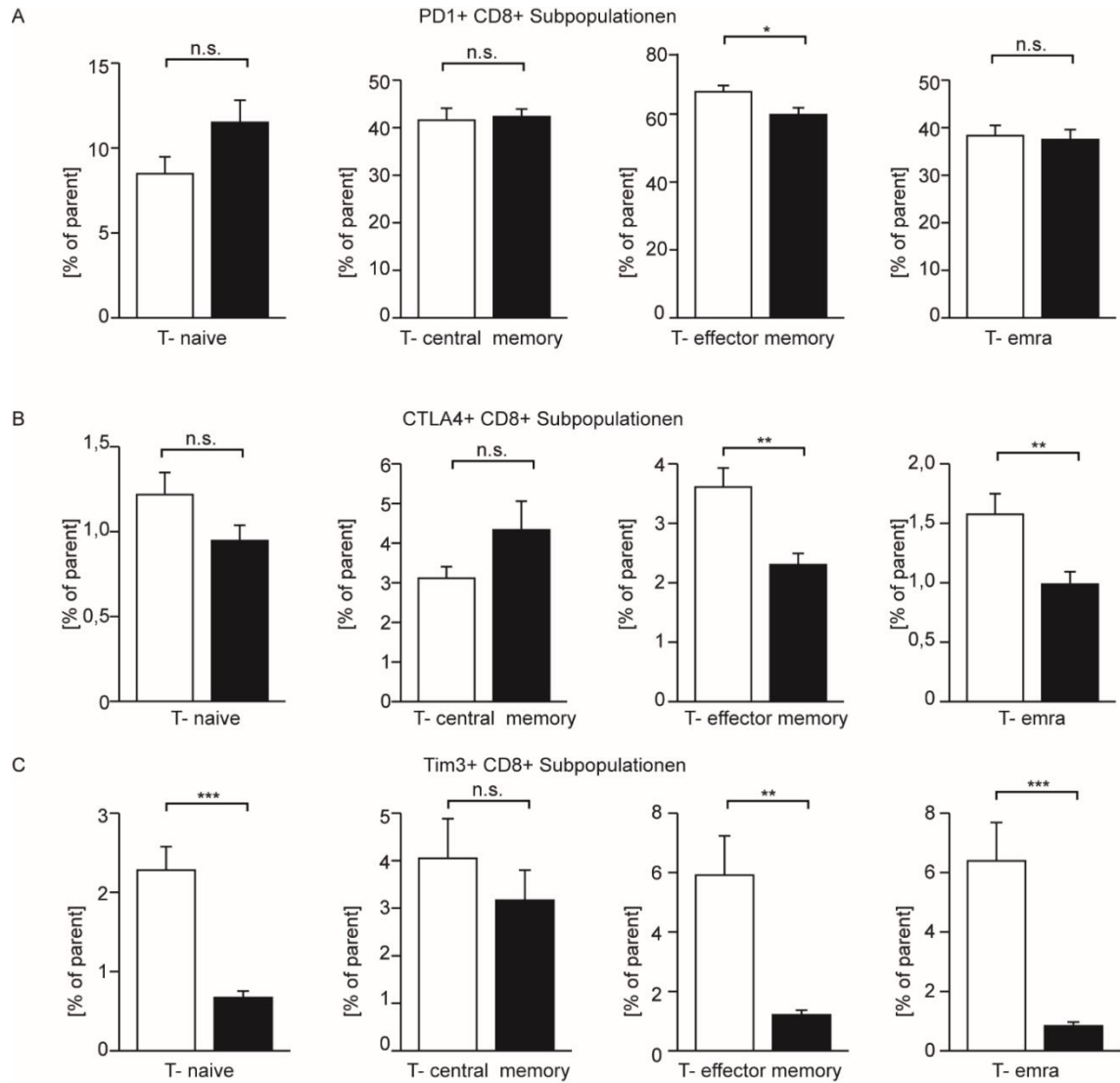


Abbildung 22: Marker der Immunparalyse auf CD8+ T- Killerzellen; A: PD-1- auf CD4+ T- Zell Subpopulationen; B: CTLA-4 auf CD4+ T- Zell Subpopulationen; C: Tim-3- auf CD4+ T- Zell Subpopulationen; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; *: $p < 0,001$**

4.2.12 Marker der T- Zell- Erschöpfung korrelieren mit Markern der T- Zell- Aktivierung

Als nächstes stellte sich uns die Frage, ob auch auf T- Zellen die häufigere Expression von Markern der Immunparalyse mit der von zellulärer Aktivierung assoziiert sein würde. Hierzu führten wir eine Korrelation nach Pearson bzw. Spearman durch und adjustierten mittels multipler linearer Regression. Es zeigte sich, dass auf naiven CD4⁺ T- Zellen der Koinhibitor PD-1 mit den Aktivierungsmarkern CD25 und CD69 signifikant korrelierte (Abb. 23).

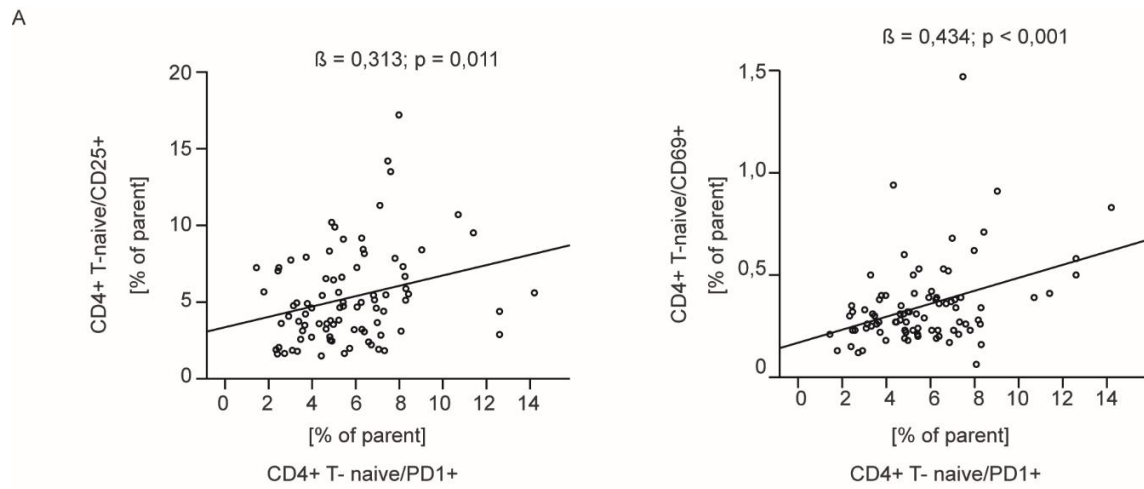


Abbildung 23: Korrelationen zwischen T- Zell- Erschöpfungsmarkern und Aktivierungsmarkern auf CD4⁺ T- Helferzellen; A und B: Korrelation von PD1 mit CD25 bzw. CD69 auf CD4⁺ T- Zellen

4.2.13 HD- Patienten zeigen trotz verstärkter T- Zell- Aktivierung niedrigere Serumkonzentrationen von T- Zell- typischen Zytokinen

Nachdem sich zeigte, dass T- Zellen zwar einen aktivierten Phänotyp, zugleich aber ein teils inhibitorisches Rezeptorprofil exprimierten, interessierte uns wie sich diese Veränderungen im basalen Zytokinmilieu manifestieren würden. Aus diesem Grund untersuchten wir das Serum unserer Probanden auf das T- Zell- spezifische IL-2, welches der Aufrechterhaltung der T- Zell- Effektorfunktion nach einer Aktivierung dient. Ebenso untersuchten wir das Serum auf IFN- γ , ein typisches, wenngleich nicht spezifisches T- Zell- Zytokin, über das T- Helferzellen die Funktion zahlreicher anderer Leukozyten regulieren. Wir führten diese Untersuchung mittels Bead- Array im Serum von 70 HD- Patienten und 70 alters- und geschlechts- gematchte gesunde Kontrollen.

Es zeigte sich, dass die durchschnittlichen Serumkonzentrationen sowohl von IFN- γ von als auch von IL- 2 in der HD- Gruppe signifikant niedriger lagen als in der Kontrollgruppe (Abb. 24).

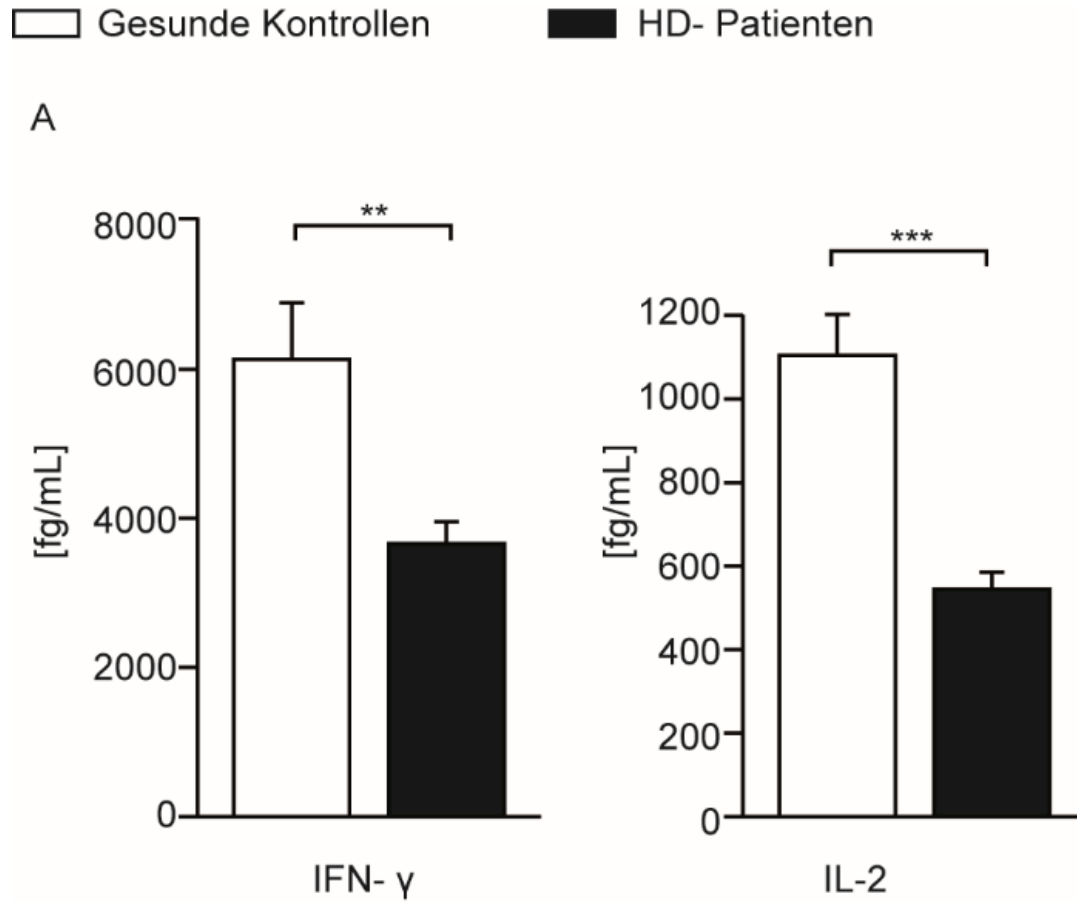


Abbildung 24: T- Zell- typische Zytokine IL-2 und IFN- γ ; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$

4.2.14 T- Helferzellen von Dialysepatienten zeigen nach Stimulation keine Interferon- Antwort

In vorigen Untersuchungen zeigte sich hinsichtlich der T- Zellen trotz Aktivierung eine geringere Menge an T- Zell- typischen Zytokinen im Serum der HD- Patienten. Da Serum- Untersuchungen von IFN- γ jedoch keine sicheren Rückschlüsse auf die Herkunft dieses Zytokins erlauben, unterzogen wir die T-Zellen einer 16- stündigen in- vitro- Stimulation mit anschließender intrazellulärer IFN- γ – Markierung und durchflusszytometrischer Untersuchung. Wir verwendeten dazu kryokonservierte PBMCs von 59 HD- Patienten sowie von 58 alters- und geschlechts- gematchten gesunden Kontrollen.

Nach der Stimulation blieb eine signifikante IFN- γ - Antwort der CD4⁺ T- Zellen von HD- Patienten aus, während T- Zellen der gesunden Kontrollen nach Stimulation eine signifikant stärkere IFN- γ – Produktion zeigten (Abb. 25).

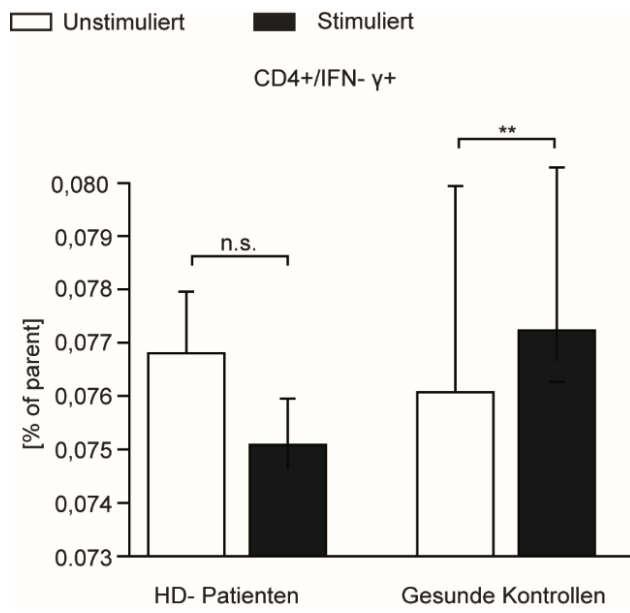


Abbildung 25: Interferon- γ - Antwort von CD4+ T- Helferzellen; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; *: $p < 0,001$**

4.2.15 T-Zellen von Dialyse- Patienten zeigen nach Stimulation eine Typ 2 T- Helferzell- typische Zytokinantwort

Eine IFN- γ - Antwort von T- Helferzellen ist spezifisch für Typ 1 T- Helferzellen. Da diese im Stimulationsversuch ausblieb, vermuteten wir, dass naive T- Zellen entsprechend der Immunparalyse auf einen Aktivierungsreiz mit einer Polarisierung in Richtung der Th-2- Zellen reagieren. Aus diesem Grund führten wir das Stimulationsexperiment ebenso mit einer anschließenden intrazellulären Färbung der Th2- typischen Zytokine IL-4 und IL-10 durch.

Es zeigte sich, dass stimulierte CD4⁺ T- Zellen der HD- Gruppe verglichen mit stimulierten CD4⁺ T- Zellen der Kontrollgruppe in der Tat signifikant mehr IL-4 und IL-10 produzierten (Abb. 26A). Auch stimulierte CD8⁺ T- Zellen von HD- produzierten signifikant mehr IL-4 als CD8⁺ T- Zellen der Kontrollgruppe (Abb. 26B).

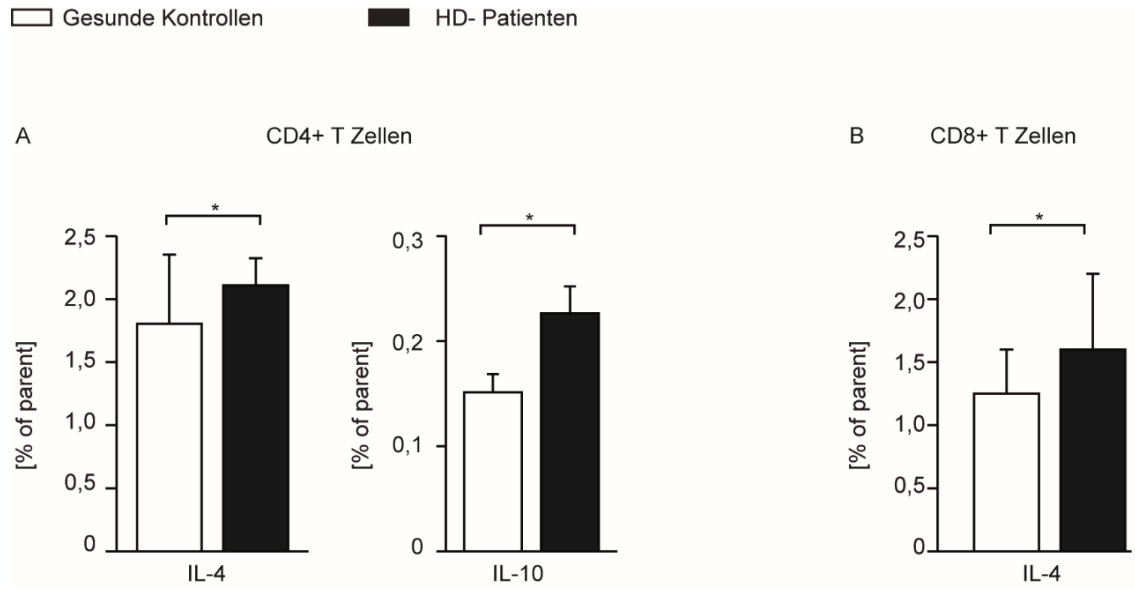


Abbildung 26: Zytokinproduktion nach T- Zell Stimulation; A: Th-2 Antwort von CD4+ T- Helferzellen; **B:** IL-4- Produktion von CD8+ T- Killerzellen; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$

4.2.16 T- Zellen von Dialysepatienten sind auch in ihrer frühen Effektorfunktion eingeschränkt

Naive T- Zellen durchlaufen nach ihrer Aktivierung durch APZ unterschiedliche Stadien, in der sie sukzessive Effektorfunktionen wie Typ- spezifische Zytokinproduktion oder Zytotoxizität gewinnen. Eine frühe und wichtige Funktion von T- Zellen ist außerdem die additive Produktion von TNF- α (Brehm, Daniels, & Welsh, 2005), welches ansonsten in erster Linien von Zellen des angeborenen Immunsystems produziert wird.

Wir stellten uns daher die Frage, ob T- Zellen auch in ihrer frühen, supportiven Rolle eine Störung aufweisen und führten daher die Stimulation mit anschließender intrazellulärer TNF- α Färbung durch.

Es ergab sich, dass sowohl stimulierte CD4⁺ T- Helferzellen als auch CD8⁺ T- Killerzellen weniger TNF- α produzierten als entsprechende T- Zellen der gesunden Kontrollen (Abb. 27A und Abb. 27B). Ein Vergleich innerhalb der HD- Gruppe zwischen 10 HD- Patienten mit und 10 HD- Patienten ohne Infekthistorie zeigte, dass die TNF- α Produktion der CD4⁺ T- Helferzellen der Patienten mit Infekthistorie signifikant niedriger war als derer ohne Infekthistorie (Abb. 27C).

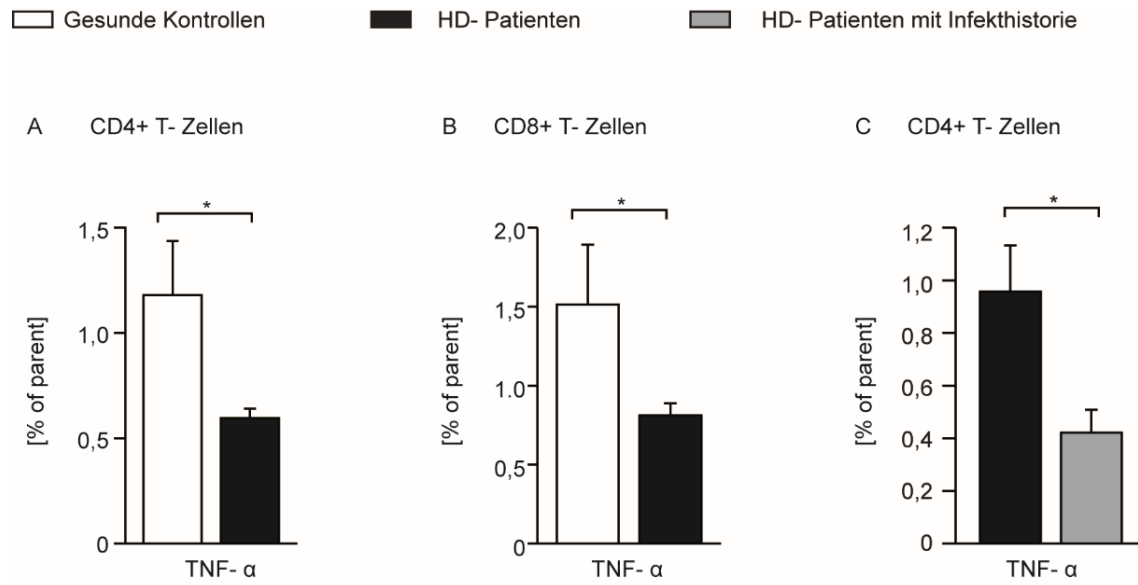


Abbildung 27: TNF- α - Produktion stimulierter T- Zellen; A: TNF- α - Produktion von CD4+ T- Zellen; **B:** TNF- α - Produktion von CD8+ T- Zellen; **C:** TNF- α - Produktion von CD4+ T- Zellen innerhalb des HD-Kollektivs; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$

4.2.17 Serumkonzentrationen von Interleukin-10 und -4 sind bei Dialysepatienten nicht erhöht

Der zentrale Mediator in der Immunparalyse ist das anti- inflammatorische IL-10, weshalb wir vermuteten, dass auch bei HD- Patienten dieses Zytokin basal erhöht sein würde. Auch ist eine Polarisation in Richtung Th2 Zellen ein typisches Phänomen der Immunparalyse, deren Haupteffektormolekül wiederum IL-10 ist. Ebenso untersuchten wir die Serumkonzentration von IL-4, welches eine Differenzierung von naiven in Th-2 Zellen fördert. Wir untersuchten hierzu das Serum von 70 HD- Patienten und 70 alters- und geschlechts- gematchter Patienten mittels Bead- Array.

Die durchschnittliche Serumkonzentration von IL-10 unterschied sich jedoch nicht signifikant in der HD- Gruppe von der unserer gesunden Kontrollgruppe, während die von IL-4 in der HD- Gruppe signifikant niedriger lag (Abb. 28).

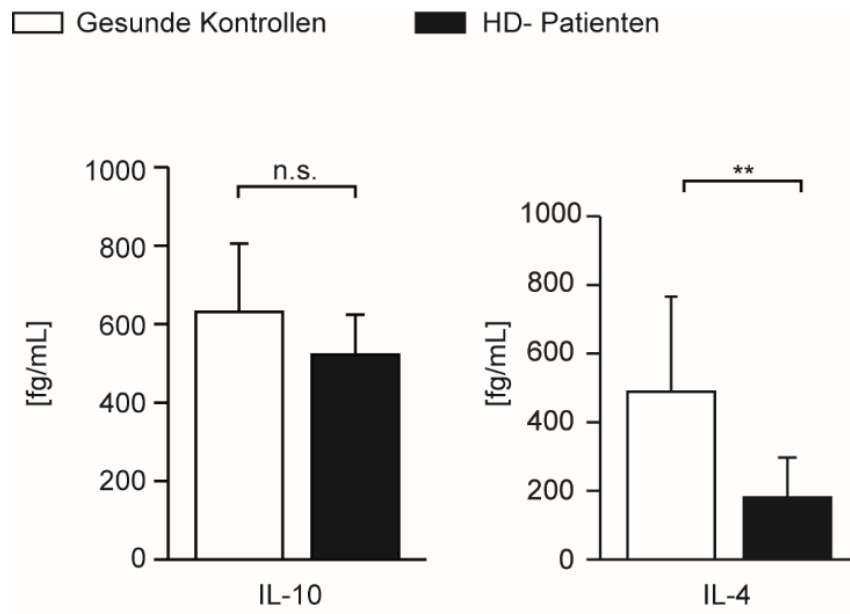


Abbildung 28: Serumkonzentration von Interleukin- 10 und -4; *: p <0,05; **: p<0,005; *: p<0,001**

5 Diskussion

5.1 Monozyten von Hämodialyse- Patienten zeigen keinen reprogrammierten Phänotyp

Monozyten in der Immunparalyse zeigen einen veränderten Phänotyp, der unter dem Begriff „monocyte reprogramming“ zusammengefasst werden kann. Monocyte reprogramming beschreibt einen physiologischen Mechanismus, der bei infektiösen Ereignissen auftritt und zum Ziel hat, Gewebe- bzw. Organschaden aufgrund von massiver Inflammation zu begrenzen. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine durch vorherige Verabreichung von LPS generierte Toleranz bei einer erneuten Infektion protektiv wirken kann (Colletti, Remick, & Campbell, 1994; He et al., 1992; Heemann et al., 2000). Experimentell wird das monocyte reprogramming im Endotoxin- Toleranz- Modell untersucht (Cavaillon & Adib-Conquy, 2006). Zu diesem Zweck verändern Monozyten bzw. Makrophagen, einmal aktiviert, ihre Zytokinantwort nach erneutem Kontakt mit TLR- Agonisten wie LPS und produzieren vermindert pro- inflammatorische und vermehrt anti- inflammatorische Zytokine (Munoz et al., 1991) (Randow et al., 1995). Zudem regulieren sie für die Antigenpräsentation notwendige Oberflächenmoleküle herunter, wodurch sie ihre Funktion als Aktivatoren des adaptiven Immunsystems unterdrücken (Lukaszewicz et al., 2009; Wolk et al., 2007). Logischerweise erhöht sich durch diesen Mechanismus jedoch auch die Empfänglichkeit des Organismus für neuerliche Infektionen.

Dieses Phänomen tritt jedoch nur unter bestimmten Bedingungen auf. Das in vitro Endotoxin- Toleranz- Modell konnte zeigen, dass für das Auftreten des monocyte reprogramming das Vorliegen von 2 Faktoren wesentlich ist: zum einen die prä- Aktivierung der Monozyten und zudem das Bestehen eines anti- inflammatorischen Milieus, das vor allem durch erhöhte Konzentrationen von IL-10 und TGF- β bestimmt wird (Randow et al., 1995). Als Quelle dieser anti- inflammatorischen Mediatoren gelten unter anderem sowohl reprogrammierte Monozyten selber als auch regulatorischen T- Zellen und Typ-2 T- Helferzellen (Saraiva & O'Garra, 2010). Unsere Untersuchungen zeigten, dass es bei HD- Patienten in der Tat zu einer dauerhaften Aktivierung des monozytären Kompartiments kommt. Dies zeigte sich zum einen in der Expansion der pro- inflammatorischen Subpopulation der CD14⁺CD16⁺ bzw. intermediären Monozyten. Dieser Monozyten- Subpopulation wird aufgrund ihrer erhöhten Antigenpräsentationsfähigkeit und verstärkten Zytokinproduktion eine pro- inflammatorische Rolle zugesprochen (Kapellos et al., 2019). Interessanterweise konnte zudem gezeigt werden,

dass Monozyten dieser Klasse nach TLR- Stimulation signifikant mehr IL-10 produzierten als solche der anderen beiden Subpopulationen (Skrzeczynska-Moncznik et al., 2008). Als ein weiteres Zeichen der chronischen Aktivierung der Monozyten kann das erhöhte Aufkommen von CD69⁺ Monozyten gewertet werden, da dieses Oberflächenmolekül frühzeitig nach Aktivierung exprimiert wird und dessen Expression nach 48 Stunden wieder runterreguliert wird (Santos-Alvarez, Goberna, & Sanchez-Margalet, 1999) (Reddy et al., 2004). In Abwesenheit eines Stimulus sollte CD69 also von Monozyten nicht exprimiert werden.

Das klassische Merkmal der Immunparalyse bzw. der reprogrammierten Monozyten, der Verlust von HLA- DR, war jedoch nicht zu beobachten, wengleich geringfügig weniger CD86⁺ klassische Monozyten bei HD- Patienten vorlagen.

Dies legt nahe, dass basal nicht die direkte Antigenpräsentation via HLA- DR gestört ist sondern wenn überhaupt die Kostimulation vonseiten der Monozyten über CD86. Girndt et al. fanden damit übereinstimmend in ihren Studien keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der HLA- DR Expression, wie wir aber eine verminderte Expression von CD86 auf Monozyten (Girndt et al., 2001). Interessanterweise gelang es denselben Autoren in einer älteren Studie, die eingeschränkte T- Zell- Funktion von HD- Patienten wiederherzustellen, indem sie das Signal an CD28 auf T- Zellen mittels Monozyten gesunder Probanden oder Anti- CD28 Antikörpern substituierten (Girndt et al., 1993). Gegenteilig zu unserer Vermutung ließen sich bei HD- Patienten nicht weniger, sondern mehr HLA- DR⁺ Monozyten nachweisen. Im Falle der intermediären Monozyten ist dies nicht überraschend, da bei dieser Subpopulation eine konstitutiv vermehrte Expression typisch ist (Kapellos et al., 2019). Im Kontext der chronischen Inflammation ist die vermehrte HLA- DR- Expression aller Monozytenklassen wahrscheinlich ebenfalls als Zeichen von Aktivierung zu werten, da Monozyten nach Aktivierung ihre Antigenpräsentationsfähigkeit steigern (Lee et al., 2017). De Cal et al. kamen in ihrer Studie zu einem ähnlichen Schluss: zwar konnten sie keine erhöhte oder verminderte Häufigkeit HLA- DR⁺ Monozyten bei HD- Patienten zeigen, jedoch aber einer HLA- DR- Überexpression anhand der mean fluorescent intensity (MFI), die sie auf ein inflammatorisches Zytokinmilieu zurückführten (de Cal et al., 2008).

Die von uns festgestellten erhöhten Konzentrationen von IL-6 und das von IL-6 induzierte CRP sind wahrscheinlich ebenso als Ausdruck von monozytärer Aktivierung zu deuten. Die Arbeitsgruppe um Grazia Malaponte zeigte, dass isolierte Monozyten von HD- Patienten eine signifikant erhöhte Spontanproduktion von IL-6 aufwiesen als Monozyten von Kontrollprobanden. Zudem korrelierte die IL-6 Spontanproduktion mit erhöhten IL-6 Serumkonzentrationen bei HD- Patienten. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass

erhöhte IL- 6 Konzentrationen bei HD- Patienten als Zeichen von chronischer Monozyten-Aktivierung zu deuten sind (Malaponte et al., 2002).

Hinsichtlich der Immunparalyse verdeutlichen unsere Ergebnisse, dass die alleinige dauerhafte Aktivierung von Monozyten kein suffizienter Auslöser für ein klassisches „monocyte reprogramming“ ist. Die Exposition von Monozyten gegenüber anti- inflammatorischer Mediatoren wie IL-10, ist, wie von anderen bereits gezeigt (R. H. De Waal Malefyt, J., 1991; Monneret et al., 2004), wahrscheinlich ein Schlüsselfaktor für die Herunter- Regulation von Rezeptoren der Antigenpräsentation. Die basale IL- 10 Konzentration im Serum erwies sich im HD- Kollektiv nicht als erhöht, weshalb einer der auslösenden Faktoren für die monozytäre Immunparalyse fehlt.

Dass Monozyten von HD- Patienten in einem Infektionszustand dennoch frühzeitig einem „monocyte reprogramming“ unterliegen könnten und HD Patienten somit früher eine monozytäre Immunparalyse entwickeln als die Normalbevölkerung, ist aber dennoch wahrscheinlich und deckt sich mit der klinischen Beobachtung, dass HD- Patienten ein deutlich erhöhtes Risiko für Tod durch Sepsis haben (Mark J. Sarnak & Jaber).

Zum einen besteht eine Prä- Aktivierung des monozytären Kompartiments wie unsere und andere Ergebnisse zeigen.

Zum anderen zeigen unsere Ergebnisse, dass bei HD- Patienten basal zwar keine erhöhte Serum- Konzentrationen von IL-10 vorliegt, die Bedingungen für ein frühzeitiges Entstehen eines IL-10 reichen Milieus aber günstig sind: So konnten wir in unserem T- Zell-Stimulationsexperiment zeigen, dass CD4⁺ T- Zellen von HD- Patienten nach Stimulation eine Typ-2 und somit IL-10 Antwort favorisieren.

Die Konstellation dieser Beobachtungen lässt die Vermutung zu, dass bereits in der Frühphase einer akuten Infektion prä- aktivierte Monozyten in ein IL-10 reiches Milieu geraten und daraufhin das monocyte reprogramming durchlaufen und somit der Immunparalyse unterliegen. Um diese Hypothese weiter zu untersuchen wäre es sinnvoll, sowohl die HLA-DR- bzw. CD86 Expression in Gegenwart von stimulierten CD4⁺ Zellen zu untersuchen als auch die Produktion von IL-10.

Dies war in dieser Studie nicht möglich, da nur in limitierten Umfang Patientenproben zur Verfügung standen und zur sinnvollen Untersuchung von Monozyten große Mengen an kryokonservierten PBMCs benötigt werden.

Es zeigte sich zwar, dass Monozyten nicht in ihrer Antigenpräsentationsfähigkeit eingeschränkt sind, das vermehrte Vorkommen von PD-1⁺, PDL-1⁺ und Tim-3⁺ Monozyten legt jedoch nahe, dass Monozyten auf andere Weise beeinträchtigt sind. Zwar ist der intrazelluläre Mechanismus

hinter der PD-1 Expression auf Monozyten bisher nicht bekannt, so konnten *Guignant et al.* dennoch eine Assoziation zwischen einer Überexpression von PD-1 auf Monozyten und dem Auftreten von nosokomialen Infektionen in der Sepsis zeigen (Guignant et al., 2011). Auch ist die Funktion von Tim-3 auf Monozyten, das auf T- Zellen eine eindeutig inhibitorische Funktion einnimmt, nicht sicher bekannt. So konnte gezeigt werden, dass es, je nach Expressionsstärke, sowohl immunsuppressive als auch immunstimulierende Funktionen einnehmen kann (Ocaña-Guzman, Torre-Bouscoulet, & Sada-Ovalle, 2016).

PDL-1 ist als Ligand für den auf T- Zellen vorkommenden Koinhibitor PD-1 bekannt und seine Überexpression in der Sepsis ebenso mit dem Auftreten von nosokomialen Infektionen assoziiert (Guignant et al., 2011)– ob dies auch bei HD- Patienten der Fall ist, sollte durch eine prospektive Weiterverfolgung unseres Patientenkollektives über einen längeren Zeitraum untersucht werden. Insbesondere im Angesicht jüngerer *in vitro*- Studien, in denen die Blockade von PDL-1 die Monozytenfunktion von an Sepsis Erkrankten wiederherstellen konnte (Patera et al., 2016) und dem erfolgreichen Einsatz von PDL-1 Antikörpern in der Krebstherapie (Rihawi et al., 2017) sollte die prädiktive Relevanz dieser Marker bei HD- Patienten weiter untersucht werden.

Dass die Überexpression von PD-1 und Tim-3 mit einer Überexpression von CD69 auf Monozyten korrelierte verstärkt zudem unsere Vermutung, dass die chronische Inflammation eine Rolle einnimmt in der Genese dieses Phänotyps.

5.2 T- Zellen von Hämodialysepatienten zeigen keine klassische Exhaustion

Sowohl bei chronisch- entzündlichen Erkrankungen wie Hepatitis B oder Tumoren als auch bei akut- entzündlichen Erkrankungen wie der Sepsis kommt es zu einem Erschöpfungsphänomen des T- Zell- Kompartiments, welches unter dem Namen „T-cell exhaustion“ zusammengefasst wird (Boomer et al., 2012; Pauken & Wherry, 2015). Im Rahmen dieses Phänomens überexprimierte immunologische Checkpoints wie PD-1, Tim-3 und CTLA-4 vermitteln während des Kontakts von T- Zellen mit APZ inhibitorische Signale an die T- Zelle und verursachen einen konsekutiven Verlust von Effektorfunktionen wie Zytokinproduktion und Proliferation (Pauken & Wherry, 2015).

Treibender Stimulus hinter einer Überexpression solcher Koinhibitoren ist bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen die Persistenz und rezidivierende Präsentation des Antigens (Yi et al., 2010). Hierin bestand unserer Hypothese nach eine starke Parallele zum HD- Kollektiv, bei der es, beispielsweise entlang der „leaky gut“- Hypothese, zu einer ständigen Exposition des Immunsystems gegenüber Erregern bzw. Erregerbestandteilen kommt (Kotanko, Carter, & Levin, 2006). Wir vermuteten, dass beispielsweise das bei HD- Patienten beobachtete verminderte Ansprechen auf Impfungen auf dieses Phänomen zurückzuführen ist (Grzegorzewska, 2012).

Dass es zu einer dauerhaften T- Zell- Aktivierung kommt zeigen in der Tat unsere Untersuchungen der Aktivierungsmarker CD69 und CD25, die von sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ Zellen in unserem Patientenkollektiv in höherer Frequenz exprimiert wurden.

Wie bei Monozyten wird CD69 von T- Zellen wenige Stunden nach Aktivierung hochreguliert und nach 48 Stunden wieder runterreguliert. In Abwesenheit eines Stimulus sollten T- Zellen also CD69 nicht exprimieren (Reddy et al., 2004).

Auch das vermehrte Vorkommen von CD25⁺ T- Zellen kann prinzipiell als Zeichen von chronischer Aktivierung gedeutet werden. CD25, auch IL2R α genannt, wird von T- Zellen ebenfalls nach einer TZR- und CD28 vermittelten aktivierenden Signalkaskade zeitverzögert auf ihrer Oberfläche exprimiert und dient bei aktivierten T- Zellen der Aufrechterhaltung der Effektorfunktion und Verhinderung der Apoptose durch Bindung des von ihnen selber produzierten IL-2 (Murphy K, 2009). (Kurz et al., 1986)

Paradox erscheint dies jedoch in Anbetracht der von uns ebenfalls beobachteten vermehrt vorkommenden PD-1⁺ T- Zellen. Ein Überwiegen von ko-inhibitorischen Signalen, wie solche

die von PD-1 ausgehen, sollte eine Aktivierung der T- Zelle und somit auch das Aufkommen von CD25 auf T- Zellen unterbinden.

Grundström et al. zeigten jedoch, dass inaktivierte bzw. anerge T- Zellen zwar CD25 exprimieren, die intrazelluläre Signalkaskade und somit die Funktion von CD25 jedoch unterbrochen ist (Grundström, Dohlsten, & Sundstedt, 2000).

Dieses Phänomen ist jedoch von der T- Zell- Exhaustion abzugrenzen. Zwar konnten wir eine veränderte Expression von aktivierenden und inhibitorischen Korezeptoren auf T- Zellen von HD- Patienten nachweisen, dieses Expressionsmuster stimmt jedoch nicht mit dem Immunphänotyp der klassischen T- Zell- Exhaustion überein.

Wir beobachteten zwar das vermehrte Vorkommen des Koinhibitors PD-1 auf CD4⁺ T- Zellen, jedoch nicht der anderen Erschöpfungsmarker CTLA-4 oder Tim-3. Das typische Merkmal der T- Zell- Erschöpfung, die gleichzeitige Überexpression von mehreren Koinhibitoren, lag somit nicht vor.

Welche Bedeutung hat somit die von uns beobachtete PD-1 Expression auf die T- Zell Funktion? Um dieser Frage nachzugehen untersuchten wir die Serumkonzentrationen der T- Zell Zytokine IL-2, IFN- γ und TNF- α . Hinsichtlich einer T- Zell Erschöpfung wären verminderte Konzentrationen aller drei Zytokine zu erwarten. (Yi et al., 2010).

Während die Ergebnisse unserer Serumuntersuchungen damit teilweise übereinstimmten, nämlich der erniedrigten Serum- Konzentrationen von IL-2 und IFN- γ in der HD- Gruppe, so zeigte sich die IL-2 Produktion nach Stimulation in unseren *in-vitro* Versuchen als nicht beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt). Die Serum- Konzentration von TNF- α ließ sich anhand der von uns verwendeten Methode in keiner Gruppe untersuchen.

Die Ergebnisse unseres T- Zell- Stimulationsexperimentes widerlegen also in Theorie unsere Überlegungen zur PD-1 vermittelten Suppression. Ein möglicher Grund könnte aber in unserem Experimentdesign liegen: *Freeman et al.* beschrieben 2000 im *Journal of Experimental Medicine*, dass für eine PD-1 vermittelte T- Zell- Inhibition vor allem das Verhältnis zwischen PD-1 und CD28 Aktivierung entscheidend ist und nicht die absolute Menge an Oberflächenexpression der jeweiligen Rezeptoren (Freeman et al., 2000). In unserem experimentellen Setting verwendeten wir zusätzlich zum Stimulator-Cocktail einen aktivierenden CD28- Antikörper – möglicherweise in einer übersättigenden Konzentration, die zu einem Überwiegen des CD28 Signals führte und somit eine PD-1 vermittelte IL-2 Minderproduktion unterband.

Die Produktion von Inf- γ der T- Zellen von HD- Patienten war jedoch vermindert. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die Induktion der Produktion von Interferon- γ nicht

ausschließlich TZR/CD28 vermittelt ist, sondern auch über von TZR/CD28 völlig unabhängige Signalkaskaden (Yang, Murphy, Ouyang, & Murphy, 1999). Eine verminderte Produktionsfähigkeit von IFN γ der T- Zellen bliebe somit durch den von uns verwendeten CD28 Liganden unberührt.

Dass die Überexpression von PD-1 dennoch eine Rolle in der T- Zell- Dysfunktion bei HD- Patienten einnehmen könnte, ergibt sich aus Ergebnissen aktueller Studien zu diesem Koinhibitor: *Hui et al.* demonstrierten kürzlich, dass anders als lange vermutet PD-1 nicht nur das TZR- vermittelte Signal unterbricht sondern auch das intrazelluläre Signal von CD28 inhibieren kann (Hui et al., 2017).

Wie bereits einführend erwähnt führt ein mangelndes CD28 Signal in einen Zustand der Anergie. Doch was genau ist Anergie?

Dieser Begriff beschreibt einen physiologischen Mechanismus, der dem Organismus der Selbst- Toleranz dient und Autoimmunität verhindert. Nicht alle körpereigenen Antigene können unreifen T- Zellen im Thymus präsentiert werden, wodurch potenziell autoreaktive T- Zellen der Selektion und klonalen Deletion im Thymus entgehen. Um die sogenannte „periphere Toleranz“ zu gewährleisten, bedient sich der Organismus der Abwesenheit des ausschließlich von APZ übermittelten Signal 2. Erkennt eine T- Zelle in der Peripherie über ihren spezifischen TZR ein körpereigenes Antigen auf einer Zelle, jedoch keinen Liganden für CD28, so geht sie in einen bis zur Apoptose funktionslosen Zustand über, der Anergie (Prinzip der peripheren Toleranz)(Murphy K, 2009).

Im Angesicht der Ergebnisse von *Freeman et al.* und *Hui et al.* erscheint es möglich, dass auch die singuläre Überexpression von PD-1 auf T- Zellen zu einer Dysfunktion führt – zwar nicht im Sinne der klassischen T-cell- exhaustion sondern eher im Sinne einer pathologisch induzierten Anergie durch Unterbrechung des CD28- Signals.

Eine ausgeprägte T- Zell- Anergie bei HD- Patienten scheint insofern noch wahrscheinlicher, da wir, wie bereits *Liskowska et al.* 2012 (Lisowska et al., 2012), eine verminderte Expression des Kostimulators CD28 auf der Oberfläche von sowohl CD4⁺ T- Zellen als auch CD8⁺ T- Zellen beobachten konnten.

Insgesamt erhöht die Kombination aus mehreren von uns beobachteten Veränderungen – erhöhte Expression von PDL-1 (Ligand für PD-1 auf T- Zellen) sowie verminderte Expression von CD86 (Ligand für CD28 auf T- Zellen) auf Monozyten, erhöhte Expression von PD-1 und verminderte Expression von CD28 auf T- Zellen – die Wahrscheinlichkeit, dass es bei HD- Patienten zu einem Überwiegen von inhibitorischen Signalen und somit bei einer Interaktion mit APZ in der Peripherie zu einer T- Zell- Anergie kommt. Eine T- Zell- Anergie wäre somit

auch eine Erklärung für die schlechte Impf- Ansprechraten bei HD- Patienten (Grzegorzewska, 2012).

Auch unterstützt das von uns beobachtete vermehrte Vorkommen von CD25⁺ T- Zellen eher das Vorliegen einer Anergie als einer Exhaustion. Die bereits zitierte Arbeit von Grundström et al. zeigt, dass anerge T- Zellen CD25 exprimieren, dessen Funktion jedoch unterbunden ist. Eine erschöpfte T- Zelle ist jedoch außerstande, CD25 zu exprimieren, wie Ingram et al. nachwies (Ingram, Yi, & Zajac, 2011). CD25 kann in diesem Kontext daher nicht als klassischer Aktivitätsmarker für T- Zellen dienen, zeigt aber an, dass ein Kontakt zwischen TZR und APZ stattgefunden hat, der in einer Anergie gemündet hat.

Eine weitere mögliche Interpretation unserer Ergebnisse ist, dass es bei HD- Patienten zu einer verfrühten Immunseneszenz kommt, da eine verminderte Expression von CD28, wie von uns und anderen beobachtet (Lisowska et al., 2010) ein typisches Merkmal der Immunseneszenz bei T- Zellen (Weng, Akbar, & Goronzy, 2009) ist.

Immunseneszenz ist definiert als die physiologischen Veränderungen des Immunsystems, die auch bei Gesunden mit fortschreitendem Alter auftreten. Dass es bei HD- Patienten zu einer verfrühten, stress- induzierten Seneszenz kommt (engl.: *stress- induced premature senescence*, SIPS), vermuteten bereits Ramirez et al. (Ramirez et al., 2005). In ihrer Studie untersuchten sie Monozyten von HD- Patienten und konnten typische Zeichen von Seneszenz feststellen. Betjes et al. folgten dieser Vermutung 2011 und untersuchten auch das T- Zell- Kompartiment auf Zeichen von Seneszenz (Betjes et al., 2011). Auch sie konnten Zeichen von verfrühter Seneszenz wie verkürzte Telomerlängen und Vergrößerungen der Gedächtniszell- Populationen feststellen.

Uns war es möglich, diese Beobachtungen zu bestätigen – auch in unserem HD- Kollektiv fanden sich Verminderungen der naiven CD4⁺ T- Zellen mit gleichzeitiger Zunahme der älteren T- Gedächtniszellgenerationen wie T- em- Zellen bei CD4⁺ und T- emra bei CD8⁺- T- Zellen. Diese Verschiebung zugunsten der älteren Gedächtniszell- Populationen ist möglicherweise Ausdruck der rezidivierenden Infektionen, der HD- Patienten ausgesetzt sind, da Gedächtniszellen durch rezidivierende Antigenexposition und Aktivierung zunehmend ältere Generationen durchlaufen (Farber et al., 2014).

Dass ältere T- Gedächtniszellen in ihrer Aktivierungsfähigkeit eingeschränkt sind machen unsere Analysen der CD28 Expression sowohl der HD- Patienten als auch der gesunden Kontrollprobanden deutlich: bei beiden Gruppen zeigte sich, dass die Expression von CD28 mit zunehmenden Generationsalter abnahm.

Gleichzeitig waren jedoch nicht nur die älteren (also stärker eingeschränkten) Gedächtniszellpopulationen der HD- Patienten vergrößert, auch die jeweiligen CD28 Expressionen waren, verglichen mit der Kontrollgruppe, vermindert. Entgegen der früheren Überzeugung, dass das kostimulatorische Signal 2 nur für die Aktivierung naiver T- Zellen vonnöten ist, haben jüngere *in vivo* Studien zeigen können, dass eine effektive sekundäre Immunantwort durch Gedächtniszellen ebenfalls die Aktivierung von CD28 benötigt (Borowski et al., 2007). Was bedingt nun aber diese verringerte CD28 Expression?

Die SIPS liefert in diesem Zusammenhang zumindest teilweise eine mögliche Erklärung: die Verringerung der CD28- Expression ist der Expansion der älteren Gedächtniszellgenerationen geschuldet, die auch physiologisch weniger CD28 exprimieren als jüngere Gedächtniszellgenerationen, wie unsere Analysen der CD28 Expression der gesunden Kontrollprobanden zeigen. Dass innerhalb der gleichen Generation die T- Zellen der HD- Patienten weniger CD28 exprimieren als die der gesunden Kontrollen erklärt dies jedoch nicht.

Bryl et al. liefern für dieses Phänomen einen weiteren Ansatz, nämlich dass eine dauerhafte TNF- α Exposition direkt eine Runterregulation von CD28 bewirkt (Bryl, Vallejo, Weyand, & Goronzy, 2001). In diesem Kontext verursacht Inflammation kausal eine Immundefizienz. TNF- α ließ sich anhand der von uns verwendeten, nicht genügend sensitiven Methode jedoch in keiner Gruppe nachweisen. Es zeigte sich jedoch eine negative Korrelation von CD28 mit dem Chemokin IP-10, das wie TNF- α ebenfalls von aktivierten Monozyten produziert wird, sowie mit dem zellulären Aktivierungsmarker CD69 auf T- Zellen. Ob IP-10 jedoch direkt, wie TNF- α , die Expression von CD28 runterreguliert und somit mögliches therapeutisches Ziel ist, bleibt jedoch offen. Vermuten lässt sich aufgrund dieser Assoziation dennoch, dass eine monozytäre Aktivierung und die dadurch erhöhte monozytäre pro-inflammatorische Zytokinproduktion eine Runterregulation von CD28 auf T- Zellen bewirkt. Wie lassen sich die weiteren Ergebnisse unserer T- Zell- Stimulationsexperimente interpretieren? CD4⁺ T- Zellen von HD- Patienten schienen in unserem Experiment nach Stimulation eine Th-2- Antwort zu favorisieren. Dies zeigte sich durch ein Ausbleiben der Inf- γ Antwort der Th- Zellen nach Stimulation sowie der signifikant stärkeren IL-4 und IL-10 Produktion, beides typische Th2- Zytokine.

Auch in der Immunparalyse findet eine Polarisierung in Richtung der Th-2 Zellen statt (Ferguson, Galley, & Webster, 1999). Um unserer Vermutung nachzugehen, dass bei HD- Patienten ebenfalls eine Dysbalance zugunsten der Th-2 Zellen besteht, untersuchten wir das Serum der Studienpopulation nach den typischen Th-2 Zytokinen IL-4 und IL-10. Interessanterweise zeigten sich entgegen unserer Vermutung weder eine erhöhte Konzentration

von IL-10 noch von IL-4, welches die initiale Differenzierung von Th-0 Zellen in Th-2 Zellen bewirkt. Auch das Verhältnis zwischen IL-4 und IFN- γ , ein Parameter der zur Feststellung einer Th1/Th2 Polarisation herangezogen wird, unterschied sich nicht zwischen den Gruppen. Gegenteilig zeigten andere Arbeitsgruppen sogar, dass bei HD- Patienten dauerhaft eine Polarisation in Richtung der Th1 Zellen vorliegt (Mansouri et al., 2017; Nitta et al., 2002).

Sowohl unsere Daten als auch die der zitierten Arbeitsgruppen sind jedoch kritisch zu betrachten, da zur Th- Subtypen Klassifizierung *in vitro* die Zytokinantwort auf einen artifiziellen Stimulus untersucht wurde. Constant et al. zeigten jedoch bereits, dass unterschiedlich hohe Antigenkonzentration *in vitro* eine Polarisation in Richtung Th1 oder Th2 verursachen können (Constant & Bottomly, 1997). Um sichere Aussagen bezüglich der Th-Polarisationstendenz bei HD- Patienten treffen zu können wäre es präziser, *ex vivo* anhand des Oberflächenphänotyps Th1 und Th2 Zellen zu identifizieren.

Ebenso muss hinsichtlich unserer Ergebnisse unterschieden werden, dass die Serumkonzentrationen von IL-10 und IL-4 im infektfreien Zustand der Patienten untersucht wurden, die Th- Polarisation jedoch nach einer *in vitro* Stimulation, also im Grunde während einer Infektion. Somit bildet eher das *in vitro*- Experiment das T- Zell- Verhalten ab als die basale Serumkonzentration. Zudem deckt sich unsere Beobachtung mit dem klinischen Phänomen, dass HD- Patienten eine deutlich höhere Inzidenz der Tuberkulose- Infektion aufweisen, als die Normalbevölkerung (Chia et al., 1998; Dobler, McDonald, & Marks, 2011), da eine Th-1 Antwort zur Bekämpfung von intrazellulären Erregern wie dem *Mycobacterium tuberculosis* benötigt wird.

5.3 Bei Hämodialysepatienten besteht kein antiinflammatorisches Zytokinmilieu

Wie bereits in den vorherigen Abschnitten erwähnt zeigte sich keine für die Immunparalyse typische Zytokindysbalance im Sinne einer hohen Serumkonzentration des antiinflammatorischen IL-10. Vielmehr zeigte sich ein, wahrscheinlich primär von aktivierten Monozyten ausgehendes, pro-inflammatorisches Zytokinmilieu. Dass sich in unserer Studienpopulation, trotz erhöhter pro-inflammatorischer Zytokine, keine erhöhten IL-10 Werte zeigen, lässt eine Dysregulation der Zytokinproduktion stark zugunsten der pro-inflammatorischen Seite vermuten. Physiologisch wird IL-10 von Monozyten zeitverzögert immer ebenfalls produziert, wenn beispielsweise NF- κ B TLR- vermittelt aktiviert und pro-inflammatorische Mediatoren wie IL-6 ausgeschüttet werden.

Von Bedeutung ist die fehlende IL-10 Erhöhung aber auch in Anbetracht der erhöhten Chemokin-Konzentrationen im HD-Kollektiv.

Neben IL-6 waren auch die Konzentrationen der Chemokine IP10, CCL-5 und IL-8 in der HD-Gruppe erhöht. Mehrere Arbeitsgruppen zeigten bereits die inhibitorische Funktion, die IL-10 auf die Produktion von Chemokinen wie MCP-1 und CCL-5 hat (Mu et al., 2005; Olszyna, Pajkrt, Lauw, van Deventer, & van der Poll, 2000). *Mu et al.* konnten zudem in einem Tiermodell zeigen, dass eine in Ratten induzierte Erhöhung von IL-10 einen positiven Einfluss auf Inflammation und renaler Fibrose bewirkt. Chemokine wie IL-8 sind bei HD-Patienten bekannte Prädiktoren für Mortalität (Panichi et al., 2006). Eine fehlende Regulation der Chemokinsynthese durch IL-10 könnte daher für die kardiovaskuläre Mortalität eine Rolle spielen. Damit übereinstimmend ist ein IL-10-favorisierender Genotyp bei HD-Patienten protektiv gegen kardiovaskuläre Mortalität (Girndt et al., 2002).

Die von uns beobachtete Konstellation der Zytokine und Chemokine widerspricht somit der Hypothese, dass ein ähnliches Zytokinmilieu vorliegt wie in der Immunparalyse.

5.4 Die Zytokinproduktion natürlicher Killerzellen ist trotz verändertem Oberflächenphänotyp erhalten

Die Rolle der NK- Zellen im Rahmen der Immunparalyse ist bisher nur wenig untersucht. Veränderungen hinsichtlich ihrer absoluten Zellzahl als auch Effektorfunktionen, der Zytolyse und Zytokinproduktion, im Rahmen der Sepsis konnten jedoch nachgewiesen werden (Forel et al., 2012). Ebenso sind ihre Funktionen im Rahmen von chronischen Infektionen wie der Hepatitis B und Tumorerkrankungen vermindert. Wie bei der TCE kommt es dabei zu einer Überexpression inhibitorischer Rezeptoren wie Tim-3 und PD-1 (Bi & Tian, 2017).

NK- Zellen von HD- Patienten sind ein bisher wenig erforschtes Gebiet und die Datenlage zum Teil widersprüchlich. Die hohe Prävalenz von Tumorerkrankungen unter HD- Patienten lässt aber eine Dysfunktion dieser Zellreihe vermuten.

Anhand der beiden Oberflächenmoleküle CD56 und CD16 lassen sich NK- Zellen in verschiedene Subtypen unterteilen. CD56 wird von allen NK- Zellen in unterschiedlicher Stärke exprimiert, der Fc- Rezeptor CD16 hingegen nur von einer Subpopulation. Diese CD56⁺CD16⁺ Zellpopulation hat unter den Subpopulationen die höchste Zytotoxizität (Poli et al., 2009). Sowohl die CD56^{bright} als auch CD56^{dim} NK- Zellen gelten als potente Zytokinproduzenten und regulieren über die Produktion von IL-2 und Inf- γ die Funktion andere Immunzellen (Poli et al., 2009).

Beide Populationen erwiesen sich in unseren Untersuchungen als vergrößert. Die Expansion dieser beiden CD16- negativen Subpopulationen kann als Zeichen erhöhter Aktivierung *in vivo* gewertet werden, da NK Zellen nach Aktivierung CD16 herunterregulieren (Goodier et al., 2016). Damit übereinstimmend fanden wir auch eine Überexpression des Aktivierungsmarkers CD69 auf allen Subpopulationen.

Eine erhöhte Expression von Aktivierungsmarkern ist jedoch nicht zwingend gleichbedeutend mit erhöhter Funktionalität. Die Effektorfunktion von NK- Zellen wird aus dem Verhältnis zwischen aktivierender und inhibierender Rezeptorsignale reguliert (Vivier, Tomasello, Baratin, Walzer, & Ugolini, 2008). Neben bekannteren NK- Zell- Inhibitoren wie NK2DA und „Killer-cell immunoglobulin-like receptors“ (KIR) konnte auch gezeigt werden, dass PD-1 und Tim-3 die NK- Zell Funktion inhibieren (Beldi-Ferchiou et al., 2016; Ju et al., 2010).

Mit der Überexpression von PD-1 und Tim-3 zeigten in unseren Untersuchungen sowohl die CD16⁺ zytotoxischen NK- Zellen als auch die zytokinproduzierenden CD56^{bright} NK- Zellen eine verstärkt inhibitorische Rezeptorexpression.

Entgegen unserer Erwartung zeigte sich im Stimulationsexperiment jedoch keine Verminderung der Zytokinproduktion der NK Zellen verglichen mit der Kontrollgruppe. Trotz Überexpression von inhibitorischen Rezeptoren scheinen NK- Zellen hinsichtlich ihrer Zytokinproduktion also nicht beeinträchtigt zu sein. *Vacher- Coponat et al.* konnten dies in ihrem Stimulationsversuch ebenfalls beobachten. (Vacher-Coponat et al., 2008). Auch die Überexpression von CD69 zeigte sich in dieser Studie. Zudem wurde von dieser Arbeitsgruppe noch eine Analyse der Zytotoxizität durchgeführt, in der sich auch keine Verminderung nachweisen ließ.

Diese und unsere Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es bei HD- Patienten zwar zu einer erhöhten Aktivität von NK- Zellen kommt, ihre Zytokinproduktion wahrscheinlich jedoch nicht eingeschränkt ist. Zwar sind inhibitorische Rezeptoren überexprimiert, ihre erhaltene Funktion lässt aber darauf schließen, dass auch aktivierende Rezeptoren (wie z.B. CD69) in einem Ausmaß hochreguliert werden, sodass das Verhältnis zwischen aktivierende und inhibierende Signale noch nicht zugunsten der Inhibition gekippt ist.

5.5 Zusammenfassung der Ergebnisse, Studiengrenzen und Ausblick

Insgesamt präsentieren in unseren Untersuchungen alle untersuchten Immunzellkompartimente von HD- Patienten einen deutlich veränderten Immunphänotyp. Klassische Merkmale der Immunparalyse wie das *monocyte reprogramming*, die *T- cell- exhaustion* und auch das Vorliegen eines IL-10 reichen antiinflammatorischen Zytokinmilieus bestehen jedoch nicht bei HD- Patienten außerhalb eines Infektes.

Dennoch ergeben unsere Daten Hinweise darauf, dass HD- Patienten während eines Infektes möglicherweise deutlich früher als das Normkollektiv eine Immunparalyse entwickeln, da bei ihnen dauerhaft immunologische Phänomene vorliegen, die in der Genese der Immunparalyse eine Rolle spielen. Mit der chronischen Aktivierung von Monozyten besteht bereits einer von zwei wichtigen Faktoren in der Entwicklung des *monocyte reprogramming*. Zumindest nach unseren *in vitro* Versuchen scheinen sich zudem Th0 Zellen präferiert zu Th2 Zellen zu differenzieren, die potente Produzenten von IL-10 sind, der zweite notwendige Faktor für das *monocyte reprogramming*. Überprüfen ließe sich dies mit einem modifizierten *Endotoxin Toleranz-* Modell, bei dem frisch isolierte Monozyten gemeinsam mit T- Zellen stimuliert und anschließend auf ihre HLA-DR und CD86 Expression untersucht werden. Auch wäre in diesem Experiment die Identifizierung der Th- Polarisation anhand von Oberflächenrezeptoren sinnvoll sowie die Bestimmung von IL-10 im Überstand der Zellkultur.

T- Zellen von HD- Patienten exprimieren zwar nicht den klassischen TCE- Phänotyp, dennoch werden die für die Antigenpräsentation notwendigen Rezeptoren deutlich zugunsten einer Inhibition exprimiert. Die Überexpression von PD-1 auf Th- Zellen und PDL-1 auf APZ sind Hinweise auf eine erhöhte Aktivität dieses inhibitorischen Signalwegs.

Somit besteht eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, dass T- Zellen bei Antreffen eines Antigens *anerg* werden. Eine frühzeitige Immunseneszenz bzw. eine SIPS könnte eine Rolle in dieser veränderten Rezeptorexpression einzunehmen, was die von uns beobachtete Expansion älterer, weniger potenten Gedächtniszellen verdeutlicht. Auch liefert dies eine mögliche Erklärung für die schlechten Impf- Ansprechraten unter HD- Patienten.

Eine wichtige Rolle nimmt hierbei auch die verminderte Expression des Korezeptors CD28 auf T- Zellen ein.

Hier zeigte sich zudem eine negative Korrelation mit pro- inflammatorischen Marken. In diesem Zusammenhang wäre es sinnvoll, die TNF- α - Konzentration nachträglich mittels einer sensitiveren Methode zu bestimmen, da bereits gezeigt wurde, dass TNF- α die Fähigkeit hat auf Transkriptionsebene die CD28 Expression zu unterdrücken.

Welche Implikationen ergeben sich nun aus dieser Studie? Vordergründig für die T- Zell-Dysfunktion scheint die verminderte CD28 Expression zu sein. Ein therapeutischer Ansatz bestünde somit, entweder die ursprüngliche CD28 Expression wiederherzustellen, oder aber CD28 inhibierende Signale auszuschalten. Da in unserem Kollektiv die verminderte Expression von CD28 mit dem erhöhten Aufkommen von pro- inflammatorischen Zytokinen korreliert und in anderen Studien ein direkter negativer Effekt von TNF- α auf die CD28 Expression nachgewiesen wurde, wäre es in Zukunft denkbar, den ursprünglichen Phänotyp wiederherstellen zu können oder präventiv zu erhalten, indem bei CKD und ESRD Patienten eine antiinflammatorische Therapie durchgeführt wird. Zwar erscheint es paradox, eine Immunsuppression zur Verbesserung der Immunantwort durchzuführen, doch könnte beispielsweise ein Immunmonitoring der CD28 Expression eine Erfolgskontrolle der immunmodulatorischen Therapie darstellen. Auch ist denkbar, dass eine hierdurch erreichte Umkehr der T- Zell- Anergie die Ansprechraten auf Impfungen erhöht.

Wie gesagt greift PD-1 in die CD28 vermittelte Aktivierung der T- Zelle ein. Mit Pembrolizumab, Nivolumab und andere existieren bereits mehrere Medikamente, die sich gegen PD-1 richten und gute Ergebnisse in der Behandlung des fortgeschrittenen Melanoms erzielen (Eggermont et al., 2018) und dort bereits zugelassen sind. Interessant wäre daher, sowohl die CD28 Expression nach PD1- Inhibitor Exposition zu untersuchen als auch die Zytokinproduktion der T- Zellen.

Grenzen dieser Studie ergaben sich vor allem aus der Größe des bearbeiteten Themas. Die Immunparalyse ist ein großer Themenkomplex und umfasst fast alle Immunzellkompartimente. Ziel dieser Studie war es, den bekannten Immunphänotyp aus der Immunparalyse bei HD- Patienten nachzuweisen. An Stellen, bei denen dies der Fall war, lassen sich jedoch wenige definitive Aussagen tätigen. Mechanistische und auf diese Ergebnisse stützende Experimente (wie z.B. hinsichtlich das Monozytenverhalten in Gegenwart von stimulierten Th- Zellen) sind dazu noch nötig.

Weiterer Schwachpunkt dieser Studie ist die Verwendung kryokonservierter PBMCs für die Stimulationsexperimente. Zwar ist dies eine weit verbreitete und anerkannte Methode, um standardisiert und in einer statistisch sinnvollen Gruppengröße *in vitro* Experimente durchführen zu können, dennoch besteht die Möglichkeit, dass Stimulationsantworten aufgrund von ungewollter zusätzlicher Stimulation verfälscht werden. Insbesondere durch den Auftauprozess kommt es unweigerlich zu einem Zell- Untergang, bei dem DAMPs freigesetzt werden, die wiederum noch erhaltende Immunzellen aktivieren. Da für unsere Experimente jeweils nur zwei Proben gleichzeitig aufgetaut werden konnten, ergibt sich daraus zwangsläufig

eine nicht sicher zu beurteilbare Variation der Probenbearbeitung und daraus resultierende variable Experimentbedingungen.

Nichtsdestotrotz liefert diese Studie umfassende Ergebnisse zum Immunphänotyp bei Dialysepatienten und liefert Grundlage für weitere Untersuchungen. Ebenso konnte die Hypothese, dass eine chronisch bestehende Immunparalyse für die Infektanfälligkeit bei HD-Patienten verantwortlich ist, widerlegt werden, wenngleich Teilaspekte der Immunparalyse bestehen und auch mit Inflammation assoziiert sind.

6 Literaturverzeichnis

- Allon, M., Depner, T. A., Radeva, M., Bailey, J., Beddhu, S., Butterly, D., Coyne, D., Grassmann, J., Kaufman, A., Kaysen, G., Lewis, J., Schwab, S., (2003). Impact of Dialysis Dose and Membrane on Infection-Related Hospitalization and Death: Results of the HEMO Study. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(7), 1863-1870. doi:10.1097/01.asn.0000074237.78764.d1
- Alvarez-Lara, M. A., Carracedo, J., Ramirez, R., Martin-Malo, A., Rodriguez, M., Madueno, J. A., & Aljama, P. (2004). The imbalance in the ratio of Th1 and Th2 helper lymphocytes in uraemia is mediated by an increased apoptosis of Th1 subset. *Nephrol Dial Transplant*, 19(12), 3084-3090. doi:10.1093/ndt/gfh382
- Anders, H. J., Andersen, K., & Stecher, B. (2013). The intestinal microbiota, a leaky gut, and abnormal immunity in kidney disease. *Kidney Int*, 83(6), 1010-1016. doi:10.1038/ki.2012.440
- Ando, M., Lundkvist, I., Bergstrom, J., & Lindholm, B. (1996). Enhanced scavenger receptor expression in monocyte-macrophages in dialysis patients. *Kidney Int*, 49(3), 773-780.
- Angus, D. C., & van der Poll, T. (2013). Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, 369(9), 840-851. doi:10.1056/NEJMra1208623
- Aste-Amezaga, M., Ma, X., Sartori, A., & Trinchieri, G. (1998). Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *J Immunol*, 160(12), 5936-5944.
- Barker, R. N., Erwig, L., Pearce, W. P., Devine, A., & Rees, A. J. (1999). Differential effects of necrotic or apoptotic cell uptake on antigen presentation by macrophages. *Pathobiology*, 67(5-6), 302-305. doi:10.1159/000028085
- Baue, A. E., Durham, R., & Faist, E. (1998). Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), multiple organ dysfunction syndrome (MODS), multiple organ failure (MOF): are we winning the battle? *Shock*, 10(2), 79-89.
- Beldi-Ferchiou, A., Lambert, M., Dogniaux, S., Vely, F., Vivier, E., Olive, D., Dupuy, S., Lebbé, C., Sène, D., Hivroz, C., Caillat-Zucman, S. (2016). PD-1 mediates functional exhaustion of activated NK cells in patients with Kaposi sarcoma. *Oncotarget*, 7(45), 72961-72977. doi:10.18632/oncotarget.12150
- Betjes, M. G., Langerak, A. W., van der Spek, A., de Wit, E. A., & Litjens, N. H. (2011). Premature aging of circulating T cells in patients with end-stage renal disease. *Kidney Int*, 80(2), 208-217. doi:10.1038/ki.2011.110
- Beutler, B., Milsark, I. W., & Cerami, A. C. (1985). Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science*, 229(4716), 869-871.
- Bi, J., & Tian, Z. (2017). NK Cell Exhaustion. *Frontiers in Immunology*, 8, 760-760. doi:10.3389/fimmu.2017.00760
- Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., Roland, M., Sibbald, W. J. (1992). Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *Chest*, 101(6), 1644-1655. doi:10.1378/chest.101.6.1644
- Bone, R. C., Grodzin, C. J., & Balk, R. A. (1997). Sepsis: A New Hypothesis for Pathogenesis of the Disease Process. *Chest*, 112(1), 235-243. doi:10.1378/chest.112.1.235
- Boomer, J. S., Shuherk-Shaffer, J., Hotchkiss, R. S., & Green, J. M. (2012). A prospective analysis of lymphocyte phenotype and function over the course of acute sepsis. *Crit Care*, 16(3), R112. doi:10.1186/cc11404
- Boomer, J. S., To, K., Chang, K. C., Takasu, O., Osborne, D. F., Walton, A. H., Bricker, T., Jarman, S., Kreisel, D., Krupnick, A., Srivastava, A., Swanson, P., Green, J., & Hotchkiss, R. S. (2011). Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA*, 306(23), 2594-2605. doi:10.1001/jama.2011.1829

-
- Boonstra, A., Rajsbaum, R., Holman, M., Marques, R., Asselin-Paturel, C., Pereira, J. P., Bates, E., Akira, S., Vieira, P., Liu, Y., Trinchieri, G. & O'Garra, A. (2006). Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. *J Immunol*, 177(11), 7551-7558.
- Boots, A. M. H., Maier, A. B., Stinissen, P., Masson, P., Lories, R. J., & De Keyser, F. (2013). The influence of ageing on the development and management of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 9, 604. doi:10.1038/nrrheum.2013.92
- Borowski, A. B., Boesteanu, A. C., Mueller, Y. M., Carafides, C., Topham, D. J., Altman, J. D., Jennings, S. & Katsikis, P. D. (2007). Memory CD8+ T cells require CD28 costimulation. *J Immunol*, 179(10), 6494-6503. doi:10.4049/jimmunol.179.10.6494
- Brehm, M. A., Daniels, K. A., & Welsh, R. M. (2005). Rapid Production of TNF- α following TCR Engagement of Naive CD8 T Cells. *The Journal of Immunology*, 175(8), 5043-5049. doi:10.4049/jimmunol.175.8.5043
- Brown, R., Bancewicz, J., Hamid, J., Patel, N. J., Ward, C. A., Farrand, R. J., Pumphrey, R. & Irving, M. (1982). Failure of delayed hypersensitivity skin testing to predict postoperative sepsis and mortality. *British Medical Journal (Clinical research ed.)*, 284(6319), 851-853.
- Bryl, E., Vallejo, A. N., Weyand, C. M., & Goronzy, J. J. (2001). Down-regulation of CD28 expression by TNF-alpha. *J Immunol*, 167(6), 3231-3238.
- Calvano, S. E., Xiao, W., Richards, D. R., Felciano, R. M., Baker, H. V., Cho, R. J., Chen, R., Brownstein, H., Cobb, J., Perren, S., Miller-Graziano, K., Moldawer, L., Mindrinos, M., Davis, R., Tompkins, R., Program, S., Host Response to Injury Large Scale Collaborative, R. (2005). A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature*, 437(7061), nature03985. doi:10.1038/nature03985
- Cavaillon, J. M., & Adib-Conquy, M. (2006). Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care*, 10(5), 233. doi:10.1186/cc5055
- Chapter 1: Definition and classification of CKD. (2013). *Kidney International Supplements*, 3(1), 19-62. doi:10.1038/kisup.2012.64
- Chia, S., Karim, M., Elwood, R. K., & FitzGerald, J. M. (1998). Risk of tuberculosis in dialysis patients: a population-based study. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2(12), 989-991.
- Chollet-Martin, S., Stamatakis, G., Bailly, S., Mery, J. P., & Gougerot-Pocidallo, M. A. (1991). Induction of tumour necrosis factor-alpha during haemodialysis. Influence of the membrane type. *Clinical and Experimental Immunology*, 83(2), 329-332.
- Colletti, L. M., Remick, D. G., & Campbell, D. A., Jr. (1994). LPS pretreatment protects from hepatic ischemia/reperfusion. *J Surg Res*, 57(3), 337-343. doi:10.1006/jsre.1994.1152
- Constant, S. L., & Bottomly, K. (1997). Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol*, 15, 297-322. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.297
- Cordova, E., Miglia, I., Festuccia, F., Sarlo, M. G., Scornavacca, G., Punzo, G., Mene, P. & Fofi, C. (2017). Hepatitis B vaccination in haemodialysis patients: an underestimated problem. Factors influencing immune responses in ten years of observation in an Italian haemodialysis centre and literature review. *Ann Ig*, 29(1), 27-37. doi:10.7416/ai.2017.2129
- Costa, E., Lima, M., Alves, J. M., Rocha, S., Rocha-Pereira, P., Castro, E., Miranda, V., Loureiro, A., Quintanilha, A., Belo, L. & Santos-Silva, A. (2008). Inflammation, T-cell phenotype, and inflammatory cytokines in chronic kidney disease patients under hemodialysis and its relationship to resistance to recombinant human erythropoietin therapy. *J Clin Immunol*, 28(3), 268-275. doi:10.1007/s10875-007-9168-x

-
- de Cal, M., Cruz, D. N., Corradi, V., Nalesso, F., Polanco, N., Lentini, P., Brendolan, A., Tetta, C. & Ronco, C. (2008). HLA-DR Expression and Apoptosis: A Cross-Sectional Controlled Study in Hemodialysis and Peritoneal Dialysis Patients. *Blood Purification*, 26(3), 249-254. doi:10.1159/000122110
- De Waal Malefyt, R. A. J. (1991). Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*, 174(5), 1209-1220.
- De Waal Malefyt, R. H., J. (1991). Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med*, 174(4), 915-924.
- Demangel, C., Bertolino, P., & Britton, W. J. (2002). Autocrine IL-10 impairs dendritic cell (DC)-derived immune responses to mycobacterial infection by suppressing DC trafficking to draining lymph nodes and local IL-12 production. *Eur J Immunol*, 32(4), 994-1002. doi:10.1002/1521-4141(200204)32:4<#60;994::aid-immu994>#62;3.0.co;2-6
- Dobler, C. C., McDonald, S. P., & Marks, G. B. (2011). Risk of tuberculosis in dialysis patients: a nationwide cohort study. *PLoS One*, 6(12), e29563-e29563. doi:10.1371/journal.pone.0029563
- Drewry, A. M., Samra, N., Skrupky, L. P., Fuller, B. M., Compton, S. M., & Hotchkiss, R. S. (2014). Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality. *Shock*, 42(5), 383-391. doi:10.1097/shk.0000000000000234
- Driessler, F., Venstrom, K., Sabat, R., Asadullah, K., & Schottelius, A. J. (2004). Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF- κ B activity: a role for p50. *Clinical and Experimental Immunology*, 135(1), 64-73. doi:10.1111/j.1365-2249.2004.02342.x
- Eckardt, K. U., Coresh, J., Devuyst, O., Johnson, R. J., Kottgen, A., Levey, A. S., & Levin, A. (2013). Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden. *Lancet*, 382(9887), 158-169. doi:10.1016/s0140-6736(13)60439-0
- Eggermont, A. M. M., Blank, C. U., Mandala, M., Long, G. V., Atkinson, V., Dalle, S., Haydon, A., Lichinitser, M. & Robert, C. (2018). Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma. *N Engl J Med*, 378(19), 1789-1801. doi:10.1056/NEJMoa1802357
- Farber, D. L., Yudanin, N. A., & Restifo, N. P. (2014). Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 14(1), 24-35. doi:10.1038/nri3567
- Ferguson, N. R., Galley, H. F., & Webster, N. R. (1999). T helper cell subset ratios in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med*, 25(1), 106-109.
- Fiorentino, D. F., Bond, M. W., & Mosmann, T. R. (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*, 170(6), 2081-2095.
- Forel, J.-M., Chiche, L., Thomas, G., Mancini, J., Farnarier, C., Cognet, C., Guervilly, C., Daumas, A., Vély, F., Xéridat, F., Vivier, E. & Papazian, L. (2012). Phenotype and Functions of Natural Killer Cells in Critically-Ill Septic Patients. *PLoS One*, 7(12), e50446. doi:10.1371/journal.pone.0050446
- Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M., Horton, H., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M., Carreno, B., Collins, M., Wood, C. & Honjo, T. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*, 192(7), 1027-1034.

-
- Friedman, G., Jankowski, S., Marchant, A., Goldman, M., Kahn, R. J., & Vincent, J. L. (1997). Blood interleukin 10 levels parallel the severity of septic shock. *J Crit Care*, *12*(4), 183-187.
- Friedrich, B., Janessa, A., Schmieder, R., Risler, T., & Alexander, D. (2008). Acute effects of haemodialysis on pro-/anti- apoptotic genes in peripheral blood leukocytes. *Cell Physiol Biochem*, *22*(5-6), 423-430. doi:10.1159/000185486
- Gaffen, S. L., & Liu, K. D. (2004). Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine*, *28*(3), 109-123. doi:10.1016/j.cyto.2004.06.010
- Gansevoort, R. T., Correa-Rotter, R., Hemmelgarn, B. R., Jafar, T. H., Heerspink, H. J., Mann, J. F., Heerspink, H., Mann, J., Matsushita, K. & Wen, C. P. (2013). Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet*, *382*(9889), 339-352. doi:10.1016/s0140-6736(13)60595-4
- Gerez, L., Madar, L., Shkolnik, T., Kristal, B., Arad, G., Reshef, A., Steinberger, A., Ketzinel, M., Sayar, D. & Sasha, S. (1991). Regulation of interleukin-2 and interferon-gamma gene expression in renal failure. *Kidney Int*, *40*(2), 266-272.
- Girndt, M., Kaul, H., Sester, U., Ulrich, C., Sester, M., Georg, T., & Kohler, H. (2002). Anti-inflammatory interleukin-10 genotype protects dialysis patients from cardiovascular events. *Kidney Int*, *62*(3), 949-955. doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00504.x
- Girndt, M., Köhler, H. a. n. s., Schiedhelm-Weick, E., Meyer zum Büschenfelde, K.-H., & Fleischer, B. (1993). T cell activation defect in hemodialysis patients: Evidence for a role of the B7/CD28 pathway. *Kidney International*, *44*(2), 359-365. doi:10.1038/ki.1993.252
- Girndt, M., Pietsch, M., & Kohler, H. (1995). Tetanus immunization and its association to hepatitis B vaccination in patients with chronic renal failure. *Am J Kidney Dis*, *26*(3), 454-460.
- Girndt, M., Sester, M., Sester, U., Kaul, H., & Köhler, H. (2001). Defective expression of B7-2 (CD86) on monocytes of dialysis patients correlates to the uremia-associated immune defect. *Kidney International*, *59*(4), 1382-1389. doi:https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.0590041382.x
- Go, A. S., Chertow, G. M., Fan, D., McCulloch, C. E., & Hsu, C.-y. (2004). Chronic Kidney Disease and the Risks of Death, Cardiovascular Events, and Hospitalization. *New England Journal of Medicine*, *351*(13), 1296-1305. doi:10.1056/NEJMoa041031
- Gogos, C. A., Drosou, E., Bassaris, H. P., & Skoutelis, A. (2000). Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis*, *181*(1), 176-180. doi:10.1086/315214
- Gollapudi, P., Yoon, J. W., Gollapudi, S., Pahl, M. V., & Vaziri, N. D. (2010). Leukocyte toll-like receptor expression in end-stage kidney disease. *Am J Nephrol*, *31*(3), 247-254. doi:10.1159/000276764
- Goodier, M. R., Lusa, C., Sherratt, S., Rodriguez-Galan, A., Behrens, R., & Riley, E. M. (2016). Sustained Immune Complex-Mediated Reduction in CD16 Expression after Vaccination Regulates NK Cell Function. *Frontiers in Immunology*, *7*(384). doi:10.3389/fimmu.2016.00384
- Grundström, S., Dohlsten, M., & Sundstedt, A. (2000). IL-2 Unresponsiveness in Anergic CD4 + T Cells Is Due to Defective Signaling Through the Common γ -Chain of the IL-2 Receptor. *The Journal of Immunology*, *164*(3), 1175-1184. doi:10.4049/jimmunol.164.3.1175
- Grzegorzewska, A. E. (2012). Hepatitis B Vaccination in Chronic Kidney Disease: Review of Evidence in Non-Dialyzed Patients. *Hepatitis Monthly*, *12*(11), e7359. doi:10.5812/hepatmon.7359
- Guignant, C., Lepape, A., Huang, X., Kherouf, H., Denis, L., Poitevin, F., Malcus, C., Cheron, A., Allaouchiche, B., Gueyffier, F., Ayala, A., Monneret, G. & Venet, F. (2011).

- Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Crit Care*, 15(2), R99. doi:10.1186/cc10112
- Haeffner-Cavaillon, N., Cavaillon, J.-M., Ciancioni, C., Bacle, F., Delons, S., & Kazatchkine, M. D. (1989). In vivo induction of interleukin-1 during hemodialysis. *Kidney International*, 35(5), 1212-1218. doi:10.1038/ki.1989.112
- Haeffner-Cavaillon, N., Cavaillon, J. M., Laude, M., & Kazatchkine, M. D. (1987). C3a(C3adesArg) induces production and release of interleukin 1 by cultured human monocytes. *J Immunol*, 139(3), 794-799.
- Hakim, R. M. (1993). Clinical implications of hemodialysis membrane biocompatibility. *Kidney Int*, 44(3), 484-494.
- Hamers, L., Kox, M., & Pickkers, P. (2015). Sepsis-induced immunoparalysis: mechanisms, markers, and treatment options. *Minerva Anesthesiol*, 81(4), 426-439.
- Hamilton, R. (2011). Atlas of Diseases of the Kidney.
- Hasuike, Y., Nonoguchi, H., Ito, K., Naka, M., Kitamura, R., Nanami, M., Tokuyama, M, Kida, A., Otaki, Y., Kuragano, T. & Nakanishi, T. (2009). Interleukin-6 Is a Predictor of Mortality in Stable Hemodialysis Patients. *American Journal of Nephrology*, 30(4), 389-398.
- He, W., Fong, Y., Marano, M. A., Gershenwald, J. E., Yurt, R. W., Moldawer, L. L., & Lowry, S. F. (1992). Tolerance to endotoxin prevents mortality in infected thermal injury: association with attenuated cytokine responses. *J Infect Dis*, 165(5), 859-864.
- Heemann, U., Szabo, A., Hamar, P., Müller, V., Witzke, O., Lutz, J., & Philipp, T. (2000). Lipopolysaccharide Pretreatment Protects from Renal Ischemia/Reperfusion Injury : Possible Connection to an Interleukin-6-Dependent Pathway. *The American Journal of Pathology*, 156(1), 287-293.
- Herold, G. (2018). Innere Medizin.
- Hill, N. R., Fatoba, S. T., Oke, J. L., Hirst, J. A., O'Callaghan, C. A., Lasserson, D. S., & Hobbs, F. D. R. (2016). Global Prevalence of Chronic Kidney Disease – A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*, 11(7), e0158765. doi:10.1371/journal.pone.0158765
- Himmelfarb, J., Lazarus, J. M., & Hakim, R. (1991). Reactive oxygen species production by monocytes and polymorphonuclear leukocytes during dialysis. *Am J Kidney Dis*, 17(3), 271-276.
- Hsu, P., Santner-Nanan, B., Hu, M., Skarratt, K., Lee, C. H., Stormon, M., Wong, M., Fuller, S. & Nanan, R. (2015). IL-10 Potentiates Differentiation of Human Induced Regulatory T Cells via STAT3 and Foxo1. *J Immunol*, 195(8), 3665-3674. doi:10.4049/jimmunol.1402898
- Hui, E., Cheung, J., Zhu, J., Su, X., Taylor, M. J., Wallweber, H. A., Sasmal, D., Huang, J., Mellman, I. & Vale, R. D. (2017). T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science*, 355(6332), 1428-1433. doi:10.1126/science.aaf1292
- IDF. (2017). IDF Diabetes Atlas.
- Ingram, J. T., Yi, J. S., & Zajac, A. J. (2011). Exhausted CD8 T cells downregulate the IL-18 receptor and become unresponsive to inflammatory cytokines and bacterial co-infections. *PLoS pathogens*, 7(9), e1002273-e1002273. doi:10.1371/journal.ppat.1002273
- Jiang, Y., Li, Y., & Zhu, B. (2015). T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death Dis*, 6, e1792. doi:10.1038/cddis.2015.162
- Jofré, R., Rodriguez-Benitez, P., López-Gómez, J. M., & Pérez-García, R. (2006). Inflammatory Syndrome in Patients on Hemodialysis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(12 suppl 3), S274. doi:10.1681/ASN.2006080926

-
- Ju, Y., Hou, N., Meng, J., Wang, X., Zhang, X., Zhao, D., & Ma, C. (2010). T cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule-3 (Tim-3) mediates natural killer cell suppression in chronic hepatitis B. *J Hepatol*, 52(3), 322-329. doi:10.1016/j.jhep.2009.12.005
- Kapellos, T. S., Bonaguro, L., Gemünd, I., Reusch, N., Saglam, A., Hinkley, E. R., & Schultze, J. L. (2019). Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Frontiers in Immunology*, 10, 2035-2035. doi:10.3389/fimmu.2019.02035
- Kato, S., Chmielewski, M., Honda, H., Pecoits-Filho, R., Matsuo, S., Yuzawa, Y., Tranaeus, A., Stenvinkel, P. & Lindholm, B. (2008). Aspects of immune dysfunction in end-stage renal disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, 3(5), 1526-1533. doi:10.2215/cjn.00950208
- Koc, M., Toprak, A., Arıkan, H., Odabasi, Z., Elbir, Y., Tulunay, A., Ascioglu, E., Eksioglu-Demiralp, E., Glorieux, G., Vanholder, R. & Akoglu, E. (2011). Toll-like receptor expression in monocytes in patients with chronic kidney disease and haemodialysis: relation with inflammation. *Nephrol Dial Transplant*, 26(3), 955-963. doi:10.1093/ndt/gfq500
- Koga, Y., Fujieda, H., Meguro, H., Ueno, Y., Aoki, T., Miwa, K., & Kainoh, M. (2018). Biocompatibility of Polysulfone Hemodialysis Membranes and Its Mechanisms: Involvement of Fibrinogen and Its Integrin Receptors in Activation of Platelets and Neutrophils. *Artificial organs*, 42(9), E246-E258. doi:10.1111/aor.13268
- Kotanko, P., Carter, M., & Levin, N. W. (2006). Intestinal bacterial microflora—a potential source of chronic inflammation in patients with chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 21(8), 2057-2060. doi:10.1093/ndt/gfl281
- Kramer, A., Pippias, M., Noordzij, M., Stel, V. S., Afentakis, N., Ambühl, P. M., & Jager, K. J. (2018). The European Renal Association – European Dialysis and Transplant Association (ERA-EDTA) Registry Annual Report 2015: a summary. *Clinical Kidney Journal*, 11(1), 108-122. doi:10.1093/ckj/sfx149
- Kreft, B., Klouche, M., Kreft, R., Kirchner, H., & Sack, K. (1997). Low efficiency of active immunization against diphtheria in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int*, 52(1), 212-216.
- Kurts, C., Panzer, U., Anders, H. J., & Rees, A. J. (2013). The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nat Rev Immunol*, 13(10), 738-753. doi:10.1038/nri3523
- Kurz, P., Kohler, H., Meuer, S., Hutteroth, T., & Meyer zum Buschenfelde, K. H. (1986). Impaired cellular immune responses in chronic renal failure: evidence for a T cell defect. *Kidney Int*, 29(6), 1209-1214.
- Kutscher, S., Dembek, C. J., Deckert, S., Russo, C., Körber, N., Bogner, J. R., Umgelter, F., Neuenhahn, A., Albrecht, J., Cosma, A., Protzer, U. & Bauer, T. (2013a). Overnight resting of PBMC changes functional signatures of antigen specific T- cell responses: impact for immune monitoring within clinical trials. *PLoS One*, 8(10), e76215-e76215. doi:10.1371/journal.pone.0076215
- Lee, J., Tam, H., Adler, L., Iltstad-Minnihan, A., Macaubas, C., & Mellins, E. D. (2017). The MHC class II antigen presentation pathway in human monocytes differs by subset and is regulated by cytokines. *PLoS One*, 12(8), e0183594-e0183594. doi:10.1371/journal.pone.0183594
- Lehmann, A. K., Halstensen, A., Sornes, S., Rokke, O., & Waage, A. (1995). High levels of interleukin 10 in serum are associated with fatality in meningococcal disease. *Infect Immun*, 63(6), 2109-2112.
- Libby, P., Ridker, P. M., & Maseri, A. (2002). Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation*, 105(9), 1135.
- Limaye, A. P., Kirby, K. A., Rubenfeld, G. D., Leisenring, W. M., Bulger, E. M., Neff, M. J., Gibran, N., Huang, M., Santo, T., Corey, L & Boeckh, M. (2008). Cytomegalovirus

- reactivation in critically ill immunocompetent patients. *JAMA*, 300(4), 413-422. doi:10.1001/jama.300.4.413
- Lisowska, K. A., Debska-Slizien, A., Jasiulewicz, A., Heleniak, Z., Bryl, E., & Witkowski, J. M. (2012). Hemodialysis affects phenotype and proliferation of CD4-positive T lymphocytes. *J Clin Immunol*, 32(1), 189-200. doi:10.1007/s10875-011-9603-x
- Lisowska, K. A., Debska-Slizien, A., Radzka, M., Witkowski, J. M., Rutkowski, B., & Bryl, E. (2010). Recombinant human erythropoietin treatment of chronic renal failure patients normalizes altered phenotype and proliferation of CD4-positive T lymphocytes. *Artif Organs*, 34(3), E77-84. doi:10.1111/j.1525-1594.2009.00942.x
- Litjens, N. H. R., van Druningen, C. J., & Betjes, M. G. H. (2006). Progressive loss of renal function is associated with activation and depletion of naive T lymphocytes. *Clinical Immunology*, 118(1), 83-91. doi:https://doi.org/10.1016/j.clim.2005.09.007
- Liu, J., Huang, Z., Gilbertson, D. T., Foley, R. N., & Collins, A. J. (2010). An improved comorbidity index for outcome analyses among dialysis patients. *Kidney Int*, 77(2), 141-151. doi:10.1038/ki.2009.413
- Lorenz, G., Schmalenberg, M., Kemmner, S., Haller, B., Steubl, D., Pham, D., Schreiegg, A., Bachmann, Q., Schmidt, A., Haderer, S., Huber, M., Angermann, S., gunthner, R., Braunisch, M., Hauser, C., Reichelt, A., Matschkal, J., Suttamn, Y., Moog, P., Stock, K., Kuchle, C., Thurmel, K., Renders, L., Bauer, A., Baumann, M., Heemann, U., Lupp, P. & Schmaderer, C. (2018). Mortality prediction in stable hemodialysis patients is refined by YKL-40, a 40-kDa glycoprotein associated with inflammation. *Kidney Int*, 93(1), 221-230. doi:10.1016/j.kint.2017.07.010
- Lugli, E., Gattinoni, L., Roberto, A., Mavilio, D., Price, D. A., Restifo, N. P., & Roederer, M. (2013). Identification, isolation and in vitro expansion of human and nonhuman primate T stem cell memory cells. *Nature protocols*, 8(1), 33-42. doi:10.1038/nprot.2012.143
- Lukaszewicz, A., Griénay, M., Resche-Rigon, M., Pirracchio, R., Faivre, V., Boval, B., & Payen, D. (2009). *Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: Interest for prognosis and secondary infection prediction* (Vol. 37).
- Luyt, C. E., Combes, A., Deback, C., Aubriot-Lorton, M. H., Nieszkowska, A., Trouillet, J. L., Carpon, F., Agut, H., Gilbert, C. & Chastre, J. (2007). Herpes simplex virus lung infection in patients undergoing prolonged mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med*, 175(9), 935-942. doi:10.1164/rccm.200609-1322OC
- Maisonneuve, P., Agodoa, L., Gellert, R., Stewart, J. H., Bucciatti, G., Lowenfels, A. B., Wolfe, R., Jones, E., Disney, A., Briggs, D. & Boyle, P. (1999). Cancer in patients on dialysis for end-stage renal disease: an international collaborative study. *Lancet*, 354(9173), 93-99.
- Malaponte, G., Bevelacqua, V., Fatuzzo, P., Rapisarda, F., Emmanuele, G., Travali, S., & Mazzarino, M. C. (2002). IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 release from monocytes in haemodialysis patients in relation to dialytic age. *Nephrol Dial Transplant*, 17(11), 1964-1970. doi:10.1093/ndt/17.11.1964
- Mansouri, L., Nopp, A., Jacobson, S. H., Hylander, B., & Lundahl, J. (2017). Hemodialysis Patients Display a Declined Proportion of Th2 and Regulatory T Cells in Parallel with a High Interferon-gamma Profile. *Nephron*, 136(3), 254-260. doi:10.1159/000471814
- Mastalerz-Migas, A., Steciwko, A., & Brydak, L. B. (2013). Immune response to influenza vaccine in hemodialysis patients with chronic renal failure. *Adv Exp Med Biol*, 756, 285-290. doi:10.1007/978-94-007-4549-0_35
- McIntyre, C. W., Harrison, L. E., Eldehni, M. T., Jefferies, H. J., Szeto, C. C., John, S. G., Sigrist, M., Burton, J., Hothi, D., Korsheed, S., Owen, P., Lai, K. & Li, P. K. (2011). Circulating endotoxemia: a novel factor in systemic inflammation and cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, 6(1), 133-141. doi:10.2215/cjn.04610510

-
- Meakins, J. L., Pietsch, J. B., Bubenick, O., Kelly, R., Rode, H., Gordon, J., & MacLean, L. D. (1977). Delayed hypersensitivity: indicator of acquired failure of host defenses in sepsis and trauma. *Ann Surg*, *186*(3), 241-250.
- Monneret, G., Finck, M. E., Venet, F., Debard, A. L., Bohe, J., Bienvenu, J., & Lepape, A. (2004). The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol Lett*, *95*(2), 193-198. doi:10.1016/j.imlet.2004.07.009
- Monneret, G., Lepape, A., Voirin, N., Bohe, J., Venet, F., Debard, A. L., Debard, A., Thity, H., Bienvenu, J., Gueffier, F. & Vanhems, P. (2006). Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med*, *32*(8), 1175-1183. doi:10.1007/s00134-006-0204-8
- Morgan, M. J., & Liu, Z.-g. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Research*, *21*(1), 103-115. doi:10.1038/cr.2010.178
- Mu, W., Ouyang, X., Agarwal, A., Zhang, L., Long, D. A., Cruz, P. E., Roncal, C., Glushakova, O., Chiodo, V., Atkinson, M., Hauswirth, W., flotte, T., Rodriguez- Iturbe, B. & Johnson, R. J. (2005). IL-10 Suppresses Chemokines, Inflammation, and Fibrosis in a Model of Chronic Renal Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, *16*(12), 3651. doi:10.1681/ASN.2005030297
- Munoz, C., Carlet, J., Fitting, C., Misset, B., Blériot, J. P., & Cavaillon, J. M. (1991). Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *Journal of Clinical Investigation*, *88*(5), 1747-1754.
- Murphy K, T. P., Walport M. (2009). Janeway's Immunobiology. *Garland Science*.
- Naqvi, S. B., & Collins, A. J. (2006). Infectious Complications in Chronic Kidney Disease. *Advances in Chronic Kidney Disease*, *13*(3), 199-204. doi:10.1053/j.ackd.2006.04.004
- Nassar, G. M., & Ayus, J. C. (2001). Infectious complications of the hemodialysis access. *Kidney International*, *60*(1), 1-13. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.00765.x
- Netea, M. G., Suttmuller, R., Hermann, C., Van der Graaf, C. A. A., Van der Meer, J. W. M., van Krieken, J. H., Hartung, T. Adema, G. & Kullberg, B. J. (2004). Toll-Like Receptor 2 Suppresses Immunity against *Candida albicans* through Induction of IL-10 and Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, *172*(6), 3712-3718. doi:10.4049/jimmunol.172.6.3712
- Newport, M. J., Huxley, C. M., Huston, S., Hawrylowicz, C. M., Oostra, B. A., Williamson, R., & Levin, M. (1996). A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med*, *335*(26), 1941-1949. doi:10.1056/nejm199612263352602
- Nielsen, T. L., Plesner, L. L., Warming, P. E., Pallisgaard, J. L., Dalsgaard, M., Schou, M., Host, U., Rydahl, C., Brandi, L., Kober, L., Johnsen, J., Kastrup, J. & Iversen, K. K. (2018). YKL-40 in Patients with End Stage Renal Disease receiving Hemodialysis. *Biomarkers*, 1-28. doi:10.1080/1354750x.2018.1428359
- Nissenson, A. R. (2014). Improving outcomes for ESRD patients: shifting the quality paradigm. *Clin J Am Soc Nephrol*, *9*(2), 430-434. doi:10.2215/cjn.05980613
- Nitta, K., Akiba, T., Kawashima, A., Kimata, N., Miwa, N., Nishida, E., Uchida, L., Honda, K., Yumura, W. & Nihei, H. (2002). Characterization of TH1/TH2 profile in uremic patients. *Nephron*, *91*(3), 492-495.
- Ocaña-Guzman, R., Torre-Bouscoulet, L., & Sada-Ovalle, I. (2016). TIM-3 Regulates Distinct Functions in Macrophages. *Frontiers in Immunology*, *7*, 229-229. doi:10.3389/fimmu.2016.00229
- Olszyna, D. P., Pajkrt, D., Lauw, F. N., van Deventer, S. J. H., & van der Poll, T. (2000). Interleukin 10 Inhibits the Release of CC Chemokines during Human Endotoxemia. *The Journal of Infectious Diseases*, *181*(2), 613-620. doi:10.1086/315275

-
- Otto, G. P., Sossdorf, M., Claus, R. A., Rodel, J., Menge, K., Reinhart, K., Bauer, M. & Riedemann, N. C. (2011). The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit Care*, 15(4), R183. doi:10.1186/cc10332
- Panichi, V., Migliori, M., De Pietro, S., Taccola, D., Bianchi, A. M., Giovannini, L., Norpoth, M., Metelli, M., Cristofani, R., Bertelli, A., Sbragia, G., Tetta, C., Palla, R. & Colombo, R. (2002). C-reactive protein and interleukin-6 levels are related to renal function in predialytic chronic renal failure. *Nephron*, 91(4), 594-600. doi:10.1159/000065018
- Panichi, V., Taccola, D., Rizza, G. M., Consani, C., Ghiadoni, L., Filippi, C. & Tetta, C. (2006). Interleukin-8 Is a Powerful Prognostic Predictor of All-Cause and Cardiovascular Mortality in Dialytic Patients. *Nephron Clinical Practice*, 102(2), c51-c58. doi:10.1159/000088923
- Patera, A. C., Drewry, A. M., Chang, K., Beiter, E. R., Osborne, D., & Hotchkiss, R. S. (2016). Frontline Science: Defects in immune function in patients with sepsis are associated with PD-1 or PD-L1 expression and can be restored by antibodies targeting PD-1 or PD-L1. *Journal of leukocyte biology*, 100(6), 1239-1254. doi:10.1189/jlb.4HI0616-255R
- Pauken, K. E., & Wherry, E. J. (2015). Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends Immunol*, 36(4), 265-276. doi:10.1016/j.it.2015.02.008
- Pecoits-Filho, R., Heimbürger, O., Barany, P., Suliman, M., Fehrman-Ekholm, I., Lindholm, B., & Stenvinkel, P. (2003). Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients. *Am J Kidney Dis*, 41(6), 1212-1218.
- Platzer, C., Meisel, C., Vogt, K., Platzer, M., & Volk, H. D. (1995). Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor-alpha and cAMP elevating drugs. *Int Immunol*, 7(4), 517-523.
- Poli, A., Michel, T., Theresine, M., Andres, E., Hentges, F., & Zimmer, J. (2009). CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology*, 126(4), 458-465. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.03027.x
- Ramirez, R., Carracedo, J., Soriano, S., Jimenez, R., Martin-Malo, A., Rodriguez, M., Blasco, M. & Aljama, P. (2005). Stress-induced premature senescence in mononuclear cells from patients on long-term hemodialysis. *Am J Kidney Dis*, 45(2), 353-359.
- Randow, F., Syrbe, U., Meisel, C., Krausch, D., Zuckermann, H., Platzer, C., & Volk, H. D. (1995). Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. *J Exp Med*, 181(5), 1887-1892.
- Reddy, M., Eirikis, E., Davis, C., Davis, H. M., & Prabhakar, U. (2004). Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. *Journal of Immunological Methods*, 293(1), 127-142. doi:https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.07.006
- Remick, D. G. (2003). Cytokine therapeutics for the treatment of sepsis: why has nothing worked? *Curr Pharm Des*, 9(1), 75-82.
- Rihawi, K., Gelsomino, F., Sperandi, F., Melotti, B., Fiorentino, M., Casolari, L., & Ardizzoni, A. (2017). Pembrolizumab in the treatment of metastatic non-small cell lung cancer: a review of current evidence. *Therapeutic advances in respiratory disease*, 11(9), 353-373. doi:10.1177/1753465817725486
- Rivers, E., Nguyen, B., Havstad, S., Ressler, J., Muzzin, A., Knoblich, B., Peterson, M. & Tomlanovich, M. (2001). Early Goal-Directed Therapy in the Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock. *New England Journal of Medicine*, 345(19), 1368-1377. doi:10.1056/NEJMoa010307
- Rysz, J., Banach, M., Cialkowska-Rysz, A., Stolarek, R., Barylski, M., Drozd, J., & Okonski, P. (2006). Blood serum levels of IL-2, IL-6, IL-8, TNF-alpha and IL-1beta in patients on maintenance hemodialysis. *Cell Mol Immunol*, 3(2), 151-154.

-
- Santos-Alvarez, J., Goberna, R., & Sanchez-Margalet, V. (1999). Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. *Cell Immunol*, *194*(1), 6-11. doi:10.1006/cimm.1999.1490
- Saraiva, M., & O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*, *10*, 170. doi:10.1038/nri2711
- Saran, R., Robinson, B., Abbott, K. C., Agodoa, L. Y. C., Bragg-Gresham, J., Balkrishnan, R., & Shahinian, V. (2018). US Renal Data System 2017 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *Am J Kidney Dis*, *71*(3S1), A7. doi:10.1053/j.ajkd.2018.01.002
- Sarnak, M. J., & Jaber, B. L. Mortality caused by sepsis in patients with end-stage renal disease compared with the general population. *Kidney International*, *58*(4), 1758-1764. doi:10.1111/j.1523-1755.2000.00337.x
- Sarnak, M. J., & Jaber, B. L. (2001). Pulmonary infectious mortality among patients with end-stage renal disease. *Chest*, *120*(6), 1883-1887.
- Scherberich, J. E., Estner, H., & Segerer, W. (2004). Impact of different immunosuppressive regimens on antigen-presenting blood cells in kidney transplant patients. *Kidney Blood Press Res*, *27*(3), 177-180. doi:10.1159/000079807
- Sester, U., Sester, M., Hauk, M., Kaul, H., Kohler, H., & Girndt, M. (2000). T-cell activation follows Th1 rather than Th2 pattern in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*, *15*(8), 1217-1223.
- Skrzeczynska-Moncznik, J., Bzowska, M., Loseke, S., Grage-Griebenow, E., Zembala, M., & Pryjma, J. (2008). Peripheral blood CD14high CD16+ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol*, *67*(2), 152-159. doi:10.1111/j.1365-3083.2007.02051.x
- Spec, A., Shindo, Y., Burnham, C. A., Wilson, S., Ablordeppey, E. A., Beiter, E. R., Chang, K., Drewry, A. & Hotchkiss, R. S. (2016). T cells from patients with Candida sepsis display a suppressive immunophenotype. *Crit Care*, *20*, 15. doi:10.1186/s13054-016-1182-z
- Stevens, C. E., Alter, H. J., Taylor, P. E., Zang, E. A., Harley, E. J., & Szmuness, W. (1984). Hepatitis B vaccine in patients receiving hemodialysis. Immunogenicity and efficacy. *N Engl J Med*, *311*(8), 496-501. doi:10.1056/nejm198408233110803
- Takeda, K., & Akira, S. (2015). Toll-like receptors. *Curr Protoc Immunol*, *109*, 14 12 11-10. doi:10.1002/0471142735.im1412s109
- Tonelli, M., Wiebe, N., Culleton, B., House, A., Rabbat, C., Fok, M., McAlister, F. & Garg, A. X. (2006). Chronic Kidney Disease and Mortality Risk: A Systematic Review. *Journal of the American Society of Nephrology*, *17*(7), 2034-2047. doi:10.1681/asn.2005101085
- Torgersen, C., Moser, P., Luckner, G., Mayr, V., Jochberger, S., Hasibeder, W. R., & Dunser, M. W. (2009). Macroscopic postmortem findings in 235 surgical intensive care patients with sepsis. *Anesth Analg*, *108*(6), 1841-1847. doi:10.1213/ane.0b013e318195e11d
- Tracey, K. J., Beutler, B., Lowry, S. F., Merryweather, J., Wolpe, S., Milsark, I. W., hariri, R., Fahey, T, Zentella, A. & Albert, J. (1986). Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science*, *234*(4775), 470-474.
- Tzeng, H. T., Tsai, H. F., Liao, H. J., Lin, Y. J., Chen, L., Chen, P. J., & Hsu, P. N. (2012). PD-1 blockage reverses immune dysfunction and hepatitis B viral persistence in a mouse animal model. *PLoS One*, *7*(6), e39179. doi:10.1371/journal.pone.0039179
- Vacher-Coponat, H., Brunet, C., Lyonnet, L., Bonnet, E., Loundou, A., Sampol, J., Moal, V., Dussol, B., Brunet, P., Berland, Y., Dignat-George, F. & Paul, P. (2008). Natural killer cell alterations correlate with loss of renal function and dialysis duration in uraemic patients. *Nephrol Dial Transplant*, *23*(4), 1406-1414. doi:10.1093/ndt/gfm596
- van Tits, L. J., Stienstra, R., van Lent, P. L., Netea, M. G., Joosten, L. A., & Stalenhoef, A. F. (2011). Oxidized LDL enhances pro-inflammatory responses of alternatively activated

-
- M2 macrophages: a crucial role for Kruppel-like factor 2. *Atherosclerosis*, 214(2), 345-349. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.11.018
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., & Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*, 9(5), 503-510. doi:10.1038/ni1582
- Volk, H. D., Reinke, P., Krausch, D., Zuckermann, H., Asadullah, K., Müller, J. M., Döcke, W. & Kox, W. J. (1996). Monocyte deactivation-rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. *Intensive Care Medicine*, 22(4), S474-S481. doi:10.1007/BF01743727
- Voll, R. E., Herrmann, M., Roth, E. A., Stach, C., Kalden, J. R., & Girkontaite, I. (1997). Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*, 390, 350. doi:10.1038/37022
- Weng, N. P., Akbar, A. N., & Goronzy, J. (2009). CD28(-) T cells: their role in the age-associated decline of immune function. *Trends Immunol*, 30(7), 306-312. doi:10.1016/j.it.2009.03.013
- Wildgruber, M., Aschenbrenner, T., Wendorff, H., Czubba, M., Glinzer, A., Haller, B., Schiemann, M., Zimmermann, A., Berger, H., Eckstein, H., Meier, R., Wohlgemut, W., Libby, P., & Zerneck, A. (2016). The "Intermediate" CD14(++)CD16(+) monocyte subset increases in severe peripheral artery disease in humans. *Scientific reports*, 6, 39483-39483. doi:10.1038/srep39483
- Wolk, K., Docke, W. D., von Baehr, V., Volk, H. D., & Sabat, R. (2000). Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood*, 96(1), 218-223.
- Wolk, K., Hoflich, C., Zuckermann-Becker, H., Docke, W. D., Volk, H. D., & Sabat, R. (2007). Reduced monocyte CD86 expression in postinflammatory immunodeficiency. *Crit Care Med*, 35(2), 458-467. doi:10.1097/01.ccm.0000254724.54515.2f
- Wong, G., Hayen, A., Chapman, J. R., Webster, A. C., Wang, J. J., Mitchell, P., & Craig, J. C. (2009). Association of CKD and Cancer Risk in Older People. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 20(6), 1341-1350. doi:10.1681/ASN.2008090998
- Xu-Monette, Z. Y., Zhang, M., Li, J., & Young, K. H. (2017). PD-1/PD-L1 Blockade: Have We Found the Key to Unleash the Antitumor Immune Response? *Frontiers in Immunology*, 8(1597). doi:10.3389/fimmu.2017.01597
- Yang, J., Murphy, T. L., Ouyang, W., & Murphy, K. M. (1999). Induction of interferon-gamma production in Th1 CD4+ T cells: evidence for two distinct pathways for promoter activation. *Eur J Immunol*, 29(2), 548-555. doi:10.1002/(sici)1521-4141(199902)29:02<548::aid-immu548>3.0.co;2-z
- Ye, B., Liu, X., Li, X., Kong, H., Tian, L., & Chen, Y. (2015). T-cell exhaustion in chronic hepatitis B infection: current knowledge and clinical significance. *Cell Death Dis*, 6, e1694. doi:10.1038/cddis.2015.42
- Yi, J. S., Cox, M. A., & Zajac, A. J. (2010). T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology*, 129(4), 474-481. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03255.x
- Yoon, J. W., Gollapudi, S., Pahl, M. V., & Vaziri, N. D. (2006). Naive and central memory T-cell lymphopenia in end-stage renal disease. *Kidney Int*, 70(2), 371-376. doi:10.1038/sj.ki.5001550

7 Supplementäre Daten

7.1 Deskriptive Kohortenstatistik zu Oberflächenphänotypisierung, T-Zell- Effektor- Funktion und Zytokinmessungen

Tabelle 6: Deskriptive Kohortenstatistik T- Zell- Oberflächenphänotyp

Parameter	HD- Patienten	Kontrollgruppe	p- Wert
Anzahl, <i>n</i>	74	74	-
Alter (Jahre), MW ± SD	70 ± 15	67 ± 12	0,247
Geschlecht (männlich), <i>n</i> (%)	34 (45,9)	36 (48,6)	0,742
BMI (kg/m ²), MW ± SD	26 ± 5	24 ± 4	0,020
Oberarmumfang (cm) MW ± SD	29 ± 4	26 ± 3	<0,001
Adaptierter CCI (0-21) MW ± SD	4 ± 3	0 ± 0	<0,001
MI in Anamnese, <i>n</i> (%)	14 (19)	0 (0)	<0,001
Hypertensive Herzerkrankung, <i>n</i> (%)	34 (46)	0 (0)	<0,001
KHK, pAVK oder Apoplex in Anamnese, <i>n</i> (%)	37 (50)	1 (1,4)	<0,001
Diabetes , <i>n</i> (%)	25 (34)	0 (0)	<0,001
COPD, <i>n</i> (%)	6 (8)	0 (0)	0,012
Neoplasie in Anamnese, <i>n</i> (%)	29 (39)	4 (5,4)	<0,001
Vorhofflimmern, <i>n</i> (%)	17 (23)	0 (0)	<0,001
Rheumatologische Erkrankung, <i>n</i> (%)	7 (9)	0 (0)	0,007
Chronische Infektion, <i>n</i> (%)	4 (5)	0 (0)	0,043
Hospitalisierungen in letzten 24 Monaten, MW ± SD	3 ± 2	0 ± 0	<0,001
Hospitalisierungen wg. primär infektiösen Ereignis, MW ± SD	0 ± 1	0 ± 0	<0,001
HD vintage (Monate), Median (IQR)	35 (17 - 55,25)	-	-
Katheter	8 (11)	-	-
Kt/V, MW ± SD	1,2 ± 0,3	-	-
Nikotinabusus, <i>n</i> (%)	14 (19)	14 (18,9)	1,000
Medikamentöse Immunsuppression, <i>n</i> (%)	22 (30)	0 (0)	<0,001
Statine	30 (41)	6 (8,1)	<0,001
Albumin (g/L), MW ± SD *	4,1 ± 0,4	3,9 ± 0,2	0,052
CRP (g/L), Median (IQR) *	5,1 (2,05 - 9,4)	0,11 (0,04 - 0,27)	<0,001
IL-6 (pg/mL), Median (IQR) *	4,1 (2,43 - 7,12)	1,01 (0,55 - 1,7)	<0,001
IL-8 (pg/mL), Median (IQR) *	16,12 (11,85 - 20,65)	5,7 (4,68 - 7,17)	<0,001

*unvollständige Daten (Patienten/Gesunde Kontrollen): Albumin n=3/53; CRP n=1/0; IL-6 n=10/19; IL-8 n=9/0

Tabelle 7: Deskriptive Statistik Monozyten und NK- Zellen Oberflächenphänotyp

Parameter	HD- Patienten	Kontrollgruppe	p- Wert
Anzahl, <i>n</i>	67	67	-
Alter (Jahre), MW ± SD	70 ± 14	68 ± 12	0,205
Geschlecht (männlich), <i>n</i> (%)	30 (44,8)	34 (50,7)	0,489
BMI (kg/m ²), MW ± SD	26 ± 5	24 ± 4	0,010
Oberarmumfang (cm) MW ± SD	29 ± 4	27 ± 3	<0,001
Adaptierter CCI (0-21) MW ± SD	4 ± 3	0 ± 0	<0,001
MI in Anamnese, <i>n</i> (%)	12 (18)	0 (0)	<0,001
Hypertensive Herzerkrankung, <i>n</i> (%)	29 (43)	0 (0)	<0,001
KHK, pAVK oder Apoplex in Anamnese, <i>n</i> (%)	34 (51)	1 (1,5)	<0,001
Diabetes, <i>n</i> (%)	23 (34)	0 (0)	<0,001
COPD, <i>n</i> (%)	5 (7)	0 (0)	0,023
Neoplasie in Anamnese, <i>n</i> (%)	28 (42)	4 (6)	<0,001
Vorhofflimmern, <i>n</i> (%)	14 (21)	0 (0)	<0,001
Rheumatologische Erkrankung, <i>n</i> (%)	5 (7)	0 (0)	0,023
Chronische Infektion, <i>n</i> (%)	4 (6)	0 (0)	0,042
Hospitalisierungen in letzten 24 Monaten, MW ± SD	3 ± 2	0 ± 0	<0,001
Hospitalisierungen wg. primär infektiösen Ereignis, MW ± SD	0,4 ± 0,6	0 ± 0	<0,001
HD vintage (Monate), Median (IQR)	34 (16 - 55)	-	-
Katheter	8 (12)	-	-
Kt/V, MW ± SD	1,2 ± 0,3	-	-
Nikotinabusus, <i>n</i> (%)	13 (19)	13 (19,4)	1,000
Medikamentöse Immunsuppression, <i>n</i> (%)	24 (36)	0 (0)	<0,001
Statine	29 (43)	5 (7,5)	<0,001
Albumin (g/dL), MW ± SD *	4,1 ± 0,4	3,9 ± 0,2	0,670
CRP (g/L), Median (IQR) *	5,2 (2,13 - 9,78)	0,1 (0,1 - 2,2)	<0,001
IL-6 (pg/mL), Median (IQR) *	4 (2,37 - 7,12)	0,91 (0,53 - 1,59)	<0,001
IL-8 (pg/mL), Median (IQR) *	16,76 (12,16 - 22,32)	5,74 (4,71 - 7,22)	<0,001

*unvollständige Daten (HD/Kontrollen): Albumin n=3/46; CRP n=1/0; IL-6 n=10/18; IL-8 n=10/0

Tabelle 8: Deskriptive Statistik T- Zell- Effektorfunktion

Parameter	HD- Patienten	Kontrollgruppe	p- Wert
Anzahl, <i>n</i>	59	58	-
Alter (Jahre), MW ± SD	69 ± 15	67 ± 14	0,432
Geschlecht (männlich), <i>n</i> (%)	28 (47,5)	30 (51,7)	1,000
BMI (kg/m ²), MW ± SD	26 ± 5	24 ± 3	0,004
Oberarmumfang (cm) MW ± SD	29 ± 4	27 ± 3	0,001
Adaptierter CCI (0-21) MW ± SD	4 ± 3	0 ± 0	<0,001
MI in Anamnese, <i>n</i> (%)	12 (20)	0 (0)	<0,001
Hypertensive Herzerkrankung, <i>n</i> (%)	28 (47)	0 (0)	<0,001
KHK, pAVK oder Apoplex in Anamnese, <i>n</i> (%)	27 (46)	0 (0)	<0,001
Diabetes, <i>n</i> (%)	20 (34)	0 (0)	<0,001
COPD, <i>n</i> (%)	5 (8)	0 (0)	0,023
Neoplasie in Anamnese, <i>n</i> (%)	21 (36)	1 (1,7)	<0,001
Vorhofflimmern, <i>n</i> (%)	16 (27)	0 (0)	<0,001
Rheumatologische Erkrankung, <i>n</i> (%)	6 (10)	0 (0)	0,013
Chronische Infektion, <i>n</i> (%)	2 (3)	0 (0)	0,157
Hospitalisierungen in letzten 24 Monaten, MW ± SD	3 ± 2	0 ± 0	<0,001
Hospitalisierungen wg. primär infektiösen Ereignis, MW ± SD	0,4 ± 0,7	0 ± 0	<0,001
HD vintage (Monate), Median (IQR)	37 (16 - 58)	-	-
Katheter	7 (12)	-	-
Kt/V, MW ± SD	1,2 ± 0,3	-	-
Nikotinabusus, <i>n</i> (%)	9 (15)	8 (13,8)	0,823
Medikamentöse Immunsuppression, <i>n</i> (%)	18 (31)	0 (0)	<0,001
Statine	26 (44)	4 (6,9)	<0,001
Albumin (g/L), MW ± SD *	4,1 ± 0,5	3,9 ± 0,3	0,112
CRP (g/L), Median (IQR) *	6 (3,48 - 13,6)	0,14 (0,05 - 0,27)	<0,001
IL-6 (pg/mL), Median (IQR) *	4,76 (2,44 - 7,11)	1,04 (0,52 - 1,53)	<0,001
IL-8 (pg/mL), Median (IQR) *	15,8 (11,65 - 20,25)	5,97 (4,7 - 7,24)	<0,001

*unvollständige Daten: Albumin n=1/38; CRP n=1/8; IL-6 n=12/21; IL-8 n=12/8

Tabelle 9: Deskriptive Statistik zu Analysen innerhalb der HD- Gruppe

Parameter	HD- infektgefährdet	HD- normal	p- Wert
Anzahl, <i>n</i>	10	10	-
Alter (Jahre), MW ± SD	74 ± 17	73 ± 14	0,888
Geschlecht (männlich), <i>n</i> (%)	5 (50)	5 (50)	1,000
BMI (kg/m ²), MW ± SD	26 ± 6	28 ± 5	0,537
Oberarmumfang (cm) MW ± SD	29 ± 4	28 ± 3	0,578
Adaptierter CCI (0-21) MW ± SD	5 ± 3	4 ± 3	0,571
MI in Anamnese, <i>n</i> (%)	5 (50)	2 (20)	0,160
Hypertensive Herzerkrankung, <i>n</i> (%)	6 (60)	6 (60)	1,000
KHK, pAVK oder Apoplex in Anamnese, <i>n</i> (%)	7 (70)	5 (50)	0,361
Diabetes, <i>n</i> (%)	4 (40)	1 (10)	0,121
COPD, <i>n</i> (%)	1 (10)	1 (10)	1,000
Neoplasie in Anamnese, <i>n</i> (%)	5 (50)	4 (40)	0,653
Vorhofflimmern, <i>n</i> (%)	5 (50)	2 (20)	0,160
Rheumatologische Erkrankung, <i>n</i> (%)	2 (20)	0 (0)	0,136
Chronische Infektion, <i>n</i> (%)	1 (10)	0 (0)	0,305
Hospitalisierungen in letzten 24 Monaten, MW ± SD	2 ± 1	3 ± 2	0,111
Hospitalisierungen wg. primär infektiösen Ereignis, MW ± SD	1,3 ± 0,7	0,2 ± 0,4	0,000
HD vintage (Monate), Median (IQR)	58,5 (11,25 - 93)	42 (31,25 - 63,75)	1,000
Katheter	1 (10)	1 (10)	1,000
Kt/V, MW ± SD *	1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,2	0,229
Nikotinabusus, <i>n</i> (%)	3 (30)	5 (50)	0,361
Medikamentöse			
Immunsuppression, <i>n</i> (%)	4 (40)	2 (20)	0,329
Statine	6 (60)	4 (40)	0,371
Albumin (g/dL), MW ± SD *	4 ± 0	4 ± 0	0,111
CRP (g/L), Median (IQR) *	5,05 (1,05 - 18,3)	8,6 (1,28 - 16,7)	0,968
IL-6 (pg/mL), Median (IQR) *	4,66 (2,27 - 14,43)	3,91 (2,25 - 8,39)	0,780
IL-8 (pg/mL), Median (IQR) *	19,17 (13,14 - 32,64)	19,96 (12,68 - 20,5)	7,960

*unvollständige Daten (HD/Kontrollen): Kt/V n=2/0; Albumin n=0/1; IL-6 n=1/0

Tabelle 10: Deskriptive Statistik Zytokinmessungen

Parameter	HD- Patienten	Kontrollgruppe	p- Wert
Anzahl, <i>n</i>	70	70	-
Alter (Jahre), MW ± SD	70 ± 14	67 ± 12	0,03
Geschlecht (männlich), <i>n</i> (%)	36 (51)	37 (53)	0,826
BMI (kg/m ²), MW ± SD	26 ± 5	24 ± 4	0,06
Oberarmumfang (cm) MW ± SD	29 ± 4	27 ± 3	0,03
Adaptierter CCI (0-21) MW ± SD	4 ± 3	0	<0,001
MI in Anamnese, <i>n</i> (%)	14 (20)	0	<0,001
Hypertensive Herzerkrankung, <i>n</i> (%)	35 (50)	0	<0,001
KHK, pAVK oder Apoplex in Anamnese, <i>n</i> (%)	36 (51)	0	<0,001
Diabetes, <i>n</i> (%)	24 (34)	0	<0,001
COPD, <i>n</i> (%)	7 (10)	0	<0,001
Neoplasie in Anamnese, <i>n</i> (%)	27 (39)	0	<0,001
Vorhofflimmern, <i>n</i> (%)	15(21)	0	<0,001
Rheumatologische Erkrankung, <i>n</i> (%)	6 (9)	0	<0,001
Chronische Infektion, <i>n</i> (%)	3 (4)	0	<0,001
Hospitalisierungen in letzten 24 Monaten, MW ± SD	3 ± 2	0	<0,001
Hospitalisierungen wg. primär infektiösen Ereignis, MW ± SD	1 ± 0,5	0	<0,001
HD vintage (Monate), Median (IQR)	35 (17 - 55,25)	-	-
Katheter	6 (9)	-	-
Kt/V, MW ± SD	1,1 ± 0,3	-	-
Nikotinabusus, <i>n</i> (%)	15 (21)	12 (17)	
Medikamentöse Immunsuppression, <i>n</i> (%)	25 (35)	0	<0,001
Statine, <i>n</i> (%)	33 (47)	5 (7)	<0,001
Albumin (g/L), MW ± SD	40 ± 4	39 ± 2	0,296
CRP (g/L), Median (IQR)	4,1 (1,75-9,75)	0,1 (0,04 – 0,28)	<0,001

*unvollständige Daten: Albumin n=1/44; CRP n=1/1

8 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

Die Immunparalyse bei Hämodialysepatienten

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

9 Danksagung

Als erstes möchte ich meinem Doktorvater, PD Dr. med. Christoph Schmaderer, für die Überlassung des Themas und der fortwährenden Unterstützung des Projektes und meiner Arbeit darin danken. Ohne sein Vertrauen wäre mein Wechsel von der klinischen in die experimentelle Forschung wohl nie zustande gekommen und ich hätte das spannende Thema der Immunparalyse nicht für mich entdeckt. Ausdrücklich bedanken möchte ich mich auch für die finanzielle Unterstützung während meiner Zeit als Doktorand im nephrologischen Forschungslabor und dem stets sehr herzlichen Umgang.

Nicht weniger gilt mein Dank meinem Betreuer, Dr. Georg Lorenz, der mir zu jeder Tageszeit mit Rat und Tat zur Seite stand und ohne dessen hohe Motivation dieses Projekt niemals hätte beendet werden können. Sein Wissen, Begeisterung und Einsatz für die Immunologie haben mir stets imponiert und mich dazu motiviert, viel Zeit und Ausdauer in diese Arbeit zu investieren. Sein Humor und sein angenehmer Charakter haben diese anstrengende Zeit zu einer mir sehr wertvollen Erfahrung gemacht.

Weiterhin möchte ich der Arbeitsgruppe von Matthias Schiemann des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene danken, die uns mit ihrer Expertise maßgeblich bei der Etablierung des Oberflächen- FACS- Panels unterstützten und uns zudem die Nutzung ihrer Durchflusszytometer gestatteten. Großer Dank gilt ebenso der Arbeitsgruppe um Tanja Bauer des Helmholtz- Zentrum Münchens, ohne deren Kooperation wir die intrazellulären FACS- Analysen niemals hätten durchführen können. Auch unserem dritten Kooperationspartner, der Arbeitsgruppe von Prof. Luppä des Instituts für klinische Chemie, möchte ich an dieser Stelle herzlich für Ihre Unterstützung bei der Etablierung des Bead- Arrays danken.

Großer Dank gilt auch den medizinisch- technischen Assistenten im nephrologischen Forschungslabor, Alina Schmidt und Sandra Haderer, für ihre tatkräftige Unterstützung über normale Arbeitszeiten hinaus. Ohne diese beiden hätte die Probenasservierung und Untersuchung an den Abnahmetagen und somit das gesamte Projekt niemals so gut funktioniert.

Auch möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bei meinen Mitdoktoranden, anfänglich Simmon Witthauer, Felicitas Dettenhofer und Jasmin Abuzahu, bedanken. Viel Dank gilt auch Joanna Cardoso und Katerina Markoska, die mich in der zweiten Phase meiner Laborarbeit tatkräftig unterstützt haben.

Zuletzt danke ich meiner Freundin, Sina Hage, die mir durch den gesamten Prozess der Doktorarbeit seelisch und moralisch immer eine große Stütze war und mir in den langen Tagen der Datenerhebung im Labor viel Geduld und Verständnis entgegenbrachte.